



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS:**

**Evaluación del efecto inmunomodulador de Transferon® (Extracto Dializable de Leucocitos) utilizando un modelo murino de infección con el Virus Herpes Simplex tipo 1 (VHS-1).**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ERÉNDIRA NAYELI SOSA GRANDE**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx.    AÑO 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:      Profesor: ROCIO GABRIELA TIRADO MENDOZA**

**VOCAL:              Profesor: MARIO ADAN MORENO EUTIMIO**

**SECRETARIO:      Profesor: NOHEMI SALINAS JAZMIN**

**1er. SUPLENTE:    Profesor: JULIO CESAR MARTINEZ ALVAREZ**

**2do. SUPLENTE:    Profesor: GIBRAN PEREZ MONTESINOS**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI)**

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. Nohemí Salinas Jazmín**

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE (S):**

**Eréndira Nayeli Sosa Grande**

\_\_\_\_\_

# ÍNDICE GENERAL

Contenido

ÍNDICE GENERAL .....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
ABREVIATURAS.....	v
1. RESUMEN .....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1 ¿Qué es un Extracto Dializable de Leucocitos (EDL)?.....	3
2.1.1 Antecedentes. ....	3
2.1.2 Aplicaciones terapéuticas de los EDLs. ....	5
2.2 Transferon® .....	6
2.2.1 Producción y control de calidad .....	6
2.2.2 Caracterización fisicoquímica.....	8
2.2.3 Caracterización biológica y eficacia clínica .....	12
2.4 Introducción a la Familia <i>Herpesviridae</i> .....	14
2.4.1 Descripción general .....	14
2.5 Virus Herpes Simplex (VHS) .....	16
2.5.1 Estructura del virión. ....	16
2.5.2 Replicación viral.....	18
2.5.3 Epidemiología.....	21
2.5.4 Respuesta inmunológica del huésped. ....	21
2.6 El efecto de Transferon® en la infección por VHS.....	23
3. JUSTIFICACIÓN .....	24
4. HIPÓTESIS .....	25

5. OBJETIVOS .....	26
5.1 Objetivo general.....	26
5.2 Objetivos particulares.....	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
6.1 Modelo de sobrevida.....	27
6.1.1 Infección con VHS-1.....	27
6.1.2 Administración de Transferon® .....	28
6.1.3 Obtención de muestras.....	31
6.2 Determinación de citocinas por citometría de flujo .....	31
6.2.1 Fundamento de los ensayos de CBA.....	31
6.2.2 Cuantificación de citocinas.....	32
6.3 Evaluación de la presencia de anticuerpos.....	35
6.3.1 Determinación de IgG <sub>totales</sub> e IgM por ELISA.....	35
6.3.2 Titulación de VHS-1 por el método de dosis infectante de cultivo de tejidos 50% (TCID <sub>50</sub> ) .....	37
6.3.3 Ensayos de Neutralización.....	43
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	46
8. RESULTADOS .....	47
8.1 Determinación de citocinas en suero de ratones utilizando un modelo murino de infección con VHS-1 y tratados con Transferon® .....	47
8.2 Análisis de anticuerpos IgM e IgG <sub>totales</sub> utilizando un modelo murino de herpes.....	50
8.3 Análisis de la actividad neutralizante de anticuerpos utilizando sueros de ratones infectados y tratados con Transferon® .....	51
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	53
10. CONCLUSIONES.....	58
11. BIBLIOGRAFÍA .....	59

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades en las que está indicado Transferon® .....	7
Tabla 2. Marco analítico de Transferon® .....	8
Tabla 3. Distribución de los grupos de trabajo para el ensayo de cuantificación de citocinas .....	29
Tabla 4. Distribución de los grupos de trabajo para el ensayo de cuantificación de anticuerpos de tipo IgG totales e IgM y actividad neutralizante.....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Perfil cromatográfico de Transferon® por SE-UHPLC .....	9
Figura 2. Perfil cromatográfico de Transferon® por RP-UHPLC-UV .....	10
Figura 3. Análisis del contenido de proteína entre lotes de Transferon® .....	10
Figura 4. Abundancia relativa promedio de aminoácidos proteínogénicos en lotes de Transferon® .....	11
Figura 5. Efecto de Transferon® en la secreción de IFN- $\gamma$ por células Jurkat .....	12
Figura 6. Validación del modelo murino de herpes para la evaluación de la actividad biológica de Transferon® .....	13
Figura 7. Principales relaciones filogenéticas y subunidades taxonómicas dentro del orden <i>Herpesvirales</i> .....	15
Figura 8. Estructura del virión del VHS.....	17
Figura 9. Estructura y ciclo de replicación del VHS .....	20
Figura 10. Esquema de infección para el ensayo de cuantificación de citocinas ..	29
Figura 11. Evaluación de la actividad biológica de Transferon® lote 12C04.....	29
Figura 12. Esquema de infección para el ensayo de cuantificación de anticuerpos .....	30
Figura 13. Evaluación de la actividad biológica de Transferon® lote 14D11.....	30
Figura 14. Estrategia de análisis de la prueba por CBA.....	32
Figura 15. Esquema de las diluciones seriadas del estándar Mouse Inflammation Kit .....	33
Figura 16. Morfología de las células Vero .....	38
Figura 17. Esquema de la placa de cultivo para la titulación de VHS-1 .....	41
Figura 18. Revisión al microscopio de la placa de titulación de VHS-1 por el método de TCID <sub>50</sub> .....	42
Figura 19. Resultados obtenidos de la titulación de VHS-1.....	43
Figura 20. Diseño de la placa para el ensayo de neutralización. Los pozos que se encuentran vacíos están en color gris .....	45
Figura 21. Perfil de citocinas en suero de ratones infectados con VHS-1 y tratados con Transferon® .....	49
Figura 22. Determinación de anticuerpos en suero de ratones infectados con VHS-1 y tratados con Transferon® a tiempos tempranos.....	50
Figura 23. Evaluación de la actividad neutralizante de anticuerpos provenientes de ratones infectados y tratados con Transferon® .....	51

## ABREVIATURAS

% V	porcentaje de viabilidad
°C	grado Celsius
µg	microgramo
µL	microlito
µm	micrometro
Å	ångström
Ala	alanina
ANOVA	siglas en inglés, analysis of variance
Arg	arginina
ATCC	siglas en inglés, american type culture collection
AU	unidades de absorbancia
BCA	ácido bicinconínico
CBA	siglas en inglés, cytometric bead array
cm <sup>2</sup>	centímetro cuadrado
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CTL	siglas en inglés, cytotoxic T lymphocyte
DNA	siglas en inglés, deoxyribonucleic acid
DO	densidad óptica
DTH	siglas en inglés, delayed type hypersensitivity
dUTPasa	desoxiuridina 5'-trifosfato nucleótido hidrolasa
EBV	virus Epstein-Barr
EDL	extracto dializable de leucocitos
EDLs	extractos dializables de leucocitos
ELISA	siglas en inglés, enzyme-linked immunosorbent assay
EMEM	siglas en inglés, eagle's minimum essential medium
ENCB	escuela nacional de ciencias biológicas
et al.	del latín <i>et alii</i> , que significa 'y otros'
FBS	siglas en inglés, fetal bovine serum

fig.	figura
FITC	siglas en inglés, fluorescein isotiocyanate
FT	factor de transferencia
gB	glicoproteína B del virus herpes simplex tipo 1
gC	glicoproteína C del virus herpes simplex tipo 1
gD	glicoproteína D del virus herpes simplex tipo 1
gH	glicoproteína H del virus herpes simplex tipo 1
gL	glicoproteína L del virus herpes simplex tipo 1
Glu	glicina
Gly	ácido glutámico
GMP	siglas en inglés, good manufacturing practice
h	hora
HCMV	citomegalovirus humano
HHV-6A	herpesvirus humano 6A
HHV-6B	herpesvirus humano 6B
HHV-7	herpesvirus humano 7
HHV-8	herpesvirus humano 8 (herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi)
HSPG	siglas en inglés, heparan sulfate proteoglycan
HVEM	siglas en inglés, herpesvirus entry mediator
ICP	siglas en inglés, infected cell protein
IFNs	interferones
IFN- $\alpha$	interferón- $\alpha$
IFN- $\beta$	interferón- $\beta$
IFN- $\gamma$	interferón- $\gamma$
IgA	inmunoglobulina A
IgG	inmunoglobulina G
IgG1	inmunoglobulina subclase G1
IgG3	inmunoglobulina subclase G3
IgM	inmunoglobulina M
IL-4	interleucina-4

IL-6	interleucina-6
IL-10	interleucina-10
IL-12p70	interleucina-12p70
INF	infectado
IPN	instituto politécnico nacional
ITR	infectado tratado
kb	kilobase
kDa	kilodalton
MCP-1	siglas en inglés, monocyte chemotactic protein-1
Met	metionina
mg	miligramo
MHC	siglas en inglés, major histocompatibility complex
min	minuto
mL	mililitro
MNE	membrana nuclear externa
MNI	membrana nuclear interna
ng	nanogramos
NIT	no infectado tratado
NK	siglas en inglés, natural killer
nm	nanómetro
NON	no infectado
PBS	siglas en inglés, phosphate buffered saline
PE	siglas en inglés, phycoerythrin
pg	picogramo
PPD	derivado proteínico purificado de <i>M. tuberculosis</i>
PVRL1	siglas en inglés, poliovirus receptor-related 1
rpm	revolución por minuto
RP-UHPLC-UV	siglas en inglés, reversed-phase UHPLC with ultraviolet detection
SD	desviación estándar
SDS-PAGE	siglas en inglés, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel

	electrophoresis
SEC	siglas en inglés, size exclusion column
SEM	error estándar de la media
SE-UHPLC	siglas en inglés, size-exclusion UHPLC
SFB	suero fetal bovino
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TCID <sub>50</sub>	siglas en inglés, median tissue culture infective dose
TGN	siglas en inglés, trans-golgi network
TLRs	siglas en inglés, toll-like receptors
TNF	siglas en inglés, tumor necrosis factor
TNFRSF14	siglas en inglés, tumor necrosis factor receptor superfamily member 14
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral alfa
UDIBI	Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos
UFP	unidades formadoras de placa
UHPLC	siglas en inglés, ultra high performance liquid chromatography
VHS	virus herpes simplex
VHS-1	virus herpes simplex tipo 1
VHS-2	virus herpes simplex tipo 2
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VP	polipéptidos de virión
VZV	virus de la varicela-zoster
col.	colaboradores

## 1. RESUMEN

La familia *Herpesviridae* ha evolucionado para lograr la adaptación al ser humano, y una amplia diseminación. Los herpesvirus pueden diferir en los mecanismos que utilizan para manejar la respuesta inmune del huésped a la infección y en las manifestaciones clínicas de la enfermedad que causa. El Virus del Herpes Simplex tipo 1 (VHS-1) es un herpesvirus que tienen como huésped primario al humano. La respuesta inmunitaria innata frente al VHS-1 integra la producción de citocinas antivíricas y proinflamatorias, así como la activación de células NK, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. Así mismo, la infección por VHS-1 provoca una respuesta inmune humoral a nivel de anticuerpos circulantes.

En el mercado existen diversos medicamentos para el tratamiento de infecciones herpéticas, los cuales ejercen su actividad inhibiendo la replicación viral. Los Extractos Dializables de Leucocitos (EDLs) han mostrado un efecto protector e inmunomodulador en diversas enfermedades virales sin efectos adversos reportados. En la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) se produce un EDL denominado Transferon<sup>®</sup>, una mezcla heterogénea de péptidos con un peso molecular menor a 10 kDa, el cual ha demostrado efecto protector en infecciones herpéticas. En un modelo murino de infección herpética cutánea, Transferon<sup>®</sup> aumenta el porcentaje de supervivencia de ratones infectados con VHS-1, sin embargo, aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual tiene efecto protector. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si Transferon<sup>®</sup> tiene un efecto inmunomodulador a nivel sistémico en el modelo murino de infección herpética cutánea.

Mediante el análisis del perfil de citocinas en suero de ratones infectados con VHS-1 y tratados con Transferon<sup>®</sup> se observó una regulación en los niveles de interleucina-10 (IL-10), interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Adicionalmente, se evaluó la presencia de anticuerpos tipo IgG e IgM en los días 4, 7, 10, 14 y 18 post-infección. Se observó una respuesta menor en la producción de IgG totales al día 10 post-infección, y un aumento en los niveles de IgM durante el día 14 post-infección. Al evaluar *in vitro*

la capacidad de los anticuerpos para inhibir la actividad biológica de los virus (neutralización) con las muestras de suero obtenidas al día 20 post-infección se observó que los anticuerpos obtenidos tras el tratamiento con Transferon® 0.75µg/ratón tienen un potencial neutralizante que permite conservar la viabilidad de las células expuestas al virus.

En conclusión, pudimos observar que en un modelo de infección herpética cutánea Transferon® tiene un efecto significativo sobre la producción de citocinas, ya que disminuye los niveles de IL-10 e IL-6, mientras que aumenta los niveles de MCP-1 e IFN-γ. Sin embargo, el tratamiento con Transferon® no parece generar un incremento significativo en los niveles de anticuerpos tipo IgM e IgG totales, ni tampoco aumentar la actividad neutralizante de los anticuerpos.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 ¿Qué es un Extracto Dializable de Leucocitos (EDL)?

Un EDL es una mezcla heterogénea de péptidos que se obtiene del rompimiento de leucocitos y su posterior diálisis. Está compuesto de más de 200 moléculas altamente polares e hidrofílicas, cuyo peso molecular oscila entre 1 y 10 kDa, y pueden ser detectadas a longitudes de onda de 214 nm [1]. Algunos componentes del EDL poseen características inmunoestimuladoras y otros funcionan como inmunosupresores, por lo que se ha propuesto que tiene la capacidad de actuar como regulador de la respuesta inmunológica [2]. El EDL usualmente es administrado por vía oral, aunque la administración por las vías subcutánea e intramuscular ha mostrado ser igualmente efectiva, además no se ha reportado que su administración tenga efectos adversos [3].

La mezcla compleja de péptidos pequeños del EDL ha demostrado tener efectos terapéuticos sobre una amplia gama de enfermedades con un componente inflamatorio [4], como las infecciones virales, parasitarias, por hongos y bacterianas [5], enfermedades autoinmunes [6], inmunodeficiencias [7], alergias [8], y cáncer [9, 10].

#### 2.1.1 Antecedentes.

Landsteiner y Chase efectuaron por primera vez la transferencia de la respuesta inmunológica celular, utilizando cobayos sensibilizados con el Bacilo de Calmette y Guerin en 1942. Los leucocitos obtenidos de los animales sensibilizados eran inoculados en animales que no estaban sensibilizados, así estos adquirirían la capacidad de expresar la respuesta inmunológica celular de los donadores, dando positivo a la prueba de hipersensibilidad tardía cutánea (DTH). En estudios posteriores, Landsteiner y Chase, encontraron que la transferencia era mejor cuando se realizaba entre donadores y receptores que tenían alguna relación genética, y solo cuando se usaban células integras y viables [11].

En 1949, Lawrence demostró que la transferencia celular también era posible en humanos. Utilizó leucocitos viables intactos de un individuo con una intradermorreacción positiva a tuberculina y los transfirió a un individuo con una intradermorreacción negativa a tuberculina, provocando así que el segundo individuo (el receptor de las células), al ser retado con tuberculina, presentara una intradermorreacción positiva [12].

Años más tarde, en 1955 el mismo Lawrence demostró que la DTH podía ser establecida, utilizando extractos solubles de leucocitos provenientes de 20 mL de sangre total. En estos experimentos, Lawrence utilizó lisados de leucocitos de donadores que presentaban DTH positivas a antígenos tales como la coccidioidina, el toxoide diftérico, la proteína M del estreptococo y el PPD; en todos los casos los receptores eran individuos con DTH negativas a estos antígenos, 24 h después de haber recibido el extracto soluble, los receptores eran capaces de presentar reacciones de DTH positivas a los antígenos que eran reconocidos por los donadores y el efecto parecía ser antígeno específico [13].

Al componente activo de estos extractos celulares se le llamo “factor de transferencia” (FT). Lawrence dio a conocer que el FT podía pasar a través de una membrana de diálisis con un corte molecular menor a 20 kDa sin perder su capacidad biológica. Además, Lawrence supuso que estos dializados contenían solo una especie molecular (el FT), pero hoy en día se sabe que la presentación que originalmente se llamó FT es en realidad un conjunto de moléculas a las que ahora se les nombra “extracto dializable de leucocitos” o EDL [14]. Por lo que, EDL y FT en el estricto sentido de la palabra no son lo mismo, aunque en el ámbito comercial se refiere al producto indiscriminadamente con ambos conceptos.

El descubrimiento de la actividad biológica de los EDLs proporcionó las primeras evidencias de que las células inmunocompetentes son capaces de comunicarse efectivamente entre ellas con un lenguaje que consta de factores solubles diferentes a las inmunoglobulinas; siendo que para ese momento (los años 50's) no existían datos de la comunicación a través de citocinas [14].

Por su modo de acción y su tamaño molecular, es posible distinguir dos actividades del EDL: 1) no específica, la cual incrementa las actividades del sistema inmunológico como un adyuvante, y 2) específica, por ello solo aumenta la respuesta contra un antígeno determinado [14]. Esto último fue observado por Lawrence y sus colaboradores en 1983.

### 2.1.2 Aplicaciones terapéuticas de los EDLs.

Se han reportado múltiples beneficios en pacientes tratados con EDLs para el control y/o recuperación de ciertas inmunodeficiencias y enfermedades infecciosas [15], aunque la mejora del paciente también depende en parte del tipo de enfermedad, al igual que de la dosis que recibe como tratamiento. En algunas enfermedades se emplea el EDL sin aplicar otro fármaco, sin embargo en otros casos se requiere aplicar a la par del EDL algunos otros fármacos. Además, los efectos clínicos del EDL son independientes de la vía de administración [16].

Los EDLs se han empleado como adyuvante en el tratamiento de algunas infecciones virales, bacterianas, parasitarias, fúngicas, en alergias y enfermedades autoinmunes, con buenos resultados y sin efectos adversos reportados [1].

Entre algunos de los padecimientos en los que se ha empleado el EDL como tratamiento se encuentran:

- a) Inmunodeficiencias severas como el Síndrome de Wiskott-Aldrich, el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA/VIH) [17, 18].
- b) Enfermedades autoinmunes como el Síndrome de Behcet's [19].
- c) Enfermedades infecciosas por hongos (Coccidioidomicosis, Candidiasis) [20, 21, 22] virus (Herpes, Hepatitis) [23, 24, 25], parásitos (Leishmaniasis) [26] y bacterias (Tuberculosis pulmonar, Lepra e infecciones causadas por bacterias gram negativas y gram positivas) [27, 28, 29, 30].
- d) Hipersensibilidad (Asma bronquial, Dermatitis atópica refractaria y Alergias) [31, 32, 33, 34].

- e) Como terapia complementaria en neoplasias (Melanoma, Cáncer de estómago, de próstata, de pulmón, de colon, de mama, osteosarcoma) [35, 36, 37].
- f) Y otras, como uveítis y otitis [38, 39].

A pesar de los efectos clínicos positivos del EDL, su complejidad ha impedido la completa caracterización de sus componentes y principios activos, lo que exige el desarrollo y validación de métodos adecuados que analicen sus propiedades fisicoquímicas. Además, tales métodos permitirían establecer la relación entre las propiedades fisicoquímicas y las actividades biológicas esperadas del EDL [40].

Actualmente, en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) se produce un EDL que se comercializa con el nombre de Transferon®.

## **2.2 Transferon®**

### **2.2.1 Producción y control de calidad**

Transferon® es un EDL humano, el cual se obtiene a partir de la disrupción de leucocitos de sangre periférica de donadores sanos, seguido de una etapa de diálisis utilizando una membrana de 12 kDa. Finalmente, el producto permeado de 12 kDa se somete a una ultrafiltración para obtener la fracción por debajo de 10 kDa. El proceso de fabricación se realiza bajo Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) [40, 41, 42].

El uso de Transferon® está aprobado ante las autoridades regulatorias mexicanas de salud como un medicamento inmunomodulador, y es utilizado como tratamiento concomitante ante diversos padecimientos como enfermedades alérgicas, enfermedades infecciosas de origen viral y enfermedades autoinmunes (Tabla 1) [43].

**Tabla 1.** Enfermedades en las que está indicado Transferon®. Tomada y modificada de T. Homberg et al. Pharmacology & Pharmacy (2015) [43].

Enfermedades	Tipos
<b>Alérgicas</b>	Rinitis alérgica Asma Urticaria Dermatitis atópica
<b>Infecciosas de origen viral</b>	Infección de las vías respiratorias altas Infección por Virus del papiloma humano Infección por Virus de Herpes simplex Infección por Virus de la Hepatitis C Infección por Virus de Herpes Zoster
<b>Autoinmunes</b>	Artritis reumatoide Lupus eritematoso sistémico Enfermedad inflamatoria intestinal Enfermedad mixta del tejido conectivo Esclerosis múltiple Fibromialgia

De manera importante se ha demostrado que Transferon® es un medicamento seguro y tolerable para los pacientes que lo consumen. Los efectos adversos reportados de Transferon® incluyen dolor de cabeza, erupciones dérmicas, incremento en la sintomatología de la enfermedad, rinorrea, tos y fatiga; los cuales han sido clasificados como eventos adversos no graves [43]. Estos efectos adversos se han relacionado con la capacidad de Transferon® de inducir la producción de IFN- $\gamma$  (demostrado en modelos *in vivo* [44, 45] e *in vitro* [40]), ya que entre los efectos secundarios más comunes reportados a causa del IFN- $\gamma$  se encuentran: fiebre, fatiga, mialgia y dolor de cabeza [43].

La caracterización y el análisis de este bioterapéutico han sido fundamentales para determinar sus propiedades y con ello implementar controles adecuados de calidad, eficacia y seguridad para este producto [40, 41, 42]. Aunque Transferon® es una mezcla compleja de péptidos, se ha demostrado que sus componentes se presentan de manera consistente entre los lotes fabricados [40, 42], mediante pruebas internas estandarizadas para el control de calidad del producto (Tabla 2).

**Tabla 2.** Marco analítico de Transferon®.

ATRIBUTO	ENSAYO	METODOLOGÍA
<b>Identidad</b>	Identificación de la distribución de masa de Transferon®	SE-UHPLC
<b>Actividad biológica <i>in vitro</i></b>	Determinación de la producción de IFN- $\gamma$ en células Jurkat clona E6-1	ELISA
<b>Actividad biológica <i>in vivo</i></b>	Evaluación biológica de Transferon® oral con un modelo de sobrevida	Modelo murino de infección con VHS-1
<b>Inocuidad</b>	Determinación de Endotoxina bacteriana	Uso del lisado de amebocitos del <i>Limulus</i>

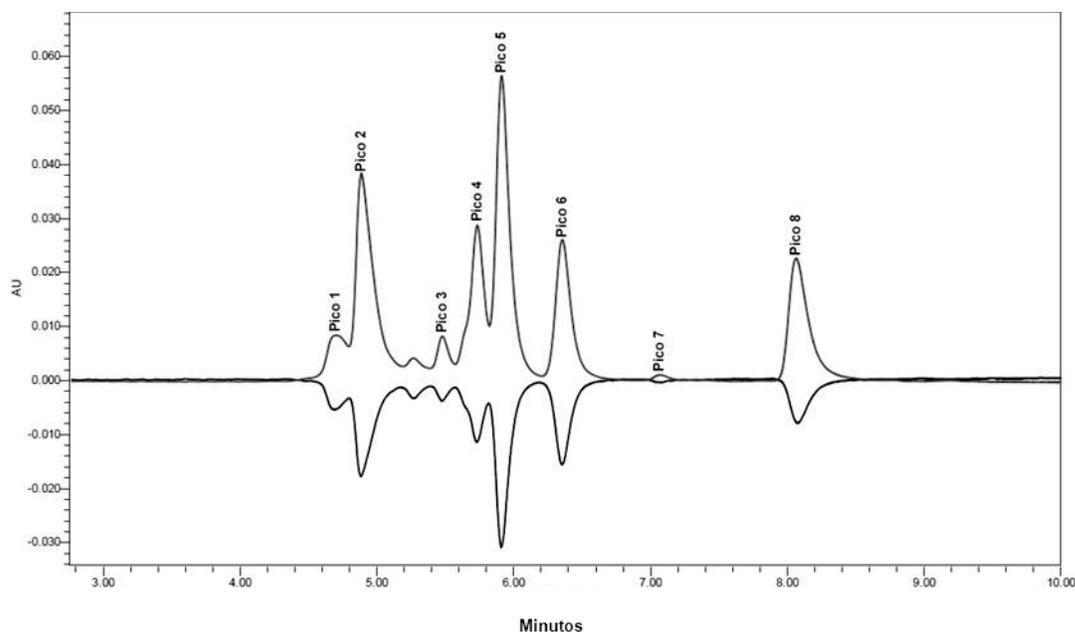
### 2.2.2 Caracterización fisicoquímica.

Debido a que Transferon® es una mezcla de péptidos, se requiere una caracterización fisicoquímica suficiente que proporcione evidencia de su composición y variabilidad [40]. Para esta caracterización se han empleado técnicas analíticas comúnmente aplicadas a péptidos y proteínas, como electroforesis, análisis de contenido de aminoácidos, cromatografía e inclusive espectrometría de masas, las cuales han ayudado a establecer algunos de los parámetros de calidad de Transferon® [42].

Como parte de la caracterización fisicoquímica, se ha determinado el perfil electroforético de Transferon® por SDS-PAGE para determinar el tamaño molecular de los componentes peptídicos del producto. Empleando esta metodología, se obtuvo un perfil electroforético de dos bandas donde las poblaciones de péptidos exhiben una masa molecular de aproximadamente 10 kDa, resultando ser un perfil homogéneo entre 10 lotes analizados. Aunque mediante SDS-PAGE no fue posible detectar componentes más pequeños de Transferon®, debido a la baja resolución y sensibilidad, esta técnica puede utilizarse como una prueba simple de identidad primaria [42].

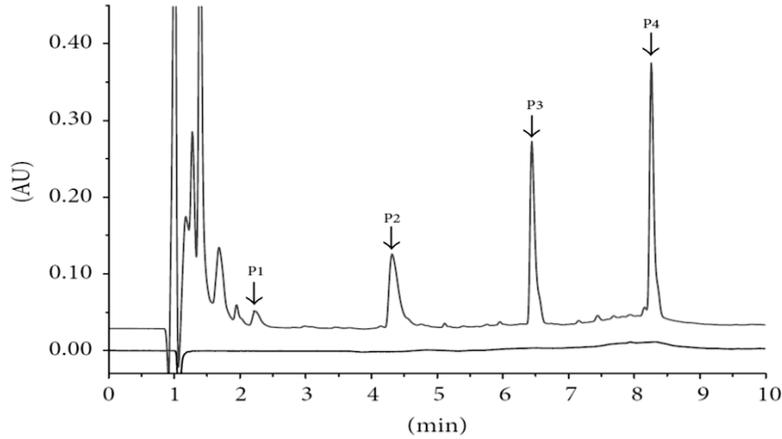
También, se han desarrollado métodos cromatográficos para la caracterización fisicoquímica de Transferon®. Mediante cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UHPLC) y una columna de exclusión por peso molecular (SEC) se

determina la identidad de los lotes de Transferon®. Esta prueba consiste en comparar el perfil cromatográfico de los lotes recién fabricados con el patrón del estándar de Transferon®, el cual fue definido por haber cumplido de manera satisfactoria los estudios de calidad requeridos para la liberación de producto. Ambos perfiles deben mostrar 8 picos característicos, los cuales son reproducibles lote a lote (fig. 1) [40].



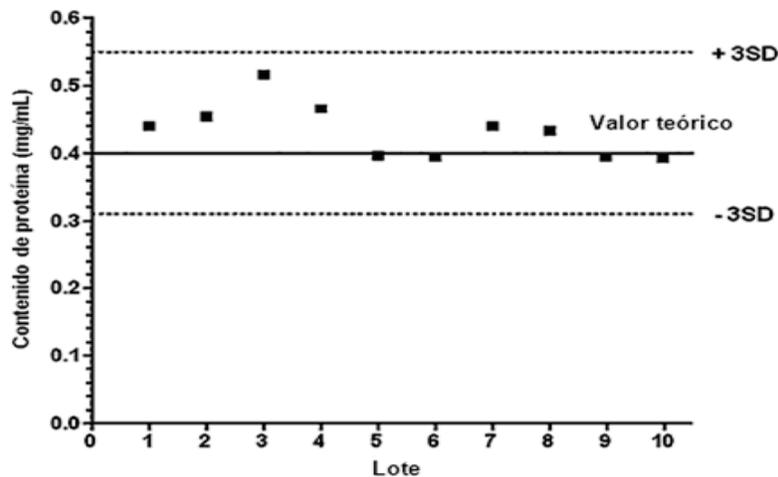
**Figura 1. Perfil cromatográfico de Transferon® por SE-UHPLC.** Ensayo de identidad representativo, se muestra la comparación de uno de los lotes de Transferon® (arriba) contra el estándar de Transferon® (abajo). AU: Unidades de Absorbancia. Tomada y modificada de Medina-Rivero E. et al. J Pharm Biomed Anal (2014) [40].

Mediante cromatografía de líquidos de ultra alta resolución en fase reversa con detección ultravioleta (RP-UHPLC-UV) se determinó la polaridad de los componentes de Transferon®. Utilizando esta técnica, se obtuvo un perfil de las poblaciones de péptidos de este EDL, en el cual se observan 4 picos principales de baja polaridad (fig. 2). Al aplicarse esta metodología en 10 lotes se observó que el patrón se reproduce consistentemente [42].



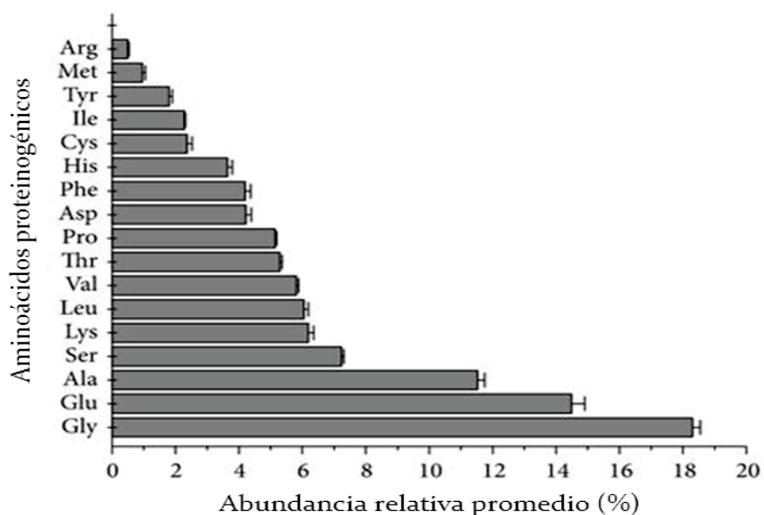
**Figura 2. Perfil cromatográfico de Transferon® por RP-UHPLC-UV.** Comparación entre muestra matriz (abajo) y el lote 15A01 de Transferon® (arriba). AU: Unidades de Absorbancia. Tomada y modificada de Medina-Rivero E. et al. BioMed Research International (2016) [42].

Además, se demostró que la producción de Transferon® es homogénea tomando en cuenta el contenido de proteína entre lotes (fig. 3). A partir de un análisis de 10 lotes de Transferon®, se determinó que el contenido de proteína promedio es de 0,433 mg/mL, lo que representa un 108,2% con respecto al valor teórico esperado (0,40 mg/mL) de proteína total (2 mg de los péptidos en 5 mL de excipiente), porcentaje que se ajusta a los criterios establecidos en las especificaciones de Transferon® (0,34 a 0,46 mg/mL) [40].



**Figura 3. Análisis del contenido de proteína entre lotes de Transferon®.** La concentración de proteína, cuantificada por el método de ácido bicinonínico (BCA), se especifica para cada lote. Se muestra el valor teórico (línea continua) y el intervalo de  $\pm 3$  SD (líneas punteadas). SD: Desviación estándar. Tomada y modificada de E. Medina-Rivero et al. J Pharm Biomed Anal (2014) [40].

Recientemente, se reportó la composición de aminoácidos de Transferon® mediante un método de derivatización en 10 lotes de Transferon®. La identidad de los aminoácidos se obtuvo mediante cromatografía en fase reversa y la comparación de los perfiles de separación de los 10 lotes analizados respecto al mostrado por una mezcla estándar de aminoácidos proteínogénicos. Esta comparación permitió identificar 17 aminoácidos proteínogénicos en los lotes de Transferon®, siendo el aminoácido más abundante Gly (18,30%), mientras que Arg (0,50%) fue el menos abundante (fig. 4). El perfil de la composición de aminoácidos y la abundancia relativa media de los 17 aminoácidos proteínógenos fueron altamente reproducibles en los 10 lotes de Transferon® analizados [42].

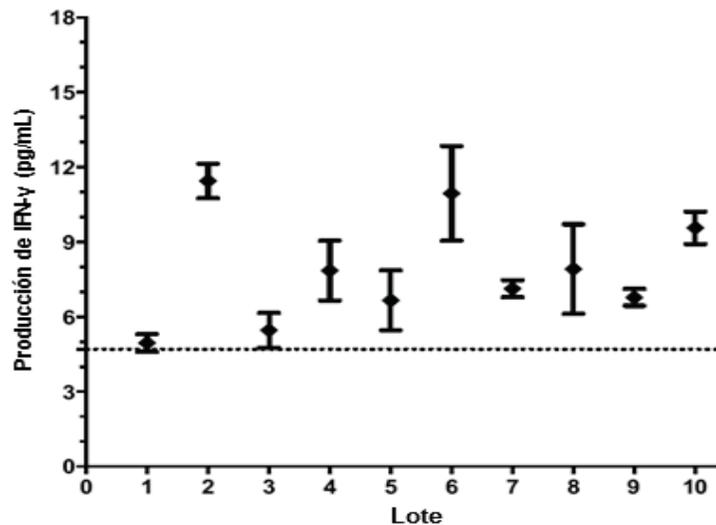


**Figura 4. Abundancia relativa promedio de aminoácidos proteínogénicos en 10 lotes de Transferon®.** Gly (18,30%), Glu (14,49%), y Ala (11,53%) son los aminoácidos más abundantes en las muestras de Transferon®, mientras que Met (0,95%) y Arg (0,50%) son los menos abundantes. Tomada y modificada de Medina-Rivero E. et al. BioMed Research International (2016) [42].

Con estas técnicas analíticas se ha demostrado que la proporción y la naturaleza fisicoquímica de los componentes de Transferon® son altamente reproducibles entre lotes.

### 2.2.3 Caracterización biológica y eficacia clínica

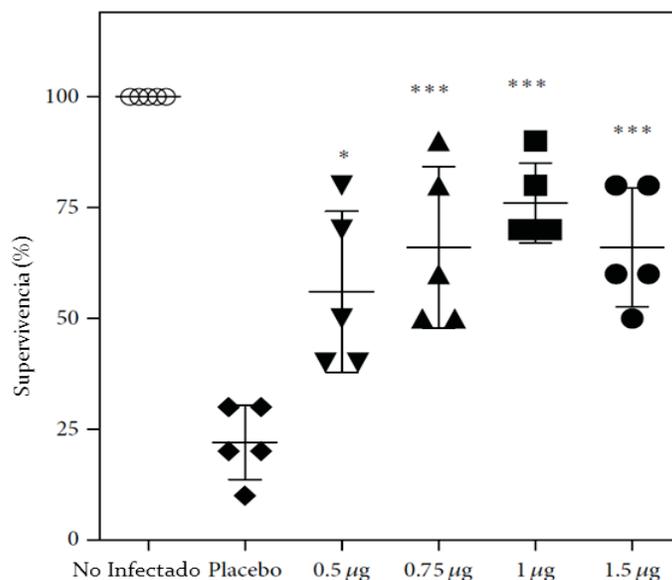
Para analizar la actividad biológica *in vitro* se determina la capacidad de Transferon® para inducir la producción de IFN- $\gamma$  en células Jurkat clona E6-1 (linfocitos T). Los resultados obtenidos han mostrado que los componentes de Transferon® son capaces de inducir la producción de IFN- $\gamma$  en al menos 5 pg/mL en 10 lotes evaluados (fig. 5) [40].



**Figura 5. Efecto de Transferon® en la secreción de IFN- $\gamma$  por células Jurkat.** Las células son tratadas durante 72 h con diferentes lotes de Transferon®, y se cuantifica en los sobrenadantes la concentración de IFN- $\gamma$  por ELISA. Cada experimento incluyó un control positivo (25  $\mu$ g/mL de concanavalina A) y un control negativo (vehículo), los cuales no se muestran. Todos los lotes inducen la secreción de IFN- $\gamma$  por encima del límite de detección del método (línea discontinua). Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM (por triplicado). SEM: Error estándar de la media. Tomada y modificada de E. Medina-Rivero et al. J Pharm Biomed Anal (2014) [40].

Asimismo, y como parte de los requisitos de control de calidad para la liberación de lotes de Transferon®, en la Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI) se estandarizó y validó un segundo método para determinar la actividad biológica *in vivo* de Transferon®. Empleando un modelo murino de infección cutánea con el Virus Herpes Simplex tipo 1 (VHS-1) se evaluó la actividad de 27 lotes de Transferon®. Los resultados demostraron que todos los lotes probados aumentan la supervivencia de los ratones infectados con VHS-1, a un 59,6% en los ratones infectados con VHS-1 co-administrados con Transferon®,

con respecto al grupo control infectado con VHS-1 pero que no recibió Transferon® (20,9%). Con este método se evidenció una eficacia similar entre los lotes probados de Transferon® (fig. 6) [41].



**Figura 6. Validación del modelo murino de herpes para la evaluación de la actividad biológica de Transferon®.** Supervivencia inducida por cinco lotes diferentes de Transferon® que se evaluaron durante un protocolo de validación. Todos los lotes de Transferon® con cada una de las dosis administradas muestran una mejora en la sobrevivencia de los ratones en comparación con el grupo infectado y tratado con placebo (prueba de Bonferroni t; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). Tomada y modificada de N. Salinas-Jazmín et al. J Immunol Res. (2015) [41].

Los EDLs, incluido Transferon®, han demostrado efectos benéficos en pacientes con infecciones causadas por herpesvirus, reportándose efectos benéficos en pacientes con herpes ocular [46], herpes genital y herpes labial [47], con herpes zoster [44], en quienes disminuye el tiempo necesario para su recuperación y el número de recaídas, en comparación con pacientes que reciben los tratamientos habituales.

La eficacia clínica de Transferon® se ha determinado en pacientes con infecciones por herpes zoster, como lo describe el trabajo realizado por Estrada Parra y col. [44], donde compararon el efecto terapéutico de Transferon® contra el de Aciclovir para el tratamiento de herpes zoster en un estudio doble ciego aleatorizado. En este estudio, una unidad de Transferon® fue administrada cada 24 h por 7 días

consecutivos. Se monitoreo por 21 días la evaluación clínica de la enfermedad y se determinaron las concentraciones séricas de IFN- $\gamma$ , 14 días después de la primera aplicación del tratamiento. Los resultados obtenidos, demostraron que los pacientes tratados con Transferon<sup>®</sup> resuelven en menor tiempo el dolor característico de este padecimiento en comparación con los pacientes que fueron tratados únicamente con Aciclovir. Los pacientes tratados con Transferon<sup>®</sup> mostraron una tendencia en un aumento en las concentraciones séricas de IFN- $\gamma$ , lo cual fue relacionado con el efecto terapéutico encontrado.

Derivado de la evidencia clínica, en la actualidad se usa de manera concomitante Aciclovir y Transferon<sup>®</sup> para el tratamiento de infecciones por herpes.

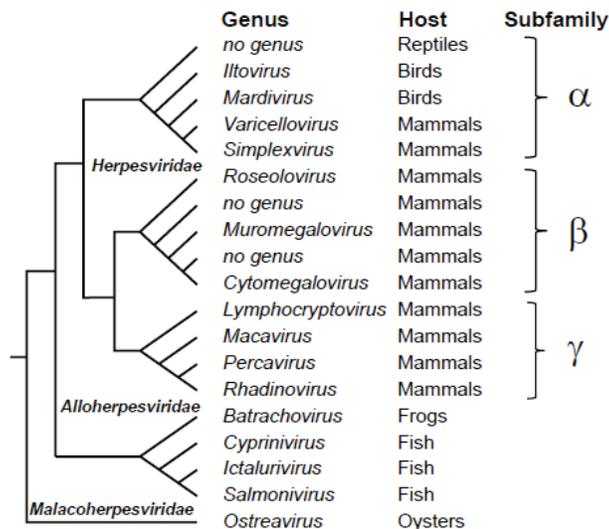
## **2.4 Introducción a la Familia *Herpesviridae***

### 2.4.1 Descripción general

Los herpesvirus históricamente se han definido con base en la arquitectura del virión. Un virión típico consiste de un núcleo o *core* que contiene DNA de doble cadena lineal, que va desde 124 hasta 295 kb de longitud; una cápside icosaédrica de aproximadamente 125 nm de diámetro que contiene 161 capsómeros, más una estructura capsomérica que sirve como portal para el empaquetado y la liberación del genoma viral (el complejo del núcleo y la cápside se denomina nucleocápside); el tegumento, un material amorfo algunas veces asimétrico, el cual rodea la nucleocápside; y una envoltura que contiene en su superficie glicoproteínas virales [48].

Originalmente los herpesvirus se encontraban clasificados dentro de una sola familia, sin embargo, con la disponibilidad de los datos que se generaron respecto a la extensa secuencia de nucleótidos, se propició el establecimiento de un nuevo orden taxonómico, los *Herpesvirales* (fig. 7), que abarcan tres familias de virus: los herpesvirus de mamíferos, aves y reptiles (*Herpesviridae*), los herpesvirus de

peces y anfibios (*Alloherpesviridae*) y los herpesvirus de bivalvos (*Malacoherpesviridae*) [48].



**Figura 7. Principales relaciones filogenéticas y subunidades taxonómicas dentro del orden *Herpesvirales*.** El esquema muestra patrones de ramificación, no distancias evolutivas. Tomada de Knipe D. and Howley P. *Fields virology* 6th ed. Vol. 2 (2013) [48].

Los herpesvirus están ampliamente diseminados en la naturaleza, y puesto que algunos herpesvirus infectan naturalmente a más de una especie, es probable que el número de estos supere los más de doscientos que se encuentran identificados. Se han reconocido nueve herpesvirus que tienen al humano como su huésped primario: virus del herpes simplex tipo 1 (VHS-1), virus del herpes simplex tipo 2 (VHS-2), citomegalovirus humano (HCMV), virus de la varicela-zoster (VZV), virus Epstein-Barr (EBV), herpesvirus humano 6A, 6B y 7 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7), y herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (también conocido como HHV-8) [48].

Con respecto a sus propiedades biológicas, los herpesvirus difieren en muchas de estas, algunos tienen una amplia variedad de células huésped, se multiplican rápidamente y destruyen con rapidez las células que infectan (por ejemplo, VHS-1, VHS-2). Otros tienen un rango estrecho de células huésped (EBV, HHV6) o un ciclo replicativo largo (HCMV). Los herpesvirus pueden diferir sustancialmente con respecto a los detalles de los mecanismos que utilizan para manejar la respuesta

del huésped a la infección y en los mecanismos patogénicos y manifestaciones clínicas de la enfermedad que causa [48].

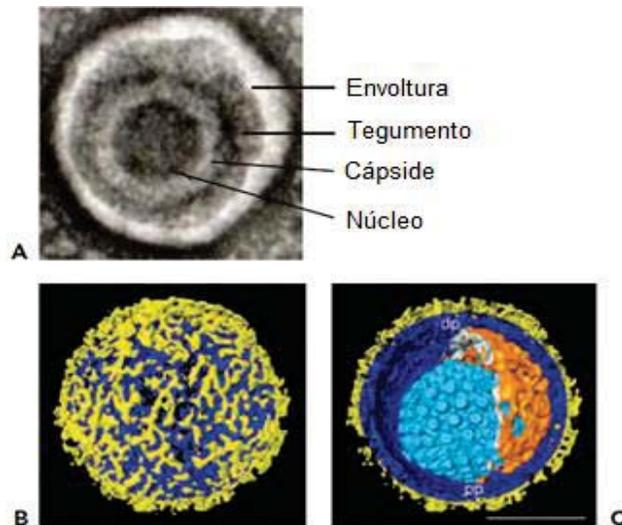
## **2.5 Virus Herpes Simplex (VHS)**

El VHS fue el primero de los herpesvirus humano en ser descubierto, y se encuentra entre los más investigados. Sus propiedades biológicas son de interés, en particular su capacidad para causar diversas infecciones, permanecer latente en su huésped de por vida y reactivarse causando lesiones cerca o en el sitio de la infección inicial. Además, se utiliza como modelo y herramienta para el estudio de la translocación de proteínas, conexiones sinápticas en el sistema nervioso, estructura membranal, regulación de genes, terapia génica, terapia del cáncer, e innumerables problemas biológicos, tanto generales de los virus como específicos para VHS. Durante años, su tamaño y complejidad presentaron un obstáculo formidable a la intensiva investigación, teniendo que pasar más de 40 años desde su aislamiento hasta que se demostró que existían dos serotipos del VHS: VHS-1 y VHS-2 [48].

### **2.5.1 Estructura del virión.**

Partiendo del interior al exterior, el virión del VHS consta de cuatro elementos: 1) un núcleo que contiene el DNA viral de doble cadena lineal, 2) una cápside icosaédrica que rodea el núcleo, 3) una capa proteínica, en gran parte no estructurada que contiene proteínas involucradas en inducir la transcripción viral en el núcleo e inhibir la producción de las proteínas celulares [48, 49], llamada tegumento que rodea la cápside, y 4) una bicapa lipídica externa (envoltura) que presenta glicoproteínas virales en su superficie (fig. 8 A). Los primeros estudios definen la estructura del virión VHS a través de microscopía electrónica y análisis bioquímicos de los componentes del virión. Sin embargo, estudios recientes con criomicroscopía electrónica han ayudado a determinar la estructura de la nucleocápside, a una resolución de 8.5 Å. Por otro lado, el análisis más detallado

de todo el virión utilizando tomografía crioelectrónica define su estructura hasta los 7 nm de resolución (figs. 8 B y 8 C) [48].



**Figura 8. Estructura del virión del VHS.** (A) Micrografía electrónica de un virión del VHS-1 teñida negativamente. En la imagen se indica lo que es la envoltura, el tegumento, la cápside y el núcleo. (B) Imagen de la superficie del VHS obtenida con tomografía crioelectrónica. Se muestra en color azul la envoltura, y en color amarillo picos de glicoproteína. (C) Vista del interior del virión obtenida con tomografía crioelectrónica (corte transversal). Se muestra en color azul claro la cápside, en color naranja se presenta el tegumento, en color azul oscuro la envoltura, y en color amarillo picos de glicoproteína. Tomada y modificada de Knipe D. and Howley P. Fields virology 6th ed. Vol. 2 (2013) [48].

Los primeros estudios con viriones purificados del VHS-1 sugirieron que contienen más de 30 proteínas diferentes, que fueron designadas como polipéptidos de virión (VP) y se les asignó un número seriado [50, 51]. De las aproximadamente 30 conocidas, ya que hay otras 10 que se sospecha son VP, al menos 11 están en la superficie del virión (accesibles a anticuerpos) y al menos 10 están glicosiladas [48].

Las proteínas que no forman parte del virión se han encontrado en las células infectadas y participan principalmente en dos tipos de funciones: 1) en la síntesis del DNA viral y el ensamblaje del virus infectivo y 2) en funciones diseñadas para permitir que el virus se replique en una gran variedad de células en diferentes condiciones [52]. A este grupo de proteínas que no forman parte estructural del virión se les ha nombrado proteínas de células infectadas (infected-cell protein o

ICP), y se les ha asignado un número consecutivo en función de su movilidad electroforética. Sin embargo, algunas proteínas del virión también tienen una nomenclatura como ICP (por ejemplo, ICPI8 corresponde a VP10 o la ICP39 es VP22) [51]. A pesar de que esta clasificación está hecha en base a la movilidad electroforética y por ende al peso molecular aparente de la proteína, es muy difícil identificarlas ya que su migración está influenciada por factores tales como la cepa viral, la célula huésped, las rondas de replicación y las condiciones del ensayo [49, 52, 53].

### 2.5.2 Replicación viral.

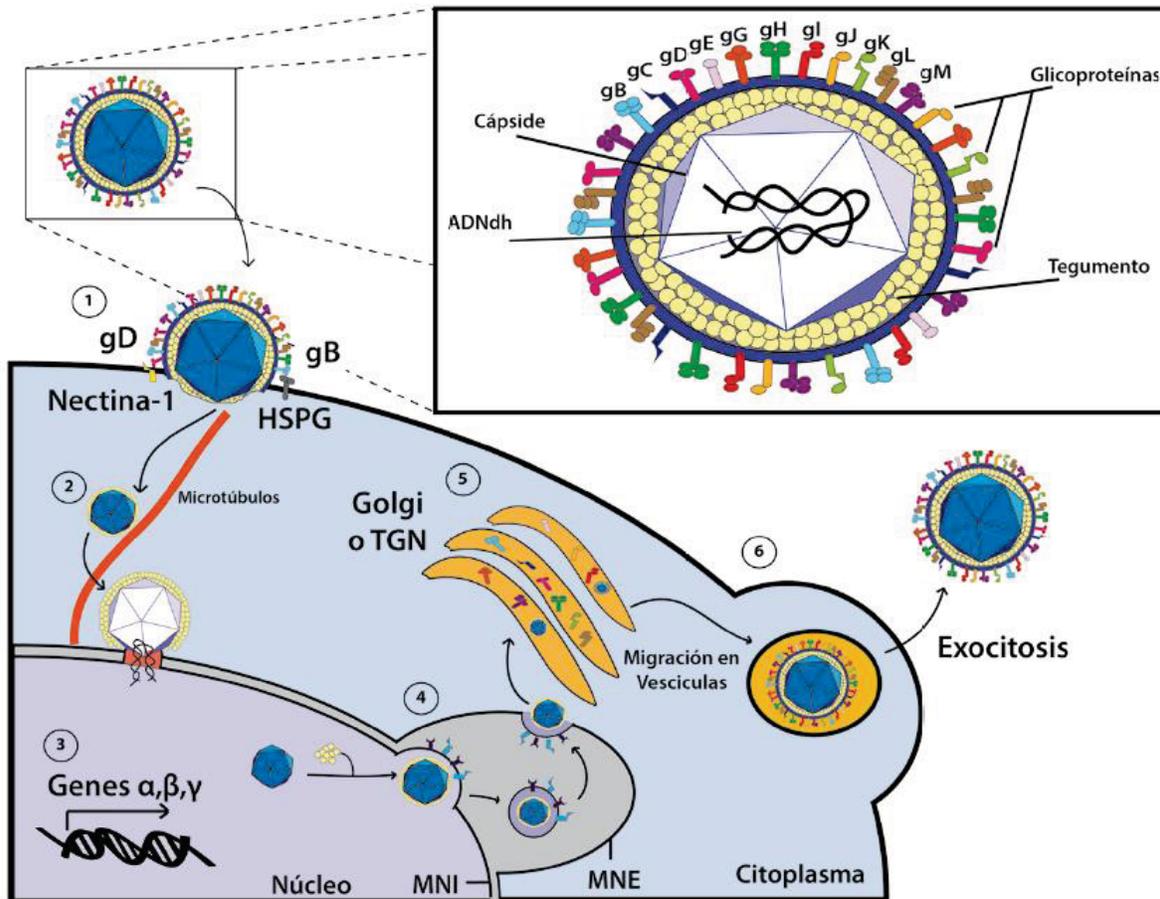
El ciclo infectivo de los VHS comienza con la unión del virus a la membrana de la célula hospedera y la fusión del virión. Estos pasos están mediados principalmente por cuatro glicoproteínas virales (gB, gD, gH y gL, además de gC para VHS-1), las cuales entran en contacto directo con receptores específicos presentes en la célula blanco y que luego desencadenan la fusión del virus. El primer paso es la unión de gB a proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) en la superficie de la célula hospedera. El rol de esta proteína puede ser sustituido por gC en VHS-1. El siguiente paso, consiste en la interacción específica de gD con uno de sus dos receptores principales: nectina-1 (*PVRL1; poliovirus receptor-related 1*) o HVEM (*herpesvirus entry mediator, TNFRSF14*) (fig. 9), permitiendo un mejor anclaje del virión a la superficie de la célula blanco y la activación de las otras dos glicoproteínas virales de superficie necesarias para activar el proceso de fusión de membranas (gH y gL). La interacción de gD con cualquiera de estos dos receptores induce modificaciones estructurales en gD que a su vez conducen a la activación del complejo gH/gL en la superficie viral promoviendo la capacidad de fusión de gB [54].

Luego de la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula blanco, proteínas del tegumento dirigen la cápside viral hacia el núcleo de la célula hospedero a través de microtúbulos (fig. 9). Aquí, el DNA viral es inyectado al núcleo a través de poros nucleares y el VHS inicia la expresión secuencial de sus

genes, comenzando con la transcripción y traducción de genes virales *inmediatamente tempranos* (*immediate early* o  $\alpha$ ). Los productos de estos genes juegan roles importantes en el control de la célula infectada e inhiben algunos mecanismos anti-virales tempranos de las células. Posteriormente, sigue la expresión de genes *tempranos* (*early* o  $\beta$ ) involucrados en la replicación del material genético del virus y los pasos regulatorios de esta replicación. Durante este proceso, el material genético del virus es replicado a través de un intermediario circular transitorio conocido como *<rolling circle>*, el que se encuentra regulado por la actividad de ICP0; el genoma lineal resultante es luego encapsidado en el núcleo de la célula infectada. Finalmente, el virus promueve la transcripción y traducción de genes que se expresan más tardíamente y se denominan *tardíos tempranos* (*early late* o  $\gamma$ -1); estos genes están involucrados principalmente en la expresión de proteínas estructurales del virión [54].

El ensamblaje de la cápside viral de VHS con el tegumento y glicoproteínas de superficie del virión en células infectadas involucra múltiples pasos. En este proceso, la cápside es secuencialmente envuelta y desenvuelta en membranas del núcleo hasta la superficie celular, pasando por compartimentos celulares internos tales como el espacio perinuclear, el citoplasma y el aparato de Golgi. En el aparato de Golgi la cápside adquiere su manto lipídico y glicoproteínas de superficie, formando así un virión infectante. Este virión luego es transportado a través de la vía trans-Golgi (*trans-Golgi network*; TGN) a la superficie celular en vesículas donde es liberado al medio extracelular (fig. 9) [54].

Esta liberación de viriones al medio extracelular ayuda en la diseminación del virus. Además, los VHS se caracterizan por diseminarse a través de interacciones célula-célula adyacente. Este proceso denominado sinapsis virológica, debido a que la distancia entre una célula infectada y una no-infectada es pequeña, involucra el direccionamiento de componentes virales a la interfase de células que interactúan entre sí, siendo utilizado tanto para la propagación del virus entre células epiteliales como para la infección de células inmunes como linfocitos T [54].



**Figura 9. Estructura y ciclo de replicación del VHS.** La infección de una célula blanco es un proceso que involucra al menos cuatro glicoproteínas virales en la superficie del virión. (1) La glicoproteína B (gB) une proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) en la superficie celular. Para VHS-1, la glicoproteína gC también participa en este proceso. Luego, gD une nectina-1 o HVEM en la superficie celular desencadenando la activación del complejo gH/gL y la fusión de las membranas del virus y la célula por gB. (2) Dentro de la célula, la cápside viral es transportada al núcleo de la célula mediante la interacción de proteínas del tegumento con microtúbulos. (3) Una vez en el núcleo, los genes virales se expresan secuencialmente con la transcripción de genes inmediatamente tempranos ( $\alpha$ ), tempranos ( $\beta$ ) y tardíos ( $\gamma$ ). (4) La producción de virus a su vez requiere la replicación del material genético viral el cual es encapsidado en el núcleo y recubierto parcialmente por proteínas del tegumento que median la salida de la cápside hacia el espacio perinuclear a través de la membrana nuclear interna (MNI) y la membrana nuclear externa (MNE). (5) Este luego es liberado al citoplasma donde es re-invasado en el aparato de Golgi donde adquiere sus glicoproteínas de la superficie. (6) Finalmente, el virión abandona la célula por exocitosis. Tomada de Retamal-Díaz A. et al. *Rev Chilena Infectol* (2015) [54].

### 2.5.3 Epidemiología.

El VHS-1 comúnmente conduce a lesiones orofaciales y oculares primarias, las cuales suelen ser recurrentes. Las lesiones epiteliales que causa VHS-1 son el resultado de la producción masiva de viriones con una respuesta inmune concomitante. La infección primaria es seguida por la propagación de las partículas virales a las neuronas sensoriales (especialmente a los ganglios del trigémino) con el establecimiento de latencia. La reactivación de la infección puede tener lugar de forma esporádica, causando una nueva infección productiva en los tejidos inervados por las neuronas que albergaban al virus [55].

Aunque la seroprevalencia del VHS-1 en la población general varía del 60% al 90% dependiendo del país y la edad, las infecciones por VHS-1 son en su mayoría asintomáticas. Sin embargo, el VHS-1 puede dar lugar a lesiones labiales recurrentes en el 15% al 45% de la población adulta, encefalitis en 1 por cada 500,000 personas por año, y queratitis corneal con una incidencia anual de 30 casos por cada 100,000 personas [55].

### 2.5.4 Respuesta inmunológica del huésped.

Tanto la respuesta inmune innata como la respuesta inmune adaptativa median la resistencia del huésped a una infección por virus. Elementos del sistema inmune innato, especialmente interferones de tipo I, influyen fuertemente en el resultado clínico de una infección viral. Muchos virus han desarrollado mecanismos para inhibir o evadir la respuesta inmune innata, lo que indica la importancia de esta defensa en la limitación de la infección. La respuesta inmune innata media efectos importantes durante la fase de inducción de una respuesta inmune y puede influir en la magnitud y la composición de la respuesta inmune adaptativa [48].

Históricamente, los modelos animales proporcionan la mayor parte de los datos que abordan la relación entre la defensa del huésped y la patogénesis de la enfermedad. Los antecedentes genéticos del huésped, la respuesta inmune innata, los macrófagos, las células NK, las subpoblaciones específicas de células

T, los anticuerpos específicos, y la respuesta de citocinas son importantes defensas del huésped contra las infecciones por VHS [48].

En reacción ante una infección viral, la respuesta inicial es la síntesis y secreción de IFNs tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ). Los IFNs inducen un estado antiviral en las células infectadas y sus alrededores. Más específico a la infección por VHS, el IFN- $\alpha$  participa en la inhibición de la expresión de los genes inmediatamente tempranos. Así, el mecanismo antiviral afecta directamente en la síntesis de proteínas virales [48].

Además de una actividad antiviral, los IFNs son inmunomoduladores potentes. Estos median la activación de macrófagos y células NK, activan linfocitos T citotóxicos (CTLs), inducen la expresión de moléculas del MHC de clase I y II, además estimulan la secreción de citocinas, y promueven la inflamación local [48].

Las células NK constituyen la primera línea de defensa contra la infección ya que tienen la capacidad de lisar las células infectadas antes de que se genere inmunidad por células T específicas al virus. Otras células mononucleares, tales como macrófagos, se reclutan al sitio de infección y tras su activación, liberan mediadores solubles tales como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) e interleucinas que favorecen un estado inflamatorio. Los macrófagos juegan un papel importante en la mediación de la toxicidad celular dependiente de anticuerpos para la eliminación de las células infectadas por los virus y la presentación de antígenos [48].

Ante la infección inicial con el VHS se produce una respuesta inmune humoral rápida con la aparición de anticuerpos de tipo IgA que se encuentran predominantes en la mucosa y pueden ser detectados a partir del tercer día de infección, alcanzando un máximo dentro de las primeras 6 semanas. También, pueden ser detectados después de la infección anticuerpos de tipo IgM e IgG, la aparición de anticuerpos de subclases IgG1 e IgG3 se presenta seguido a la de anticuerpos IgA. Posteriormente, se generan anticuerpos contra proteínas estructurales del virus, dirigido contra gD, gB, ICP4, gE, gG-1 o gG-2, y gC [48].

## **2.6 El efecto de Transferon® en la infección por VHS.**

El tratamiento de elección ante infecciones por VHS consiste en medicamentos antivíricos, como Aciclovir y compuestos relacionados, los cuales inhiben la replicación del virus. Sin embargo, estos medicamentos presentan efectos adversos y no eliminan el dolor característico ocasionado por la respuesta inflamatoria en el sitio de la infección. Por lo que, se han establecido alternativas en el tratamiento utilizando inmunomoduladores que favorecen la defensa antiviral temprana del sistema inmune y la regulación de la respuesta inflamatoria [56].

La evidencia científica respalda el uso de Transferon® y Aciclovir como tratamiento concomitante ante infecciones por herpes [44], y se propone que Transferon® favorece la respuesta inmune ante la infección, sin embargo aún no están bien esclarecidos estos mecanismos.

Como se describió anteriormente, todos los lotes producidos de Transferon® presentan de manera constante un efecto protector ante la infección por VHS-1 en un modelo murino, sin embargo se desconocen los mecanismos de modulación de la respuesta inmune en este modelo de estudio. Es por ello que en este trabajo utilizando un modelo murino de infección con VHS-1 nos proponemos evaluar el efecto de Transferon® sobre la modulación de la producción de citocinas involucradas en la regulación de la respuesta inflamatoria y actividad antivírica, específicamente IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL-10 e IL-6. De igual manera, pretendemos evaluar el efecto de Transferon® sobre la modulación de la producción de anticuerpos y la actividad neutralizante de estos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado la eficacia clínica de Transferon® y otros EDLs en pacientes infectados por herpes, en quienes disminuye el dolor característico de esta enfermedad en un menor tiempo en comparación a los pacientes que reciben los tratamientos habituales. También, se ha demostrado mediante un modelo murino de infección que Transferon® aumenta la sobrevivencia de ratones infectados con VHS-1 en comparación al grupo control tratado con placebo, siendo este un efecto constante lote a lote. Con ello, el modelo resulta apropiado para evidenciar los mecanismos por los cuales Transferon® induce protección ante infecciones virales como la ocasionada por VHS-1. En este trabajo nos proponemos evaluar el efecto de Transferon® sobre la modulación de citocinas involucradas en la regulación de la respuesta inflamatoria (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12). Además de evaluar el efecto de Transferon® sobre la modulación de anticuerpos, y determinar la actividad neutralizante de estos anticuerpos.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si Transferon® modula los niveles de citocinas inflamatorias y de anticuerpos con actividad neutralizante entonces contribuye al aumento de la supervivencia en los animales infectados que fueron tratados.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

- Evaluar el efecto inmunomodulador de Transferon® a partir del suero de ratones infectados con VHS-1 y tratados, mediante el análisis de un perfil de citocinas involucradas en la regulación de la respuesta inflamatoria, la variación en los niveles de anticuerpos tipo IgM e IgG totales, y la actividad neutralizante de anticuerpos.

### **5.2 Objetivos particulares**

- i. Cuantificar citocinas en el suero de los diferentes grupos de estudio mediante un método de citometría de flujo.
- ii. Cuantificar el contenido de anticuerpos de tipo IgG e IgM en el suero proveniente de los diferentes grupos mediante ELISA.
- iii. Determinar el título viral de VHS-1 a través de TCID<sub>50</sub> y estandarizar el ensayo de neutralización viral.
- iv. Evaluar la actividad neutralizante de los anticuerpos presentes en los sueros de ratones infectados y tratados.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en la Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos de la ENCB, del IPN. Esta unidad cuenta con un Sistema de Gestión de la Calidad y por ende un sistema documental. Por lo que, a lo largo de la descripción de cada uno de los métodos realizados se mencionan protocolos y/o instructivos que se siguieron durante la ejecución de los ensayos.

### 6.1 Modelo de sobrevida

Para evaluar la actividad biológica de Transferon<sup>®</sup> se emplearon ratones de la especie *Mus musculus*, cepa BALB/c machos, de 4 a 6 semanas y peso de 14 a 18 gramos. Previo al ensayo, los animales se mantuvieron en condiciones controladas, sin manipulación y libres de patógenos en el bioterio, durante 24 h con agua y alimento <ad libitum>, permitiendo así la aclimatación y la disminución de estrés provocado por el transporte.

#### 6.1.1 Infección con VHS-1.

Transcurrido el tiempo de aclimatación, se establecieron los grupos de trabajo para cada experimento (véase tablas 3 y 4). Posteriormente, se procedió a rasurar el dorso de los ratones, de tal manera que la parte posterior quedara sin pelo para realizar la infección de los animales con el VHS-1.

Para llevar a cabo la infección, primeramente se administró por vía intraperitoneal 10 µL de pentobarbital por cada gramo de peso del animal (una dosis de 3.5 – 4.5 mg/Kg) como anestésico. Después, en un portaobjetos se colocó una gota de pegamento de secado instantáneo ubicando este en la parte rasurada del animal, se esperó aproximadamente entre 5 min a que secase el pegamento, y se retiró el portaobjetos en sentido inverso al crecimiento del pelo, desde el nacimiento de la cola hacia arriba, se aseguró de que no quedara ningún tipo de remanente del pegamento. Luego de la depilación se procedió a infectar a los ratones, para lo cual se colocaron 10 µL de la suspensión del virus a una dosis de  $5 \times 10^4$

UFP/ratón, preparada en condiciones de esterilidad a partir de un stock viral (ATCC® VR-1493™) en solución salina isotónica, en la zona donde fue depilado con ayuda de la punta de una pipeta se distribuyó el virus, siguiendo un patrón cruzado de arriba hacia abajo, de izquierda a derecha, de abajo hacia arriba y de derecha a izquierda. Devolviéndose a las cajas de contención para roedores acondicionadas y debidamente identificadas con sus respectivas etiquetas (documento interno FTU004-ETI) para cada grupo de trabajo.

#### 6.1.2 Administración de Transferon®.

Se realizaron dos experimentos independientes para evaluar el efecto de Transferon® (lote 12C04 y lote 14D11). Se plantearon los grupos de trabajo para cada experimento, el esquema de administración de tratamientos es el mismo para ambos ensayos, con diferencias en los días de obtención de las muestras.

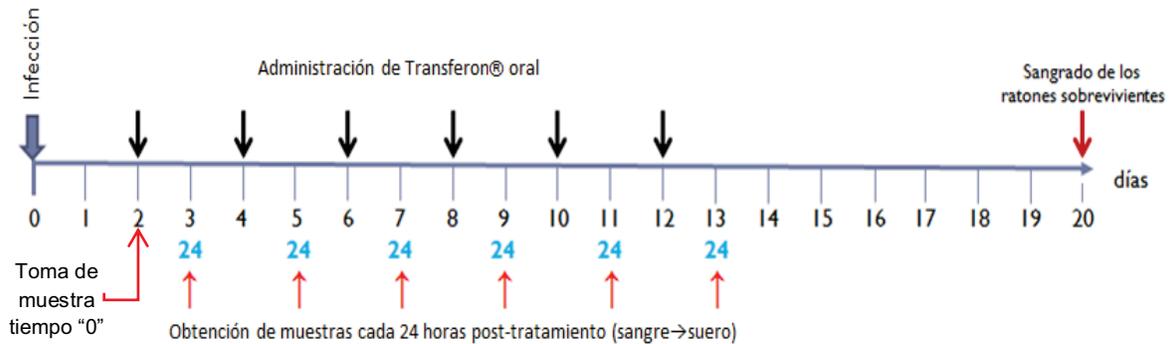
A partir de una unidad de Transferon® oral, que contiene 2 mg/5 mL (equivalente a 0.4 µg/µL) se prepararon las concentraciones necesarias para el experimento, 0 - 1.5 µg/200 µL (equivalente a 7.5 ng/µL), los tratamientos se rotularon con el lote y la concentración correspondiente. Se administraron 100 µL del tratamiento de Transferon® oral por vía orogástrica al grupo de ratones no infectado tratado e infectado tratado (ITR1 y/o ITR2 dependiendo el esquema de administración), mientras que a los grupos no infectado e infectado se les administró 100 µL de solución salina (vehículo). El monitoreo de los ratones se llevó a cabo registrando diariamente la supervivencia de estos hasta el día 20 post-infección.

A continuación se muestran los grupos con los que se realizó el ensayo de cuantificación de citocinas (tabla 3), el esquema de administración que se siguió con Transferon® (lote 12C04) para el tratamiento de los animales empezando dos días después de haberse llevado a cabo la infección (fig. 10), y la curva de supervivencia (fig. 11).

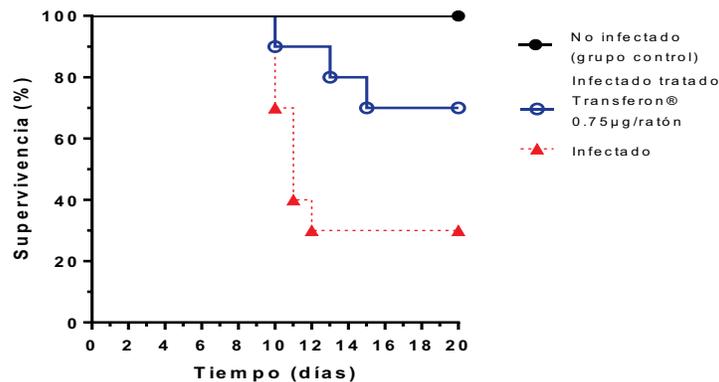
**Tabla 3.** Distribución de los grupos de trabajo para el ensayo de cuantificación de citocinas (Primera estrategia experimental).

Grupos	Codificación	Tratamiento (dosis)
No infectado	NON	Vehículo
No infectado tratado	NIT	Transferon®
Infectado	INF	Vehículo
Infectado tratado	ITR2	Transferon® 0.75µg/ratón

$n_{NON} = 22$ ,  $n_{NIT} = 33$ ,  $n_{INF} = 40$  y  $n_{ITR2} = 40$



**Figura 10. Esquema de infección para el ensayo de cuantificación de citocinas.** Se muestran los 20 días en los que se monitorea el transcurso de la infección. Con flechas en color negro se señalan los días en los cuales se llevó a cabo la administración de tratamientos, y con flechas en color rojo se señalan los días que se obtuvieron las muestras. El registro de la supervivencia se realizó diariamente hasta finalizar los veinte días.



**Figura 11. Evaluación de la actividad biológica de Transferon® lote 12C04.** Se muestra la curva de supervivencia (%) que se realizó con los resultados obtenidos del ensayo de cuantificación de citocinas.

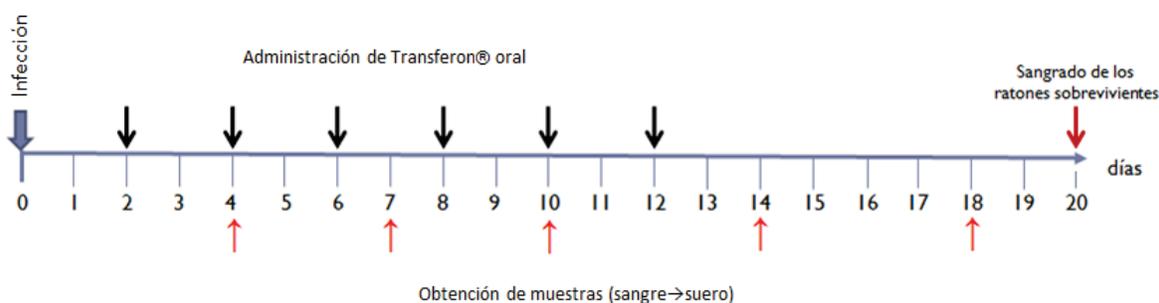
Los resultados muestran que el porcentaje de supervivencia aumenta en el grupo de animales infectados que fueron tratados con Transferon® 0.75µg/ratón (fig. 11). Por ello, para la evaluación de la producción de anticuerpos y su actividad neutralizante, se consideró tener otro grupo infectado tratado con una dosis

diferente de Transferon® (0.5µg/ratón). Enseguida se muestran los grupos con los que se realizó el ensayo (tabla 4), el esquema de administración que se siguió con Transferon® (lote 14D11) para el tratamiento de los animales (fig. 12), y la curva de supervivencia (fig. 13).

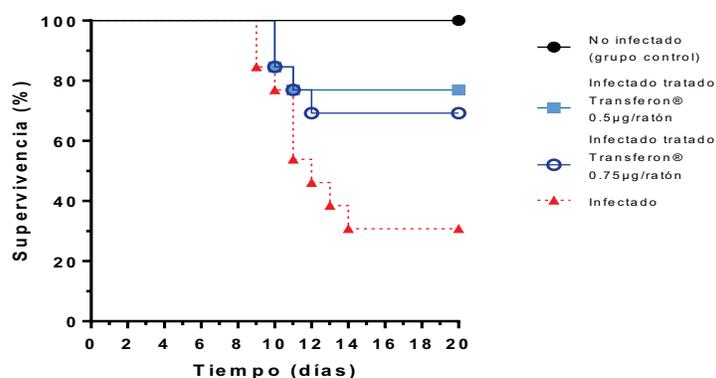
**Tabla 4.** Distribución de los grupos de trabajo para el ensayo de cuantificación de anticuerpos de tipo IgG totales e IgM y actividad neutralizante (Segunda estrategia experimental).

Grupos	Codificación	Tratamiento (dosis)
No infectado	NON	Vehículo
Infectado	INF	Vehículo
Infectado tratado	ITR1	Transferon® 0.5µg/ratón
Infectado tratado	ITR2	Transferon® 0.75µg/ratón

$n_{NON} = 5, n_{INF} = 10, n_{ITR1} = 10$  y  $n_{ITR2} = 10$



**Figura 12. Esquema de infección para el ensayo de cuantificación de anticuerpos.** Se muestran los días en los que se llevó a cabo la administración de los tratamientos (flechas negras), y los días que se obtuvieron los sueros (flechas rojas). Diariamente se realizó el registro de la supervivencia hasta terminar los 20 días post-infección.



**Figura 13. Evaluación de la actividad biológica de Transferon® lote 14D11.** Se muestra la curva de supervivencia (%) que se realizó con los resultados obtenidos del ensayo de cuantificación de anticuerpos.

### 6.1.3 Obtención de muestras.

24 h post-tratamiento, tres ratones de cada grupo fueron sangrados por la vena maxilar, recolectando un volumen de sangre entre 50 a 300  $\mu\text{L}$ , los ratones fueron marcados para alternar la toma de muestra. A continuación, las muestras de sangre se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min y se recolectaron los sueros y se prepararon alícuotas de 20-50  $\mu\text{L}$  cada una. Se identificaron adecuadamente las muestras y se almacenaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Al término del modelo *in vivo* (día 20) se obtuvieron muestra de sangre de cada uno de los grupos a partir de los ratones que sobrevivieron, siguiendo el procedimiento antes mencionado para la toma, identificación y almacenamiento de muestra.

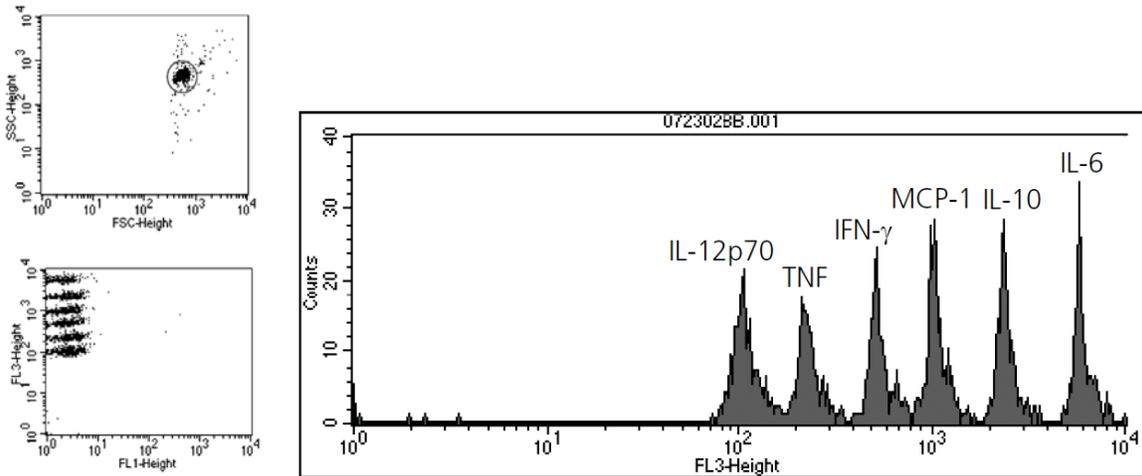
## 6.2 Determinación de citocinas por citometría de flujo

### 6.2.1 Fundamento de los ensayos de CBA.

Cytometric Bead Array (CBA) es un método que permite la detección y cuantificación múltiple de analitos por citometría de flujo mediante perlas sintéticas de un diámetro aproximado de 4 a 7.5  $\mu\text{m}$  que tienen unidos grupos carboxilo en la superficie, lo que proporciona una gran capacidad de unión al anticuerpo y una gran área de contacto comparada con una placa de ELISA convencional.

Cada perla de captura se encuentra conjugada con un anticuerpo específico, y el anticuerpo de detección proporciona una señal fluorescente en proporción a la cantidad de analito unido. Así, cuando las perlas de captura y el anticuerpo de detección se incuban junto con la muestra que contiene los analitos de interés que pueden ser reconocidos, se forma un complejo de tipo sándwich (perla de captura + analito + anticuerpo de detección) los cuales son medibles por fluorescencia, utilizando citometría de flujo. El ensayo permite incorporar estándares con concentraciones conocidas de cada proteína que se cuantifica y el programa de análisis interpola los valores obtenidos de las muestras en las curvas estándar, cuantificando de manera simultánea las proteínas presentes en las muestras (fig.

14). Este método reduce significativamente la cantidad de la muestra y el tiempo de obtención de los resultados.



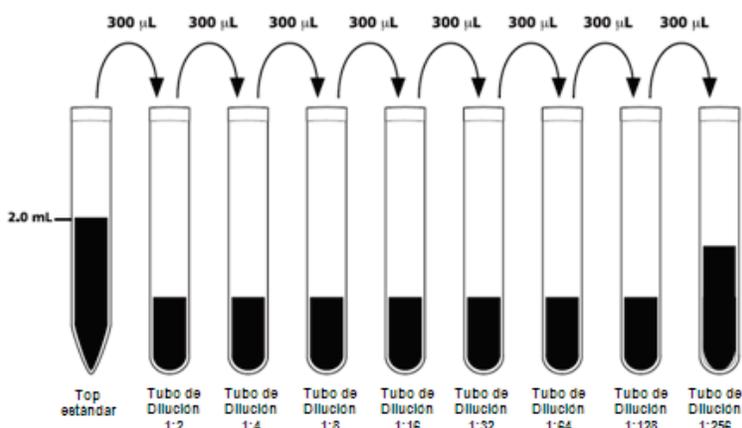
**Figura 14. Estrategia de análisis de la prueba por CBA.** Cada perla cuenta con una matriz la cual tiene una intensidad de fluorescencia única, de tal manera que las perlas se pueden mezclar de forma simultánea. Tomado y modificado de Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit Instruction Manual (2008) [57].

### 6.2.2 Cuantificación de citocinas.

Se evaluaron las muestras de suero obtenidas del modelo de sobrevida durante los días 3, 5, 7, 11 y 13 post-infección (fig. 10), para determinar los niveles de citocinas presentes. Se empleó el kit comercial de Biosciences BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit (Cat. 552364), para medir cuantitativamente los niveles de interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), Factor de Necrosis Tumoral (TNF) e interleucina 12p70 (IL-12p70).

Se procedió experimentalmente conforme a lo establecido por el fabricante en el inserto de uso del kit [57]. Primero, se preparó el estándar de citocinas, para ello se transfirieron las esferas del estándar liofilizado en un tubo cónico de 15 mL marcado como top estándar y se reconstituyó con 2 mL del diluyente de ensayo, permitiendo que este se equilibrara durante 15 min a temperatura ambiente, una

vez cumplido el tiempo se mezcló suavemente por pipeteo. Posteriormente, se preparó una curva estándar realizando diluciones seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256) colocando 300  $\mu$ L de diluyente de ensayo en tubos eppendorf para microcentrifuga y después 300  $\mu$ L del top estándar o bien de cada una de las diluciones (fig. 15), entre cada una de las diluciones se mezcló bien con pipeta sin utilizar vórtex. Se utilizó diluyente de ensayo como control negativo (0 pg/mL).



**Figura 15. Esquema de las diluciones seriadas del estándar Mouse Inflammation Kit.** Tomado y modificado de Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit Instruction Manual (2008) [57].

Para preparar la mezcla de perlas de captura, se determinó el número de tubos de ensayo (incluyendo muestras y controles) necesarios para el experimento. Se mezcló vigorosamente con el vórtex cada suspensión de perlas de captura, embotelladas individualmente (A1-A6), de 3 a 5 segundos antes de realizar la mezcla de todas las perlas (mix de perlas de captura). Se agregó una alícuota de 5  $\mu$ L de cada perla de captura por cada tubo de ensayo a analizar, por lo que se realizó el cálculo que corresponde al volumen total de cada perla de captura y se cuenta el mismo volumen de diluyente de ensayo para cada una (seis veces el volumen de cada perla) esto para completar el volumen indicado en el manual de 10  $\mu$ L de perlas de captura por cada tubo de ensayo.

Después de realizar el mix de perlas de captura se añadieron 50  $\mu$ L en todos los tubos de ensayo, luego por un lado se añadieron 50  $\mu$ L de las diluciones del

estándar de citocinas a los tubos rotulados para elaborar la curva estándar, y por otro lado se colocaron a los tubos previamente etiquetados para muestras 50  $\mu$ L de cada suero obtenido. Posteriormente, a todos los tubos de ensayo se añadieron 50  $\mu$ L del reactivo de detección PE-Mouse Inflammation.

Los tubos se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Transcurrido el tiempo, se añadió a cada tubo de ensayo 1.0 mL de regulador de lavado y se centrifugaron a 200 xg durante 5 min. Al tiempo que los tubos se centrifugaban se prepararon 3 tubos más para llevar a cabo la configuración del citómetro, se colocaron 50  $\mu$ L de perlas de configuración de citómetro, a uno de los tubos se le colocaron 50  $\mu$ L de control positivo de PE, mientras que a otro tubo se le colocaron 50  $\mu$ L de control positivo de FITC, ambos son anticuerpos conjugados. Estos reactivos son utilizados para configurar el conteo de las perlas y los ajustes iniciales de compensación del instrumento (véase fig. 12). Se dejan incubando durante aproximadamente 30 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Transcurrido el tiempo se añadió a cada tubo de ensayo 1.0 mL de regulador de lavado y se centrifugaron a 200 xg durante 5 min.

Una vez terminada la centrifugación para todos los tubos se descartó el sobrenadante de cada tubo de ensayo aspirándose con cuidado, después se añadieron 300  $\mu$ L del regulador de lavado a cada tubo de ensayo para resuspender el sedimento de las perlas, y se transfirieron a tubos de citometría debidamente rotulados y se procedió con la adquisición de los datos. Primeramente, se configuro el citómetro con las perlas con los controles positivos de PE y FITC, posteriormente se capturaron cada una de las muestras en el citómetro de flujo FACS Aria III utilizando FACS Diva Software (BD Biosciences). A partir de los datos adquiridos se realizó una curva estándar para calcular la concentración de las citocinas en suero utilizando FCAP Array™ v3.0.1 Software.

## 6.3 Evaluación de la presencia de anticuerpos

### 6.3.1 Determinación de IgG<sub>totales</sub> e IgM por ELISA.

Para la evaluación de los niveles de anticuerpos tipo IgG e IgM en el modelo murino de herpes cutáneo, se obtuvieron muestras durante los días 4, 7, 10, 14 y 18 post-infección (fig. 12). Para determinar los niveles de anticuerpos tipo IgG totales e IgM, experimentalmente se procedió conforme a lo establecido en los insertos de uso de los kits de ELISA empleados [58, 59].

Utilizando el kit de eBioscience, Mouse IgG total ELISA Ready-SET-Go!<sup>®</sup> 88-50400, se colocaron en la placa de ELISA 100 µL/pozo del anticuerpo de captura (anticuerpo monoclonal purificado anti-IgG de ratón), dilución 1:250 en Coating Buffer (1 X). Se selló la placa y se incubó durante una noche a 4 °C.

Al día siguiente, se preparó el regulador de bloqueo (Blocking Buffer 2 X) haciendo una dilución 1:10 del regulador de ensayo A (Assay Buffer A) en agua desionizada. Posteriormente, se aspiraron los pozos y se lavaron tres veces con 200 µL/pozo de regulador de lavado, permitiendo aproximadamente 1 min durante cada etapa de lavado, para aumentar la eficacia de los lavados. Se secó la placa sobre papel absorbente para eliminar cualquier residuo del regulador de lavado. Se bloquearon los pozos con 200 µL de regulador de bloqueo y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h.

Se preparó el estándar y el anticuerpo de detección, dilución 1:250 en regulador de ensayo A (1 X). Transcurridas las 2 h, se aspiraron los pozos y lavaron tres veces con 200 µL/pozo de regulador de lavado.

Las diluciones seriadas para hacer la curva estándar se realizaron por duplicado, para ello se añadieron 100 µL del regulador de ensayo A (1 X) a todos los pozos para las diluciones del estándar, después se añadieron 100 µL del estándar reconstituido por duplicado en los pozos A1 y A2, se mezcló el contenido de los pozos A1 y A2 por aspiración y eyección repetida (concentración del estándar en A1 y A2, 100 ng/mL), se transfirieron 100 µL a los pocillos B1 y B2,

respectivamente, teniendo cuidado de no rayar la superficie de los pozos, continuando con este procedimiento 5 veces más. Se añadieron 100  $\mu$ L/pozo del regulador de ensayo A (1 X) a los pozos de blanco. Mientras que a los pozos para las muestras se añadieron 90  $\mu$ L/pozo del regulador de ensayo A (1 X), para posteriormente añadir 10  $\mu$ L/pozo de las muestras prediluidas, 5,000 y 10,000 veces, en regulador de ensayo A (1 X). Por último, se añadieron 50  $\mu$ L/pozo del anticuerpo de detección diluido a todos los pozos. Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 3 h, con agitación a 400 rpm.

Después, se aspiraron los pozos y lavaron cinco veces con 200  $\mu$ L/pozo de regulador de lavado. Se añadieron 100  $\mu$ L/pozo de solución de sustrato a cada pozo, y se incubó la placa a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 min. Posteriormente, se añadieron 100  $\mu$ L de solución de paro a cada pozo. Y se realizó la lectura de la placa a 450 nm y a 570 nm en el espectrofotómetro EPOCH.

Al mismo tiempo, se utilizó el kit Mouse IgM ELISA Ready-SET-Go!<sup>®</sup> 88-50470, el procedimiento de uso fue igual al que se describió para IgG total. Primero, se colocaron en la placa de ELISA 100  $\mu$ L/pozo del anticuerpo de captura (anticuerpo monoclonal purificado anti-IgM de ratón), dilución 1:250 en Coating Buffer (1 X). Se selló la placa y se incubó durante la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se preparó el regulador de bloqueo (Blocking Buffer 2 X), el mismo se utilizó en ambos ensayos. Posteriormente, se aspiraron los pozos y lavaron tres veces con 200  $\mu$ L/pozo de regulador de lavado, permitiendo aproximadamente 1 min durante cada etapa de lavado, para aumentar la eficacia de los lavados. Se secó la placa sobre papel absorbente para eliminar cualquier residuo del regulador de lavado. Se bloquearon los pozos con 200  $\mu$ L de regulador de bloqueo y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h.

Se preparó el estándar de 15 a 30 min antes de colocarlo, para su completa reconstitución. Transcurridas las 2 h, se aspiraron los pozos y lavaron tres veces con 200  $\mu$ L/pozo de regulador de lavado.

Las diluciones seriadas para hacer la curva estándar se realizaron por duplicado, para ello se añadieron 100  $\mu$ L del regulador de ensayo A (1 X) a todos los pozos para las diluciones del estándar, después se añadieron 100  $\mu$ L del estándar reconstituido por duplicado en los pozos A1 y A2, se mezcló el contenido de los pozos A1 y A2 por aspiración y eyección repetida (concentración del estándar en A1 y A2, 25 ng/mL), se transfirieron 100  $\mu$ L a los pocillos B1 y B2, respectivamente, teniendo cuidado de no rayar la superficie de los pozos, continuando con este procedimiento 5 veces más. Se añadieron 100  $\mu$ L/pozo del regulador de ensayo A (1 X) a los pozos de blanco. Mientras que a los pozos para las muestras se añadieron 50  $\mu$ L/pozo del regulador de ensayo A (1 X), para posteriormente añadir 50  $\mu$ L/pozo de las muestras prediluidas, 50,000 y 100,000 veces en regulador de ensayo A (1 X). Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h, con agitación a 400 rpm.

Después, se aspiraron los pozos y lavaron cinco veces con 200  $\mu$ L/pozo de regulador de lavado. Se preparó el anticuerpo de detección, dilución 1:250 en del regulador de ensayo A (1 X). Se añadieron 100  $\mu$ L/pozo del anticuerpo de detección diluido a todos los pozos. Se cubrió nuevamente la placa y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 h, con agitación a 400 rpm. Se aspiraron los pozos y lavaron cinco veces con 200  $\mu$ L/pozo de regulador de lavado, y se añadieron 100  $\mu$ L/pozo de solución de sustrato a cada pozo, y se incubó la placa a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 min. Posteriormente, se añadieron 100  $\mu$ L de solución de paro a cada pozo. Y se realizó la lectura de la placa a 450 nm y a 570 nm en el espectrofotómetro EPOCH.

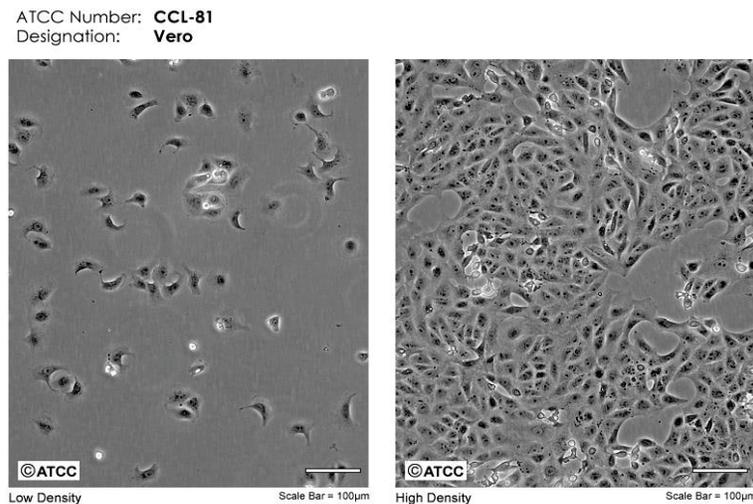
### 6.3.2 Titulación de VHS-1 por el método de dosis infectante de cultivo de tejidos 50% (TCID<sub>50</sub>)

Se determinó el título viral de VHS-1 a través de TCID<sub>50</sub> para después evaluar la presencia de anticuerpos neutralizantes. Al conocer el título viral nos aseguramos de determinar la actividad neutralizante de los anticuerpos sin caer en un fenómeno de zona por la presencia de un exceso de virus y pocos anticuerpos.

Se utilizó el método de Spearman-Kärber para estimar la dosis infectiva 50 (TCID<sub>50</sub>/mL). Posteriormente, se realizó una conversión del título viral obtenido de TCID<sub>50</sub>/mL a unidades formadoras de placa (UFP/mL) con fines prácticos. Mediante la aplicación de la distribución de Poisson, como una estimación de trabajo se puede suponer que una TCID<sub>50</sub> de  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL producirá  $0.7 \times 10^5$  UFP/mL [60].

a. Descongelación de la línea celular

Se preparó un cultivo de células Vero (ATCC® CCL-81™) a partir de un stock del lote semilla de la UDIBI. Las células Vero son células epiteliales provenientes de riñón de mono verde (*Cercopithecus aethiops*), son células adherentes (fig. 16), dentro de los virus a los que la línea celular es susceptible se encuentra el VHS-1, por lo que resulta ser una línea adecuada para la metodología.



**Figura 16. Morfología de las células Vero.** Tomada de ATCC®.

Para la descongelación de la línea celular, se realizó el siguiente procedimiento, conforme a lo establecido en el documento interno FTU022-INS Instructivo para el manejo de la línea celular Vero.

Primeramente, se implementaron las condiciones de esterilidad necesarias para el proceso de descongelación, y por otro lado se preparó el baño María a una

temperatura de 37 °C. Una vez realizado esto, se procedió a colocar 9.0 mL de medio de cultivo Eagle's Minimum Essential Medium (ATCC® EMEM, 30-2003) suplementado con suero fetal bovino (Gibco® FSB, 16000-044) a una concentración final del 10%, en un tubo para centrifuga de 15 mL. Posteriormente, se sacó el criovial de células congeladas del tanque de nitrógeno, se colocó por 2 min en baño María, procurando que el agua no tuviera contacto directo con la tapa del criovial, para que la descongelación fuera completa y homogénea se efectuaron movimientos circulares y/o laterales al criovial evitando que el agua rebasara la tapa del mismo. Transcurrido el tiempo, se limpió el criovial utilizando una sanita con etanol al 70%, y a partir de este punto las operaciones se realizaron en condiciones de esterilidad. El contenido del criovial se transfirió al tubo de centrifuga que contenía los 9 mL de medio, se cerró el tubo y se movió suavemente por inversión (tres veces) para homogeneizar, y se procedió a centrifugar a 125 xg durante 5 min a temperatura ambiente. Una vez centrifugado, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 2 mL de medio EMEM al 10% de SFB. Se tomó una alícuota de 10 µL para realizar una cuenta celular por exclusión de azul tripano (Sigma-Aldrich® Trypan Blue solution, T8154), para ello se realizó una dilución 1:10 y de esta se colocaron 10 µL en la cámara de Neubauer, se contaron las células refringentes como vivas y las células azules como muertas, se contabilizaron los cuatro cuadrantes de los extremos, sumando el número de células y dividiéndolo entre cuatro para obtener el promedio, se realizó el cálculo correspondiente para obtener el número de células por mililitro y el porcentaje de células vivas (porcentaje de viabilidad - % V), siguiendo el procedimiento descrito en el documento interno FTU017-INS. Finalmente, se transfirieron las células a una botella para cultivo de 25 cm<sup>2</sup> para su expansión, la cual se etiquetó con los siguientes datos: nombre de la línea celular, número de pase y fecha. Las células se mantuvieron en incubación a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, hasta obtener una confluencia óptima (entre el 80 a 90%), para realizar el ensayo.

## b. Titulación viral

En condiciones de esterilidad, se procedió a manejar el cultivo celular, para ello se retiró el medio en el que se encontraban las células y se desechó en un contenedor de residuos con 100 mL de hipoclorito de sodio al 0.6%, después se adicionaron 3 mL de PBS 1 X (Gibco® PBS pH 7.4 (10 X), REF 70011-044) a la botella de cultivo para lavar la monocapa de células, teniendo cuidado de no adicionarlo directamente sobre esta, posteriormente se retiró el PBS 1X y se adicionó 1 mL de tripsina (Gibco® TripLE™ Select (1X), REF 12563-011) sobre la monocapa de células y se homogeneizó por inversión suave tres veces, se incubó la botella de cultivo a 37 °C durante aproximadamente 8 min, durante los cuales se monitoreó el desprendimiento de las células, después de la incubación se adicionaron 3 mL de medio de cultivo completo (EMEM al 10% de SFB), para neutralizar el efecto de la tripsina, y se recolectó la suspensión celular transfiriéndola a un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó a 125 xg durante 5 min a temperatura ambiente, después de ello se retiró el sobrenadante por decantación, se resuspendió el botón celular con el remanente de medio y posteriormente se adicionó 1 mL de medio EMEM al 5% de SFB, con ayuda de una pipeta de transferencia se homogeneizaron nuevamente las células, y se realizó una cuenta de células por exclusión de azul tripano. Después, se prepararon 10 mL de una suspensión celular a una concentración de 100,000 células/mL en medio EMEM suplementado al 5% de SFB. Después, se preparó una microplaca de 96 pozos fondo plano (Corning™) con células Vero, para lo cual se colocaron 100 µL de la suspensión celular antes preparada utilizando una micropipeta multicanal, a cada pozo de la columna 1 a la 10 y después a los pozos de la columna 12 dejando libres los pozos de la columna 11 (fig. 15), de tal manera que quedaron 10,000 células por pozo. Se dejó incubando la placa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 h.

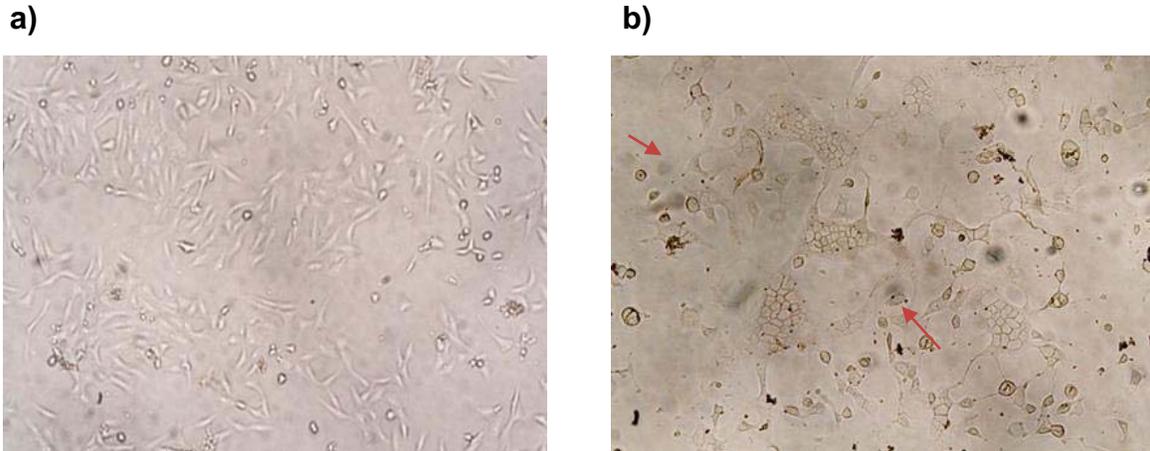
Se descongeló un vial del stock de VHS-1 (*Human herpesvirus 1*, ATCC® VR-1493™), en baño María a 37 °C durante 5 min agitándose suavemente cada minuto, teniendo cuidado de que el agua no rebasara el tapón del vial, una vez descongelado el virus se realizaron diluciones seriadas 1:10 (desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-9</sup>) en

un volumen final de 1 mL (900  $\mu$ L de medio EMEM al 5% de SFB y 100  $\mu$ L de suspensión viral), entre cada dilución se mezcló vigorosamente con vórtex durante 10 segundos. Se adicionaron 100  $\mu$ L de la suspensión viral original a todos los pozos de la columna 1, posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ L de cada dilución a todos los pozos de cada una de las columnas (8 pozos por dilución), a la última columna se le adiciono medio EMEM suplementado con 5% de SFB (testigo negativo) (fig. 17), y se incubo la placa durante 120 h (5 días) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Un día después del ensayo se observó la placa al microscopio, para descartar cualquier tipo de contaminación y al mismo tiempo establecer el efecto del virus, el cual aún era poco notorio por lo que se mantuvo un monitoreo visual hasta el término de la incubación.

	Virus concentrado										Control negativo	
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>			
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Figura 17. Esquema de la placa de cultivo para la titulación de VHS-1.** Los pozos utilizados se muestran sombreados.

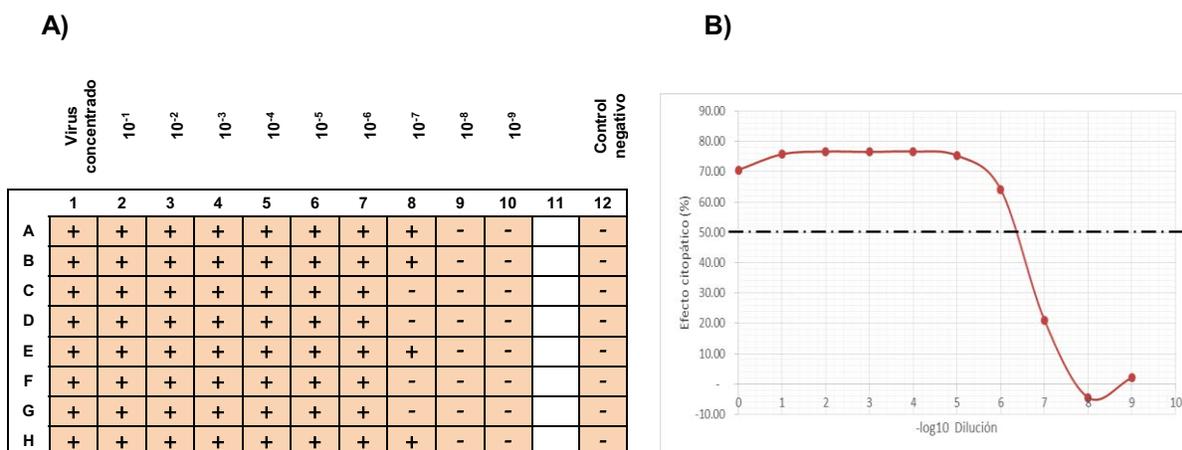
Aproximadamente 4 h antes de concluir el ensayo, se revisó al microscopio la placa de titulación viral para el registro de los pozos que presentaron efecto citopático. Se marcaron como negativos (-) aquellos pozos que no presentaron efecto citopático, mientras que se marcaron como positivos (+) los pozos en los que se observó el efecto citopático (fig. 18).



**Figura 18. Revisión al microscopio de la placa de titulación de VHS-1 por el método de TCID<sub>50</sub>.** (a) Se observan células Vero sin infectar (control negativo). (b) Se observan células multinucleadas (efecto citopático del virus HSV-1), señaladas con flechas rojas. Imágenes tomadas con un aumento de 10 X.

Una vez que se terminó de revisar la placa (fig. 19 A), se colocaron en condiciones de esterilidad 20  $\mu$ L de MTS (un compuesto de sales de tetrazolio –Promega CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay–) a cada uno de los pozos ocupados, y 4 h después se analizó en un espectrofotómetro EPOCH (BioTek, Vermont, EE.UU.) utilizando el software Gen5 (BioTek) a 490 nm. La evaluación de los resultados fue por medición de la absorbancia de MTS (densidad óptica – DO) un método colorimétrico con el cual se determina la viabilidad celular, ya que el MTS es biorreducido por las enzimas deshidrogenasas de las células vivas, en un producto llamado formazán el cual es soluble en el medio de cultivo, siendo que la cantidad de formazán medida por absorbancia a 490 nm es directamente proporcional a la cantidad de células vivas en cultivo. Se realizó un gráfico del porcentaje de efecto citopático con respecto a la dilución viral empleada ( $-\log_{10}$ ), para lo cual se ajustaron los valores de DO obtenidos (fig. 19 B) [61].

Empleando el método de Spearman-Kärber se calculó la dosis infectiva 50, y posteriormente se realizó la conversión para obtener las UFP/mL. El valor del stock de VHS-1 empleado tuvo un título de  $9.4 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL ( $6.5 \times 10^7$  UFP/mL).



**Figura 19. Resultados obtenidos de la titulación de VHS-1.** A) Esquema de la placa empleada para el ensayo cuyos resultados fueron marcados tras haberse observado en un microscopio para poder apreciar el efecto citopático generado por el virus. B) Gráfica que muestra la correlación entre el porcentaje de efecto citopático con respecto a la dilución viral empleada, resultados obtenidos utilizando un método colorimétrico con MTS (490 nm); se señala con una línea punteada el 50% de efecto citopático [61].

A partir de los resultados mostrados en el gráfico de efecto citopático con respecto a la dilución viral (fig. 19 B) se decidió realizar un ensayo preliminar para comparar dos concentraciones del VHS-1:  $1.30 \times 10^3$  UFP/mL (derivada de la dilución  $10^{-5}$ ) y  $1.30 \times 10^2$  UFP/mL (derivada de la dilución  $10^{-6}$ ). Con el cual, se demostró que al utilizar una dilución  $10^{-5}$  del VHS-1 las variaciones entre resultados (triplicados) son menores a las presentadas utilizando una dilución  $10^{-6}$  del VHS-1. Además, el efecto que tienen los anticuerpos se hace más visible, lo que se denota con la protección de las células ante el efecto citopático causado por el VHS-1, siendo así que se consideró utilizar la concentración de dilución  $1.30 \times 10^3$  UFP/mL en los ensayos consecutivos para evaluar la acción de neutralización.

### 6.3.3 Ensayos de Neutralización.

Previo al ensayo de neutralización las muestras de suero que se recolectaron al término del modelo de sobrevida (día 20) se trataron a  $56^\circ\text{C}$  durante 30 min, para inactivar el complemento; posteriormente, se centrifugaron a 5000 rpm durante 10

min y se filtraron en condiciones de esterilidad. En microplacas de 96 pozos de fondo plano (Corning™) se colocaron 100 µL de una suspensión de células Vero, siguiendo el mismo procedimiento para sembrar la placa en el ensayo de titulación viral, de tal manera que en cada pozo se colocaran 10,000 células. Se dejó incubar la placa a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante aproximadamente 2 h. Por otro lado, se prepararon las diluciones seriadas (1:2–1:128) de cada una de las muestras de suero y se preparó la dilución del virus (10<sup>-5</sup>) ajustando a una concentración 1.30x10<sup>3</sup> UFP/mL a partir de un stock de VHS-1 de concentración inicial de 6.5x10<sup>7</sup> UFP/mL.

Se mezclaron volúmenes iguales de la dilución del virus (1.30x10<sup>3</sup> UFP/mL) con la dilución del suero de los diferentes grupos (NON, INF, ITR1 0.5µg/ratón e ITR2 0.75µg/ratón) durante 1 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación (opsonización del virus), se adicionó 100 µL de medio EMEM al 5% de SFB a los pozos que se contemplaron como control negativo (células), y por otro lado se colocó 100 µL de la mezcla suero-virus a los pozos que se establecieron para analizar el efecto neutralizante de los anticuerpos presentes en el suero (cantidad constante de virus, cantidades decreciente de suero). Se incubó durante 5 días a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> (fig. 20).

Aproximadamente 4 h antes de transcurrir las 120 h del ensayo, primeramente se revisó la placa al microscopio para percibir el efecto citopático ocasionado en las células, después de ello se colocó 20 µL de MTS a cada uno de los pozos ocupados y se dejó en incubación por 4 h a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>, y se analizó en el espectrofotómetro EPOCH a 490 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	BCO.	Células	Suero NON CONCENTRADO	Dil 1	Dil 2	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7	Células con Virus	
C	BCO.	Células		Dil 1	Dil 2	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7	Células con Virus	
D	BCO.	Células		Dil 1	Dil 2	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7	Células con Virus	
E		Células	Suero INF CONCENTRADO	Dil 1	Dil 2	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7	Células con Virus	
F		Células		Dil 1	Dil 2	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7	Células con Virus	
G		Células		Dil 1	Dil 2	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7	Células con Virus	
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	BCO.	Células	Suero ITR1 CONCENTRADO	Dil 1	Dil 2	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7	Células con Virus	
C	BCO.	Células		Dil 1	Dil 2	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7	Células con Virus	
D	BCO.	Células		Dil 1	Dil 2	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7	Células con Virus	
E		Células	Suero ITR2 CONCENTRADO	Dil 1	Dil 2	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7	Células con Virus	
F		Células		Dil 1	Dil 2	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7	Células con Virus	
G		Células		Dil 1	Dil 2	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7	Células con Virus	
H												

**Figura 20. Diseño de la placa para el ensayo de neutralización.** Los pozos que se encuentran vacíos están en color gris. El control negativo se refiere como los pozos en los que únicamente se encuentran las células Vero con medio EMEM al 5 % de SFB, mientras que el control negativo se marca como los pozos que contienen células Vero en contacto con VHS-1. BCO: EMEM al 5% de SFB; NON: No infectado; INF: Infectado; ITR: Infectado tratado (ITR1)= 0.5µg/ratón e (ITR2)= 0.75µg/ratón.

## **7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Como análisis estadístico para determinar si existen diferencias entre los diferentes grupos y tratamientos, se realizó un análisis de varianza de 2 vías (ANOVA de 2 vías) seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se consideraron diferencias significativas en la producción de citocinas, en los niveles de anticuerpos o en la actividad neutralizante de los mismos cuando el valor de  $p < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Determinación de citocinas en suero de ratones utilizando un modelo murino de infección con VHS-1 y tratados con Transferon®

A continuación se muestran las gráficas que se obtuvieron a partir del análisis de citocinas en suero de ratones infectados con VHS-1 y tratados con Transferon® por citometría de flujo mediante CBA.

Con los resultados que se presentan en la figura 21, se analiza el efecto regulador de Transferon® a nivel sistémico durante la infección con VHS-1.

En general, observamos que durante el curso temporal de la infección con VHS-1 se incrementan, en diferente proporción, los niveles de las seis citocinas evaluadas (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p70) en ciertos días específicos de la infección (días 5, 7 y/o 11), en comparación con los ratones no infectados. Este aumento en los niveles de citocinas inducido por la infección se restablece a los niveles basales de ratones no infectados entre los días 9 a 13.

Los resultados mostraron una disminución de IL-12p70 (día 3) e IL-10 (día 5) en el grupo de ratones infectados y tratados con Transferon® en comparación al grupo control de ratones infectados, también observamos una disminución significativa para el caso de IL-10 (Fig. 21 A y B). Mientras que en los días del 7 al 13 la concentración sérica de estas citocinas se mantiene sin cambios significativos tanto para el grupo control de ratones infectados como para los ratones infectados y tratados con Transferon® en comparación al grupo de ratones sin infección y sin tratamiento.

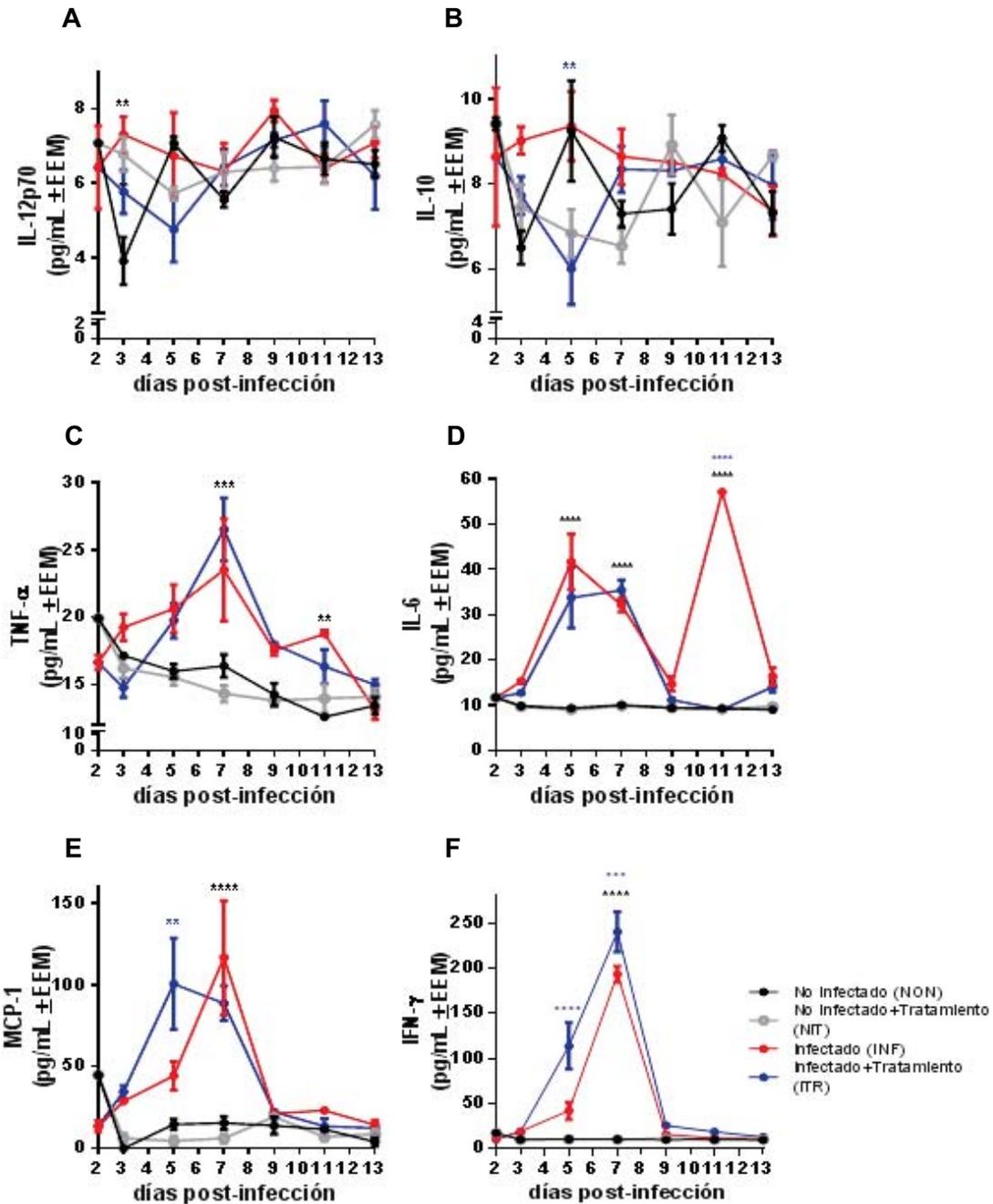
Para el caso de TNF- $\alpha$  observamos que la infección induce un incremento en la concentración desde el día 3 con un pico máximo de producción al día 7. El tratamiento con Transferon® tiende a inducir una mayor producción de TNF- $\alpha$  en ratones infectados al día 7 (Fig. 21 C).

En los ratones infectados se observan dos picos en la producción de IL-6 (días 5 y 11). En donde el tratamiento con Transferon® indujo una disminución significativa en el nivel de IL-6 al día 11 post-infección, comparando con los niveles de esta citocina con el grupo de ratones infectados sin tratamiento (Fig. 21 D).

También, se aprecia un aumento significativo en los niveles de la citocina MCP-1 durante el día 5 post-infección en el grupo de ratones infectados y tratados (Fig. 21 E). Este aumento significativo es similar al del grupo infectado al día 7; sugiriendo que el tratamiento con Transferon® favorece la producción de MCP-1 en un tiempo más temprano de la infección.

Por otro lado, encontramos en los ratones infectados y tratados con Transferon® un incremento significativo del nivel de IFN- $\gamma$  en los días 5 y 7 después de la infección (Fig. 21 F), con respecto al comportamiento propio de la infección; es decir, se nota una respuesta más temprana. Dicha respuesta es similar a la observada con MCP-1, en donde se acelera la producción de la citocina para alcanzar rápidamente los niveles de esta inducidos por la infección per se en días posteriores.

Como control administramos Transferon® a ratones no infectados y cómo podemos observar no hay cambios en los niveles de citocinas durante el tiempo evaluado comparando con los ratones no infectados y no tratados.



**Figura 21. Perfil de citocinas en suero de ratones infectados con VHS-1 y tratados con Transferon®.** Después de 24 h post - cada tratamiento se evaluó el nivel de A) IL-12p70, B) IL-10, C) TNF- $\alpha$ , D) IL-6, E) MCP-1 e F) IFN- $\gamma$  en suero, por citometría de flujo mediante la aplicación de CBA. Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías y una prueba de Bonferroni, comparación estadística entre los grupos: INF contra NON (asteriscos de color negro), e ITR contra INF (asteriscos de color azul). Valores de p INF contra NON: \*\*p=0.0010 (IL-12p70) y \*\*p=0.0056 (TNF- $\alpha$ ), \*\*\*p=0.0005, \*\*\*\*p<0.0001. Valores de p ITR contra INF: \*\*p=0.0097 (IL-10) y \*\*p=0.0011 (MCP-1), \*\*\*p=0.0002, \*\*\*\*p<0.0001.

## 8.2 Análisis de anticuerpos IgM e IgG<sub>totales</sub> utilizando un modelo murino de herpes.

En la siguiente figura se muestran las gráficas generadas de los resultados de los ensayos de ELISA para cuantificar IgM e IgG total.

(A) (B)

| .....

**Figura 22. Determinación de anticuerpos en suero de ratones infectados con VHS-1 y tratados con Transferon® a tiempos tempranos.** Se evaluaron los niveles de (A) IgM e (B) IgG totales en suero por ELISA. De los sueros recolectados se realizaron dos diluciones para cada ensayo, para IgM 1:50 000 y 1:100 000, y para IgG totales 1:5 000 y 1:10 000; con los datos de absorbancia a 450/570 nm obtenidos con respecto a su factor de dilución se determinaron los valores de concentración (ng/mL) de cada uno de los anticuerpos. Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Comparación estadística entre los grupos: INF contra ITR 0.50µg/ratón (asteriscos de color azul claro), e INF contra ITR 0.75µg/ratón (asteriscos de color azul oscuro).

En el grafico A de la figura 22 se puede observar que los niveles de IgM en los grupos tratados tienden a aumentar. En el día 10 post-infección se detectaron elevados niveles de IgM para el grupo de ratones infectados. Aún con la variabilidad de los datos, se obtuvo una diferencia significativa al comparar el grupo de ratones infectados con los grupos tratados para ambas dosis de Transferon® (0.50µg/ratón y 0.75µg/ratón). Al día 14 se aprecia una diferencia significativa solo con el tratamiento de Transferon® 0.50µg/ratón.

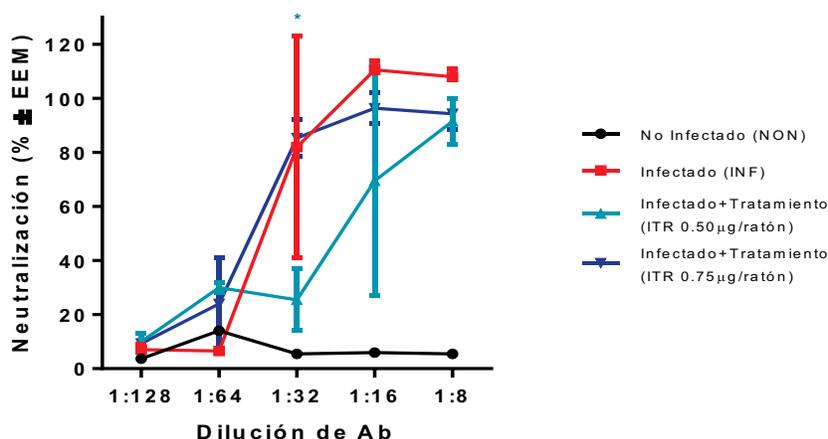
Respecto a la cantidad de IgG totales en el grafico B de esta figura 22 se puede observar que el grupo infectado tratado con Transferon® 0.75µg/ratón tiene un comportamiento similar al grupo infectado. Mientras que el grupo tratado con

Transferon® 0.50µg/ratón mantiene la concentración de IgG totales por debajo del grupo infectado desde el día 10 hasta el día 18; similar a la cantidad de anticuerpos IgG totales del grupo no infectado. Se puede apreciar una diferencia significativa en la concentración de anticuerpos de isotipo IgG totales al comparar al grupo infectado tratado con Transferon® 0.50µg/ratón con respecto al grupo infectado, al día 10 y 18 en el transcurso de la infección.

Para ambos ensayos se puede notar el comportamiento basal de los niveles de anticuerpos de tipo IgM e IgG totales a partir de los resultados obtenidos del grupo no infectado.

### 8.3 Análisis de la actividad neutralizante de anticuerpos utilizando sueros de ratones infectados y tratados con Transferon®

La evaluación de la presencia y actividad neutralizante de anticuerpos específicos contra VHS-1 se realizó mediante ensayos de neutralización (Fig. 23).



**Figura 23. Evaluación de la actividad neutralizante de anticuerpos provenientes de ratones infectados y tratados con Transferon®.** Se cultivaron células Vero a las que después de adheridas se les colocó el co-cultivo de VHS-1 ( $1.3 \times 10^3$  UFP/mL) en presencia de los sueros de ratones obtenidos al día 20 post-infección (se emplearon diluciones seriadas 1:2). Aproximadamente 4 h antes de cumplirse las 120 h del ensayo de neutralización, se colocó MTS. Los datos fueron analizados con ANOVA de dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se realizó una comparación estadística entre los grupos INF contra ITR 0.50µg/ratón (asteriscos de color azul claro), e INF contra ITR 0.75µg/ratón.

De los resultados graficados se puede notar que la tendencia de la actividad neutralizante que tiene el grupo infectado es similar al grupo infectado que fue tratado con Transferon® 0.75µg/ratón. Sin embargo, comparando el grupo infectado tratado con Transferon® 0.50µg/ratón respecto al grupo infectado se aprecia una menor respuesta de la neutralización, cuya diferencia es significativa a partir de tener una dilución 1:32 de la muestra de suero.

El grupo no infectado se muestra como control de la neutralización, ya que al no tener anticuerpos específicos contra VHS-1 se produce un alto efecto citopático que denota la muerte celular.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se ha reportado que el sistema inmune tiene una participación importante en la limitación de la replicación del VHS-1 durante la infección primaria, así como en el mantenimiento del genoma viral en un estado latente durante períodos prolongados en la ausencia de la producción de virus infeccioso y síntomas clínicos [62]. Es así que, para los herpesvirus, en este caso enfocándonos en aquellos que infectan a humanos, es esencial modular a las células del hospedero y evadir el sistema inmune para que pueda establecerse la infección viral. Al analizar las características del virus es posible entender los mecanismos por los cuales se puede atacar o bien potenciar la supresión de la infección ayudando a mejorar y controlar los síntomas causados por esta.

Considerando la información general que se tiene respecto a la respuesta del sistema inmune contra una infección provocada por el VHS-1 se observa que la replicación en las células epiteliales periféricas causa la producción y la secreción de interferones de tipo I que activan las células del sistema inmune innato. Los macrófagos activados secretan interferones y citocinas, que reclutan y activan las células adicionales de la respuesta inmune innata en el sitio de la infección. Por ejemplo los neutrófilos reclutados inducen la apoptosis en las células infectadas y adicionalmente las células NK activadas liberan IFN- $\gamma$  y granzimas A y B, que inducen la apoptosis en las células infectadas. Las células dendríticas secretan citocinas proinflamatorias y presentan péptidos virales a las células del sistema inmune adaptativo. Así, la respuesta inmune innata limita la replicación viral en la periferia y presenta antígeno para inducir la respuesta inmune adaptativa [62].

En la actualidad se emplea como tratamiento de algunas infecciones con componente inflamatorio Transferon<sup>®</sup>, un EDL humano, el cual ha demostrado que induce la disminución de la sintomatología clínica.

Transferon<sup>®</sup> es un medicamento registrado ante la autoridad sanitaria mexicana y comercializado a nivel nacional [40, 41, 43], el cual ha demostrado su utilidad como tratamiento coadyuvante en diversas enfermedades bajo diferentes

esquemas, se hace necesario esclarecer los diversos mecanismos de acción por los cuales Transferon® puede ejercer su efecto.

Hasta el momento, se han llevado a cabo diferentes estrategias experimentales para la evaluación fisicoquímica y biológica de Transferon® [40]. Entre las cuales, se tiene establecido un modelo murino de infección herpética cutánea, a partir del cual se han obtenido resultados que demuestran una modulación significativa en los niveles de las citocinas: TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  [41]. Aunado a ello, con este mismo modelo, se ha evaluado el efecto que tiene Transferon® sobre células del sistema inmune al medir un cambio en el porcentaje y la expresión de receptores tipo Toll (TLRs) en células NK, células CD16/32, células B (CD19<sup>+</sup>) y las poblaciones de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) provenientes de ganglios inguinales [63].

Con los resultados previos aportados al utilizar el modelo murino, se planteó una metodología para complementar dicho modelo y conocer los mecanismos por los que actúa Transferon®. De este modo, se realizaron ensayos para determinar si Transferon® ejercía su acción modulando el sistema inmune bien al modificar los niveles de citocinas o con la producción de anticuerpos específicos.

Primeramente, durante la evaluación de citocinas a diferentes tiempos en el transcurso de la infección con VHS-1, como ya se describió se observó una modulación significativa al día 5 post-infección de las citocinas IL-10, IL-6, MCP-1 e IFN- $\gamma$  (fig. 21), comparando el grupo de ratones infectados que no recibieron tratamiento, contra el grupo de ratones infectados que recibieron tratamiento.

Con respecto a la disminución significativa que se presenta de IL-10, una de las funciones de esta interleucina es limitar el grado de infiltración de leucocitos en las zonas de inflamación, y es capaz de inhibir la expresión de citocinas así como de quimiocinas, entre las cuales se incluye MCP-1, cuya función es inducir la liberación de los monocitos al torrente sanguíneo, entrar en el tejido circundante y convertirse en macrófagos tisulares, se considera un potente quimiotáctico y activador de monocitos [64], por lo que al tener una disminución significativa de IL-10 se podría explicar que se obtenga a la par un incremento significativo en los

niveles de MCP-1 al día 5 post-infección (fig. 21 E). Por otro lado, se sabe que la IL-10 se encarga de regular en forma negativa la producción de IFN- $\gamma$  [64], con lo que si se encuentra disminuida la IL-10 de manera significativa esto daría como resultado un posible aumento en los niveles de IFN- $\gamma$ , tal como se obtuvo y se observa en la figura 21 F. En nuestros resultados obtuvimos una disminución en los niveles de IL-10, por lo que al no mantenerse una regulación negativa de la producción de citocinas como MCP-1 e IFN- $\gamma$ , estas tienden a aumentar en respuesta a la infección.

El aumento en los niveles de IFN- $\gamma$  a tiempos tempranos de la infección (día 5 post-infección) podría de igual manera estar induciendo la transcripción de MCP-1 [65] y por ello se observa un aumento significativo en sus niveles al día 5 post-infección (fig. 21 E). Así mismo, debido a las acciones que tiene esta citocina podría estar promoviendo la actividad citotóxica celular [65]. Las células NK activadas sirven para contener infecciones víricas mientras la respuesta inmunitaria adaptativa está generando células T citotóxicas específicas para antígeno que pueden eliminar la infección, el que se tengan linfocitos citolíticos favorece que la concentración de virus no sea demasiado alta durante los primeros días de la infección [66].

La disminución significativa de IL-6 que se presenta al día 11 post-infección, comparando el grupo de ratones infectados contra el grupo de ratones infectados que recibieron tratamiento (Fig. 21 D) nos sugiere que Transferon<sup>®</sup> tiene un efecto modulador en IL-6. Esta citocina tiene como función dirigir la activación y el tráfico de leucocitos, así como la producción de proteínas de fase aguda por los hepatocitos [65]. Además junto con la IL-4, la IL-6 inicia la maduración de linfocitos Th2 a partir de linfocitos T naïve, y en concentraciones elevadas bloquea la generación de linfocitos Th1 a partir de linfocitos T naïve. También, al igual que la IL-4, la IL-6 promueve la proliferación de linfocitos T, la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas, y la producción de IgG, IgM e IgA. Así, al estar disminuida la IL-6 se favorece que haya una disminución de la inflamación producida por la infección, y puesto que IL-6 tiene acción sobre la producción de

proteínas de fase aguda el dolor asociado a la infección viral pudiera verse reducido.

Con el análisis de los resultados obtenidos a nivel sistémico mediante un modelo murino de infección herpética cutánea se consideró detectar la respuesta que se genera a nivel de anticuerpos evaluando los niveles séricos a diferentes tiempos de la infección, además de la capacidad de neutralización que tienen hacia el virus. Puesto que se conoce que el establecimiento de una respuesta inmunológica adaptativa eficiente depende de los mecanismos celulares y humorales de la respuesta inmunológica innata, entre estos la presentación antigénica, la liberación de citocinas y la secreción de quimiocinas [64], fue que se consideró oportuno analizar la respuesta inmunológica adaptativa generada a partir de realizar el tratamiento con Transferon® llevando a cabo el modelo murino de infección herpética cutánea. Se determinaron los niveles de anticuerpos de tipo IgG e IgM en el transcurso de la infección, así como la capacidad de los anticuerpos presentes para generar un efecto de neutralización.

La determinación de anticuerpos tipo IgM e IgG totales se realizó mediante una cinética, de tal manera que se pudiera observar una respuesta favorable a la infección a causa del tratamiento con Transferon® durante los primeros días post-infección y se mantuviera a lo largo del esquema de administración establecido (fig. 12). Lo que se observó de los resultados tras analizar los datos fue que la infección per se genera una respuesta característica de lo que se ha descrito que sucede en el primer reto contra un agente infeccioso, donde los linfocitos B se activan y se transforman en células plasmáticas de vida corta que pueden producir anticuerpos IgM detectables siete días después de la infección que alcanzan su pico máximo al día 15, y enseguida aparecen otros anticuerpos, como los de clase IgG con mayor afinidad y especificidad por el antígeno [67]. La respuesta experimental que se obtuvo respecto a la infección per se fue que tanto los anticuerpos de tipo IgM como de tipo IgG aumentan conforme transcurren los días de infección sin la administración de tratamiento (fig. 22), lo cual indica una respuesta inmunológica propia ante el combate de la infección viral. Se esperaba

encontrar experimentalmente después del tratamiento con Transferon® una respuesta aumentada respecto a los niveles de anticuerpos, lo que en parte nos ayudaría a explicar la sobrevida de los animales expuestos al modelo herpético. Sin embargo, lo que se observó fue un efecto similar al de la infección per se con el tratamiento de Transferon® 0.75µg/ratón, en cambio con la dosis de Transferon® 0.50µg/ratón, mostró una respuesta menor en la producción de IgG totales al día 10 post-infección, y un aumento en los niveles de IgM durante el día 14 post-infección (fig. 22).

De acuerdo con los resultados expuestos, podría suponerse que aunque la producción de anticuerpos con el tratamiento de Transferon® 0.75µg/ratón no se ve favorecida al aumentar los niveles de anticuerpos no implica que no sean competentes para combatir la infección, ya que al revisar los resultados de neutralización podemos notar que con este tratamiento Transferon® demuestra una actividad significativa conservando un mayor porcentaje en la viabilidad de las células lo que implica un título de anticuerpos neutralizantes eficiente (fig. 23).

También, al administrar el tratamiento a la dosis de 0.5µg/ratón, se determinó que Transferon® mantiene los niveles de IgG totales por debajo de los que son producidos por la infección per se o por el tratamiento de Transferon® 0.75µg/ratón (fig. 22 B), lo cual parece tener una relación directa con los resultados expuestos por ensayo de neutralización, en donde el porcentaje de neutralización que se obtuvo con esta muestra resultó ser significativamente menor (fig. 23). Es decir, se observó que no conserva la viabilidad de las células, pero aun con ello, la supervivencia de ratones que se tiene con el tratamiento a esta concentración Transferon® es significativa.

Aunque no se observó una modulación significativamente mayor en los niveles de anticuerpos después de recibir tratamiento con Transferon® como se esperaba, los resultados demostraron que Transferon® tiene efecto significativo a nivel sistémico sobre algunas citocinas, el cual es importante para el control de la infección por VHS-1 y la supervivencia de ratones infectados.

## 10. CONCLUSIONES

Tanto la participación de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa durante una infección viral es muy importante. Por lo que, en este trabajo se propuso evaluar el efecto inmunomodulador de Transferon® a nivel sistémico en un modelo de infección herpética, mediante el análisis de citocinas proinflamatorias y anticuerpos. Con lo cual, se demostró que Transferon® tiene un efecto significativo sobre la producción de citocinas, ya que disminuye los niveles de IL-10 e IL-6, mientras que aumenta los niveles de MCP-1 e IFN- $\gamma$  durante el curso temporal de la infección. Aun cuando el tratamiento con Transferon® no parece generar un incremento significativo en los niveles de anticuerpos tipo IgM e IgG totales, ni tampoco aumentar la actividad neutralizante de los anticuerpos.

Con estos resultados podemos concluir que durante la infección con VHS-1, Transferon® produce un efecto principalmente a nivel sistémico induciendo una respuesta temprana de citocinas proinflamatorias. Sugiriendo así, que este efecto sistémico es parte del mecanismo de acción por el cual Transferon® tiene un papel protector frente a la infección herpética y favorece la supervivencia de ratones infectados.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Kirkpatrick C. H, Rozzo S J. (1992) Purification of transfer factors. *Mol. Immunol.* 29 167-82.
2. Kirkpatrick C. H. (1989) Biological response modifiers. Interferons, interleukins, and transfer factor. *Ann Allergy.* 62: 170-6.
3. Viza D., Fudenberg H. H., Palareti A., Ablashi D., De Vinci C., et al. (2013) Transfer factor: an overlooked potential for the prevention and treatment of infectious diseases. *Folia Biol (Praha)* 59: 53-67.
4. Berrón-Pérez R., Chávez-Sánchez R., Estrada-García I., et al. (2007) Indications, usage, and dosage of the transfer factor. *Revista Alergia México;* 54(4):134–139.
5. Viza D., Fudenberg H. H., Palareti A., Ablashi D., De Vinci C., Pizza G. (2013) Transfer factor: an overlooked potential for the prevention and treatment of infectious diseases. *Folia Biologica;* 59(2):53–67.
6. Krishnaveni M. (2013) A review on transfer factor an immune modulator. *Drug Invention Today;* 5(2):153–156.
7. Ojeda M. O., Fernández-Ortega C., Rosaínz M. D. J. A. (2000) Dialyzable leukocyte extract suppresses the activity of essential transcription factors for HIV-1 gene expression in unstimulated MT-4 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications;* 273(3):1099–1103.
8. Navarro Cruz D., Serrano Miranda E., Orea S. E. P. M., Teran Ortiz L., Gomez Vera J., Flores Sandoval G. (1996) Transference factor in moderate and severe atopic dermatitis. *Revista Alergia México;* 43(5):116–123.
9. Pizza G., De Vinci C., Conte G. L., et al. (2001) Immunotherapy of metastatic kidney cancer. *International Journal of Cancer;* 94(1):109–120.

10. Pizza G., de Vinci C., Viza D. (2002) Immunotherapeutic approaches for renal cancer. *Folia Biologica*; 48(5):167–181.
11. Landstainer K., Chase M. W. (1942) Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. *Proc Soc Exp Biol Med* 49: 688-90.
12. Lawrence H. S. (1949) The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man. *Proc Soc Exp Biol Med*. 71: 516519.
13. Lawrence H. S. (1955) The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leukocytes. *J Clin Invest*. 34: 219.
14. Ascher MS, Schneider WJ, Valentine FT, Lawrence HS. (1974) In vitro properties of leukocyte dialysates containing transfer factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 1178-82
15. Spitler L. E. (1979) Transfer factor in immunodeficiency diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 332: 228-35.
16. Alvarez T, Kirkpatrick C. H. (1996) Profiles of cytokines production in recipients of transfer factors. *Biotherapy*. 9 (1-3):55-9
17. Levin A. S. (1970) Wiskott-Aldrich syndrome, a genetically determined cellular immunology deficiency: clinical and laboratory responses to therapy with transfer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 67: 821-8
18. Fernandez O. C. (1996) Inhibition of in vitro HIV infection by dialyzable leucocyte extracts. *Laboratory for AIDS Research* 9: 33-40.
19. Wolf RE, Fudenberg HH, Welch TM, Spitler LE, Ziff M. (1977) Treatment of Bechcet's syndrome with transfer factor. *JAMA* 238: 869-71
20. Rapaport F. T, Lawrence H. S, Millar J. W, Pappagianis D, Smith C. E. (1959) Transfer of delayed hypersensitivity to coccidioidin in man. *J Immunol* 84: 358-67

21. Sousa MD, Cochran R, Mackie R, Parratt D, Arala-Chaves M. (1976) Chronic mucocutaneous candidiasis treated with transfer factor. *Br J Dermatol* 94: 79-83
22. Masi M, De Vinci C, Baricordi OR. (1996) Transfer factor in chronic mucocutaneous candidiasis. *Biotherapy* 9: 97-103
23. Estrada P. S, Chávez S. R, Ondarza A. R, Correa M. B, Serrano M. E, Monges N. A, Calva P. C. (1995) Immunotherapy with transfer factor of recurrent herpes simplex type I. *Arch Med Res.* 26: 87-92
24. Estrada P. S, Cabezas Q. R. (1990) Inmunoterapia con Factor de Transferencia en pacientes con herpes zoster. *Biología aplicada.*
25. Sumiyama K, Kobayashi M, Miyashiro E, Koike M. (1991) Combination Therapy with Transfer Factor and High Dose Stronger Neomycin in Chronic Hepatitis B Children (HBe Ag Positive) *Acta Paediatr Jpn.* 33: 327-34
26. Mendes E. (1979) Transfer of delayed hypersensitivity to leishmanin (Montenegro reaction). *Cell Immunol* 42: 424-7
27. Estrada P. S, Velasco C. O, Rébora F. (1983) Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada con factor de transferencia específico. *Salud Pública de México* 25: 589-99
28. Rubinstein A, Melamed J, Rodescu D, Murphy RA, Brocker D. (1977) Transfer factor treatment in a patient with progressive tuberculosis. *Clin Immunol Immunopathol* 8: 39-50
29. Hastings RC, Morales MJ, Shannon EJ, Jacobson RR. (1976) Preliminary results on the safety and efficacy of transfer factor in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 44: 275
30. Kirkpatrick C. H, Gallin J. I. (1974) Treatment of infections and neoplastic diseases with transfer factor. *Oncology* 29 46-73

31. Cabezas Q. R, Estrada P. S, Sellman M, Fernandez O. C. (1997) El Factor de Transferencia como Inmunomodulador en el asma bronquial extrínseca II. Estudio de 150 casos.
32. Rodríguez F. A, Serrano M. E, Estrada P. S. (2002) El efecto terapéutico del factor de transferencia en el tratamiento de pacientes con dermatitis atópica grave. *Alergia, asma e inmunología pediátricas* 11: 9-11
33. Navarro C. D, Serrano M. E, Modesto O. S, Estrada P. S, Teran O. L, Gómez V. J, Flores S. G. (1996) Factor de transferencia en dermatitis atópica moderada y severa, *Revista alergia México*.
34. Huerta L. J. (2002) Factor de transferencia: Una alternativa en el tratamiento de las enfermedades alérgicas. *Rev Alerg Asma Inmunol Pediatr* pp. 4. México
35. Ojeda O. M, Fernandez O. C, Arana R. M. (1996) Dialysable leucocyte extract (DLE) reduce lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor secretion in human leucocytes, *Biotherapy* 19; 9(1-3):163-70. 85
36. Pilotti V, Mastroilli M, Pizza G, De Vinci C, Busutti L, Palareti A, Gozzetti G, Cavallari A. (1996) Transfer Factor as an adjuvant to non-small cell lung cancer (NSCLC) therapy. *Biotherapy* 9: 117-21.
37. Pizza G, De Vinci C, Cuzzocrea D, Aiello E, Maver P, Corrado G, Romagnoli P, Dragoni E, LoConte G, Riolo U. (1996) A preliminary report on the use of transfer factor for treating stage D3 hormone-unresponsive metastatic prostate cancer. *Biotherapy* 9: 123-32
38. Abramson A, Khan A, Tate GW, Jr., Martin RG, Hill NO. (1980) Immunocompetence and transfer factor therapy in uveitis. *Br J Ophthalmol* 64: 332-8
39. Kaminkova J, Lange CF. (1984) Transfer factor and repeated otitis media. *Cell Immunol* 89: 259-64

40. Medina-Rivero, E., Merchand-Reyes, G., Pavón, L., Vázquez-Leyva, S., Pérez-Sánchez, G., Salinas-Jazmín, N., Estrada-Parra, S., Velasco-Velázquez, M. and Pérez-Tapia, S.M. (2014) Batch-to-Batch Reproducibility of Transferon™. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88, 289-294.
41. Salinas-Jazmín, N., Estrada-Parra, S., Becerril-García, M., Limón-Flores A., Vázquez-Leyva, S., Medina-Rivero, E., Pavón, L., Velasco-Velázquez, M. and Pérez-Tapia, S. M. (2015) Herpes Murine Model as a Biological Assay to Test Dialyzable Leukocyte Extracts Activity. *Journal of Immunology Research*, Vol. 2015, ID 146305, 1-9.
42. Medina-Rivero E., Vallejo-Castillo L., Vázquez-Leyva S., Pérez-Sánchez G., Favari L., Velasco-Velázquez M., Estrada-Parra S., Pavón L. and Pérez-Tapia S. M. (2016) Physicochemical Characteristics of Transferon<sup>f</sup> Batches. *BioMed Research International*, Vol.2016, ID 7935181, 8 pags.
43. Homberg, T., Sáenz, V., Galicia-Carreón, J., Lara, I., Cervantes-Trujano, E., Andaluz, M.C., Vera, E., Pineda, O., Ayala-Balboa, J., Estrada-García, A., Estrada-Parra, S., Pérez-Tapia, M. and Jiménez-Martínez, M.C. (2015) The Adverse Event Profile in Patients Treated with Transferon™ (Dialyzable Leukocyte Extracts): A Preliminary Report. *Pharmacology & Pharmacy*, 6, 65-74.
44. Estrada-Parra, S., Nagaya, A., Serrano, E., Rodriguez, O., Santamaria, V., Ondarza, R., Chavez, R., Correa, B., Monges, A., Cabeza, R., Calva, C. and Estrada-Garcia, I. (1998) Comparative Study of Transfer Factor and Acyclovir in the Treatment of Herpes Zoster. *International Journal of Immunopharmacology*, 20, 521-535.
45. Luna-Baca, G.A., Linares, M., Santacruz-Valdes, C., Aguilar-Velazquez, G., Chavez, R., Perez-Tapia, M., Estrada-Garcia, I., Estrada-Parra, S. and Jimenez-Martinez, M.C. (2007) Immunological Study of Patients with Herpetic Stromal Keratitis Treated with Dialyzable Leukocyte Extracts. 13th

International Congress of Immunology-ICI, Proceedings Immunology, Rio de Janeiro, 21-25 August 2007, 67-70.

46. Meduri R, Campos E, Scorolli L, De Vinci C, Pizza G, Viza D. (1996) Efficacy of transfer factor in treating patients with recurrent ocular herpes infections. *Biotherapy*; 9(1-3):61-6.
47. Pizza G, Viza D, De Vinci C, Palareti A, Cuzzocrea D, Fornarola V, et al. (1996) Orally administered HSV-specific transfer factor (TF) prevents genital or labial herpes relapses. *Biotherapy*; 9(1-3):67-72.
48. Knipe, D. and Howley P. *Fields virology* 6th ed. Vol. 2 (2013). Lippincott Williams & Wilkins
49. Haarr L, Skulstad S. (1994) The herpes simplex virus type 1 particle: structure and molecular functions. *APMIS* 102: 321-346
50. Heine JW, Honess RW, Cassai E, Roizman B. (1974) Proteins specified by herpes simplex virus XII. The virion polypeptides of type 1 strains. *J. Virol.* 14:640-651.
51. Honess RW, Roizman B. (1973) Proteins specified by herpes simplex virus. XI. Identification and relative molar rates of synthesis of structural and non-structural herpesvirus polypeptides in infected cells. *J. Virol.* 12:1346-1365.
52. Ward PL, Roizman B. (1994) Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen. *Trends in genetics* 10:267-274.
53. Roizman B, Sears AE. (1996) Herpes simplex viruses and their replication. En: *Fields Virology, Third Ed.*, Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1-2295.
54. Angello R, Retamal-Díaz, Paula A, Suazo, Ignacio Garrido, Alexis M, Kalergis y Pablo A. González (2014) Immune evasion by herpes simplex virus *Rev Chilena Infectol* 2015; 32 (1): 58-70.

55. Charlotte Mahiet, Ayla Ergani, Nicolas Huot, Nicolas Alende, Ahmed Azough, Fabrice Salvaire, Aaron Bensimon, Emmanuel Conseiller, Simon Wain-Hobson, Marc Labetoulle, and Sébastien Barradeau (2012) Structural Variability of the Herpes Simplex Virus 1 Genome In Vitro and In Vivo. *Journal of Virology* p. 8592–8601 Volume 86 Number 16.
56. Ellermann-Eriksen (2005) Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus *Virology Journal* 2005, 2:59.
57. Becton, Dickinson and Company. Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit Instruction Manual, BD™ (2008).
58. PRODUCT INFORMATION & MANUAL. Mouse IgG total Ready-SET-Go!® 88-50400. affymetrix eBioscience (2014).
59. PRODUCT INFORMATION & MANUAL. Mouse IgM Ready-SET-Go!® 88-50470. affymetrix eBioscience (2014).
60. Converting TCID50 to plaque forming units PFU-124 (2012, July 25). Recuperado de <https://www.atcc.org/Global/FAQs/4/8/Converting%20TCID50%20to%20plaque%20forming%20units%20PFU-124.aspx>
61. Heldt C. L., Hernandez R., Mudiganti U., Gurgel P. V., Brown D. T., Carbonell R. G. (2006) A colorimetric assay for viral agents that produce cytopathic effects. *Journal of Virological Methods* 135, 56–65.
62. Deshpande SP, Kumaraguru U, Rouse BT (2000) Dual role of B cells in mediating innate and acquired immunity to herpes simplex virus infections. *Cell Immunol* 202:79–87. doi:10.1006/cimm.2000.1666.
63. González A., E. (2015) Actividad inmunomoduladora de TRANSFERON® (Extracto Dializable de Leucocitos) en un modelo de infección herpética con el virus herpes simplex tipo 1. Tesis Lic. Q.F.B. México, UNAM, Fac. Quím. 88 p.

64. Sanchez G., A. y Becerril G., M. A. (2016) Respuesta inmunológica a virus. En: Pavón R., L., Jiménez M., M. y Garcés A., M. Inmunología molecular, celular y traslacional. Wolters Kluwer, Philadelphia, pp.1-689.
65. Montaña E., L. F. y Rendón H., E. P. (2016) Citocinas. En: Pavón R., L., Jiménez M., M. y Garcés A., M. Inmunología molecular, celular y traslacional. Wolters Kluwer, Philadelphia, pp.1-689.
66. Kenneth Murphy, Paul Travers y Mark Walport. Inmunobiología de Janeway. Séptima edición, Mc Graw Hill México (2009).
67. Pérez T., S. M., Robledo A., F. H. y Hernández F., M. (2016) Características generales de la respuesta inmunológica. En: Pavón R., L., Jiménez M., M. y Garcés A., M. Inmunología molecular, celular y traslacional. Wolters Kluwer, Philadelphia, pp.1-689.