

24/166



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

**INTERFERENCIA A LA INFECCION "IN VITRO"
DEL VIRUS HERPES SIMPLE TIPO 1 POR
CELULAS MONONUCLEARES HUMANAS**

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

JULIO RAUL SANTIAGO CRUZ



1984



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO.

Abreviaturas	i
Lista de tablas	ii
Lista de figuras	iii
Resumen	iv
Introducción.	
1. Sistema inmune	1
2. Interacción virus-sistema inmune	6
3. Virus de herpes	7
4. Virus herpes simple tipo 1	9
5. Participación del sistema inmune en el control de las infecciones por herpes simple tipo 1	11
6. Estudio de la participación del sistema inmune en la infección por herpes	11
Antecedentes	12
Hipotesis de trabajo	13
Objetivo	13
Materiales y métodos.	
Materiales biológicos	14
Descongelamiento de células	15
Desprendimiento y separación celular en un cultivo de superficie	15
Conteo y determinación de la viabilidad celular	16
Control de líneas celulares	17
Congelamiento de células	18
Propagación del HSV-MP	19
Titulación del HSV-MP	20
Obtención del complemento	23
Titulación del complemento	23
Efecto del complemento en la neutralización del HSV-MP por anticuerpos del plasma humano	26
Titulación de los anticuerpos neutralizantes anti-HSV-1	29
Obtención de células mononucleares humanas (CM)	29
Efecto de las CM en la multiplicación del HSV-MP en células Vero y OMK	31
Resultados.	
Preparación del modelo experimental	35
Cinética de crecimiento de las líneas celulares	35
Desprendimiento celular	37
Conteo celular	40
Cosecha y título del HSV-MP	41
Estabilidad del HSV-MP conservado en nitrógeno líquido	43
Efecto de la temperatura sobre el HSV-MP	46
Efecto del complemento en la neutralización del HSV-MP por anticuerpos del plasma humano	46
Título de los anticuerpos neutralizantes anti-HSV-MP en los plasmas humanos	51
Separación de CM	54
Efecto de las CM en células Vero y OMK infectadas con HSV-MP	54
Comparación entre el título de anticuerpos neutralizantes y el efecto protector "in vitro" de las CM	62

Discusión	63
Cinética de crecimiento celular	64
Desprendimiento celular	65
Propagación del HSV-MP	65
Efecto de la temperatura sobre la infectividad del HSV-MP	66
Efecto del complemento en la titulación de anticuerpos neutralizantes	66
Titulación de anticuerpos neutralizantes anti-HSV-MP	66
Efecto de las CM en la infección "in vitro" del HSV-1	67
Conclusiones	70
Apéndice	
Reactivos	71
Preparación de las soluciones de trabajo	72
Bibliografía	78

ABREVIATURAS

ADCC
BB
BSF
BSF-LCM

CAN
CM
Fc.
FIM
g
HSV-1
HSV-MP
IMC
Inc
Log
It
MCC
MCI
MEMD
mg
ml
MOI
 μ g
 μ m
N
nm
No. DE CAT.
No. DE CON.
No. de L.
OMK
PMN
SFT
SH
ST
ufp
UH_{50C}
UI
Vero

CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS
BUFFER DE BARBITAL
BUFFER SALINO DE FOSFATOS
BUFFER SALINO DE FOSFATOS LIBRE DE CALCIO Y MAGNESIO
CELULAS ASESINAS NATURALES
CELULAS MONONUCLEARES
FRACCION CRISTALIZABLE DE UN ANTICUERPO
FACTOR INHIBITORIO DE LA MIGRACION
GRAVEDADES
HERPES SIMPLE TIPO 1
HERPES SIMPLE CEPA MACROPLAQUE
INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS
INCONTABLES
LOGARITMO
LITRO
MEDIO DE CULTIVO COMPLETO
MEDIO DE CULTIVO INCOMPLETO
MEDIO EAGLE MODIFICADO POR DULBECCO
MILIGRAMO
MILILITROS
MULTIPPLICIDAD DE INFECCION
MICROGRAMOS
MICROMETROS
NORMAL
NANOMETROS
NUMERO DE CATALOGO
NUMERO DE CONTROL
NUMERO DE LOTE
OLD MONKEY KIDNEY
POLIMORFONUCLEARES
SUERO FETAL DE TERNERA
SUERO HUMANO
SUERO DE TERNERA
UNIDADES FORMADORAS DE PLACA
UNIDADES HEMOLITICAS AL 50% DE COMPLEMENTO
UNIDADES INTERNACIONALES
LIVEA CELULAR OBTENIDA DE RINON DE *Cercopithecus aethiops*.

LISTA DE TABLAS.

1. Importancia relativa de la respuesta inmune humoral o celular en la resistencia a diferentes tipos de infecciones virales	8
2. Condiciones requeridas por las líneas celulares OMK y Vero para cubrir con monocapa celular una superficie de 25 cm ²	36
3. Condiciones requeridas por las líneas celulares OMK y Vero para cubrir con monocapa celular una superficie de 3 cm ²	38
4. Diferencias en el desprendimiento y separación de las células OMK y Vero	39
5. Títulos del HSV-MP 3er pase en OMK y 3er pase en Vero	42
6. Estabilidad a -196° C del HSV-MP 3er pase en Vero y 3er pase en OMK	44
7. Efecto de la temperatura sobre una suspensión de HSV-MP	47
8. Efecto del complemento en la neutralización del HSV-1 por anticuerpos del plasma humano	49
9. Neutralización del HSV-MP con los plasmas de 13 muestras de sangre humana	52
10. Efecto de las CM de un individuo con infección activa de HSV-1 en la multiplicación "in vitro" del virus	56
11. Efecto de las CM de un individuo sin infección activa de HSV-1 en la multiplicación "in vitro" del virus	57
12. Efecto de las CM en la multiplicación del HSV-1 en OMK	60
13. Efecto de las CM en la multiplicación del HSV-1 en Vero	61
14. Comparación entre el título de anticuerpos neutralizantes y el efecto protector "in vitro" de las CM	62

LISTA DE FIGURAS.

1. Participación de los componentes de la respuesta inmune durante el desarrollo de una infección viral	3
2. Disposición de las diluciones virales en una caja Limbro de 24 pozos, para la titulación del HSV-MP	21
3. Disposición de las diluciones de dos plasmas humanos en cada una de las cajas Limbro usadas para la prueba de neutralización viral a diferentes concentraciones de complemento	28
4. Disposición de las CM y de las diluciones del HSV-MP en una caja Limbro para observar el efecto de las CM en la infección viral ..	33
5. Condiciones requeridas por las líneas celulares OMK y Vero para confluir en una superficie de 25 cm ²	36
6. Condiciones requeridas por las líneas celulares OMK y Vero para confluir en una superficie de 3 cm ²	38
7. Producción viral	42
8. Estabilidad del HSV-MP a -196°C	45
9. Efecto de la temperatura sobre el HSV-MP (gráfica)	47
10. Efecto de la temperatura sobre el título del HSV-MP(fotografía)..	48
11. Efecto del complemento en la neutralización del HSV-1 por anticuerpos del plasma humano	50
12. Efecto de las CM de un individuo con infección activa de HSV-1 en la multiplicación "in vitro" del virus	58
13. Efecto de las CM de un individuo sin infección activa de HSV-1 en la multiplicación "in vitro" del virus	59

RESUMEN.

SE ESTUDIO EL EFECTO DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA DE 13 SUJETOS, EN LA MULTIPLICACION "IN VITRO" DEL VIRUS HERPES SIMPLE TIPO 1, CEPA MACROPLAQUE. PARA ESTO SE AGREGARON LAS CELULAS MONONUCLEARES DE SUJETOS CON O SIN INFECCION ACTIVA DE HERPES, A CELULAS BLANCO, ONK Y Vero, INFECTADAS CON EL VIRUS, EN UNA PROPORCION DE 5:1 CELULAS MONONUCLEARES-CELULAS BLANCO.

LAS CELULAS MONONUCLEARES DE SUJETOS CON INFECCION ACTIVA O LATENTE PROTEGEN "IN VITRO" DE LA INFECCION VIRAL; ESTA PROTECCION ES INDEPENDIENTE DE LA LINEA CELULAR UTILIZADA. LA MAGNITUD DE LA PROTECCION DE LA PROTECCION DEPENDE DE LA PRESENCIA Y DE LA FRECUENCIA DE LA LESION. SUJETOS CON INFECCION ACTIVA Y MUY FRECUENTE (3 a 4 VECES/AÑO) DAN LA PROTECCION MAS ALTA (60 a 75%), SUJETOS CON INFECCION ACTIVA Y MENOS FRECUENTE (1 a 2 VECES/AÑO) PRESENTAN PROTECCION INTERMEDIA (40 a 55%), EN CAMBIO SUJETOS CON INFECCION LATENTE Y OCASIONAL (0 a 1 VEZ/AÑO) PRESENTAN PROTECCION BAJA (12 a 30%) Y NO PRESENTAN PROTECCION LOS SUJETOS CON INFECCION LATENTE Y FRECUENCIA DE LESION ESPORADICA (UNA CADA 3 a 4 AÑOS).

NO SE ENCONTRO RELACION ENTRE LA PROTECCION "IN VITRO" A LA INFECCION Y EL TITULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES EN EL PLASMA.

INTRODUCCION.

Durante una infección viral la participación de los diferentes componentes del sistema inmune depende de gran parte del virus y la interacción que presenta con las células hospederas.

Se describen a continuación; el sistema inmune, los tipos de interacción virus-sistema inmune, los virus de herpes, el herpes simple tipo 1 y la participación del sistema inmune en las infecciones por este virus.

1.- SISTEMA INMUNE

El sistema inmune esta compuesto por células y factores solubles y la participación de cada uno de ellos en la eliminación del virus infectante y de las células infectadas puede ser de dos tipos: inespecíficos y específicos.

a) Inespecíficos. Los mecanismos no específicos no requieren una sensibilización previa y pueden actuar en el momento en que se presenta una infección viral, aún durante una primera exposición estos mecanismos son los siguientes:

Humorales:

Complemento
Interferón.

Celulares:

Macrófagos
Polimorfonucleares
Asesinas naturales

b) Específicos. Los mecanismos inmunes de carácter específico actúan durante una segunda exposición y no a la primera ya que durante esta se estimulan y generan. Estos mecanismos son los siguientes:

Dependientes de anticuerpos:

Neutralización

Citotoxicidad por anticuerpos

Citotoxicidad celular - Macrófagos

- Polimorfonucleares

- Células asesinas.

Mediados por células

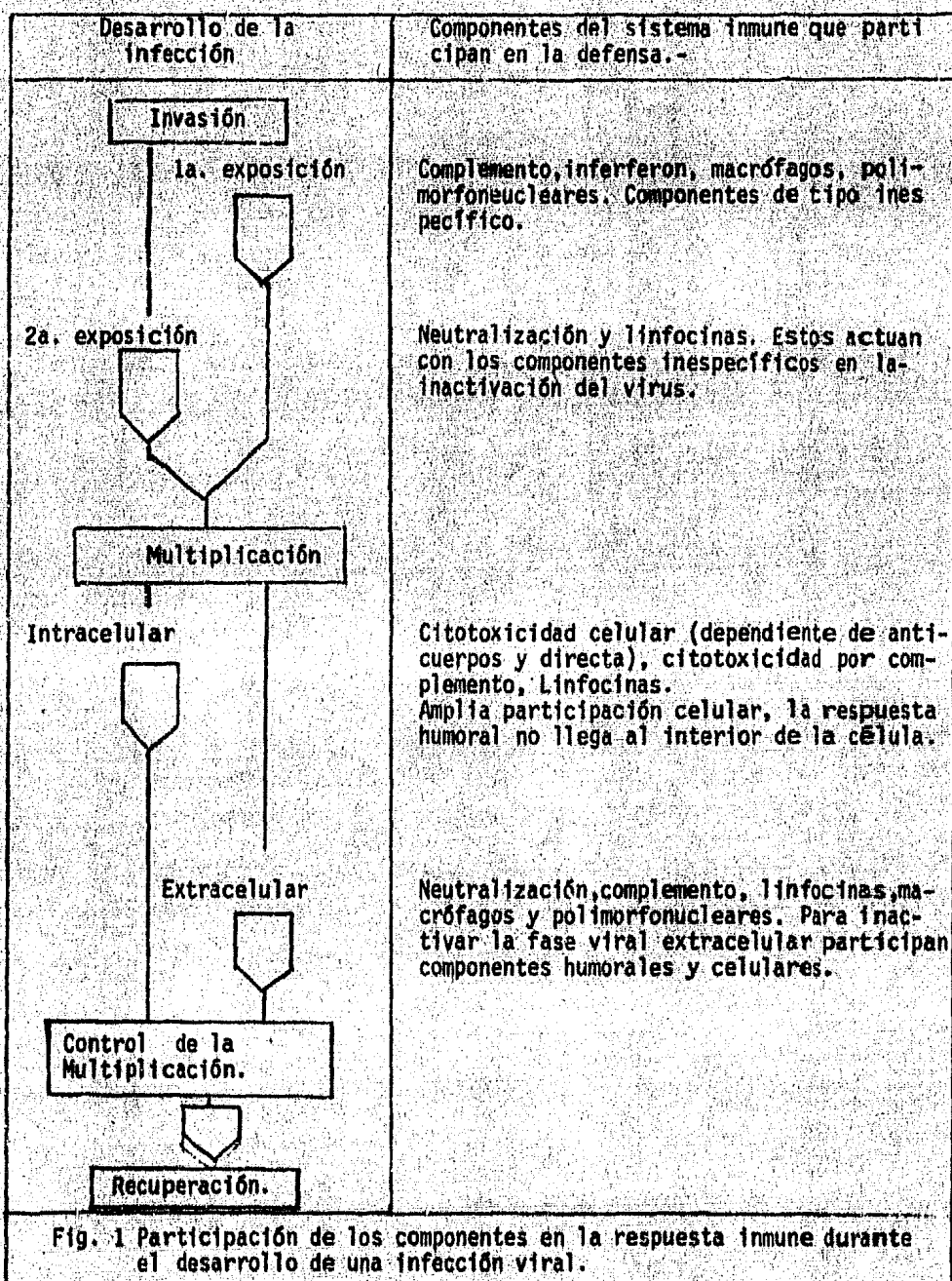
Citotoxicidad, Células T.

Linfocinas, γ -Interferon, Activadores de
Macrófagos y Linfotoxinas.

En la figura 1 se muestra esquemáticamente en que pasos de la infección viral intervienen los componentes del sistema inmune y a continuación se hace una breve exposición del mecanismo por el cual actúa cada uno de ellos:

Complemento.- Este sistema es un conjunto de proteínas séricas que pueden actuar en una variedad de mecanismos. En el caso de infecciones virales se ha visto que es capaz de ser activado por complejos antígeno anticuerpo, proteínas virales y lípidos de lipopolisacáridos, la activación del complemento prepara una serie de mecanismos terminales importantes para la respuesta inmune estas son: la generación de un complejo capaz de lisar membranas celulares, la liberación de histaminas, promoción de la quimiotaxis de leucocitos, producción de opsoninas que facilitan la unión de antígenos a los linfocitos o macrófagos y la inhibición de la migración de los macrófagos. Por otra parte el complemento es capaz de amplificar en cierta medida, la neutralización viral por anticuerpos con y sin virolisis, puede cooperar con los anticuerpos para lisar células infectadas y además, se ha visto también, puede facilitar que las células infectadas sean lisadas por leucocitos polimorfonucleares (13)

Interferón. Se denomina Interferón a un grupo de proteínas solubles



codificadas por la célula y cuya síntesis se activa con diferentes estímulos, entre ellos la infección viral.

Estas proteínas son capaces de:

- a) Interferir en la duplicación viral sin inactivar directamente los viriones.
- b) No ejercer un efecto tóxico en las células como mecanismo para limitar el crecimiento viral.
- c) Inhibir un número amplio de virus no relacionados.
- d) Tener un efecto intracelular.

El interferón comprende una familia de proteínas que pueden ser agrupadas en tres tipos, de acuerdo a la clase de célula que lo sintetiza y al estímulo que provoca su síntesis. Los tres tipos se denominan interferón α , β y γ . Se conoce como interferón α al sintetizado por fibroblastos, β al secretado por linfocitos, ambos ante un estímulo viral. El interferón γ es producido por linfocitos sensibilizados ante un estímulo antigénico (3).

Macrófagos (MAC) y Polimorfonucleares (PMN)..- Estas células son capaces de fagocitar inespecíficamente los virus y destruirlos directamente. También actúan en coordinación con anticuerpos anti-virales, cuando éstos han reaccionado con antígenos virales expresados en la membrana de células infectadas y lisan a la célula infectada (1). Así mismo, los macrófagos pueden ser activados, por linfocitos T, para que destruyan las células infectadas (50).

Células asesinas naturales (CAN)..- Se ha encontrado una población de linfocitos capaces de lisa espontáneamente células infectadas con virus así como células tumorales. Estos linfocitos no se encuentran aún suficientemente caracterizados y las pruebas en que se demuestra su citotoxicidad se han realizado "in vitro" (29)

Neutralización..- Después de una exposición a antígenos virales, las

células plasmáticas, producto de la diferenciación de linfocitos B, son capaces de secretar anticuerpos específicos para los antígenos virales. Estos anticuerpos pueden prevenir la adsorción del virus a la membrana celular de tres maneras diferentes:

- a) por unión a sitios críticos del virus.
- b) al provocar agregación de las partículas virales ó
- c) mediante una alteración de las cargas en la superficie del viron.

Por otro lado, pueden también favorecer la fagocitosis y destrucción del virus por las células fagocíticas.

La neutralización de los virus se lleva a cabo en el medio extracelular, de modo que sólo afecta a los viriones liberados de las células. Los anticuerpos también pueden provocar la lisis celular mediada por complemento de células infectadas que expresan en su superficie antígenos virales. Para que este mecanismo pueda operar se requiere: una alta concentración de anticuerpos, una cantidad suficiente de antígeno viral expresado en la membrana de la célula y que éste antígeno se encuentre en una configuración reconocible por el anticuerpo (13)

Linfocinas.- Las células T pueden interferir indirectamente con la multiplicación viral. Para ésto se valen de mediadores químicos los cuáles pueden reaccionar con los antígenos virales de superficie, que aparecen en la membrana de la célula infectada. Estos mediadores pueden estimular nuevos linfocitos para que participen en la respuesta inmune, pueden retener a las células inflamatorias en el tejido infectado (FIM) y pueden activar a los macrófagos (3). El interferón γ también se agrupa junto a éstas sustancias, lo mismo que las linfotoxinas o factores solubles capaces de dañar la membrana de células infectadas y provocar la lisis celular.

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).- Aunque los anticuerpos no pueden neutralizar directamente a los virus que se encuentran en el interior de las células, pueden unirse a los antígenos de

superficie codificados por el virus y en cooperación con diferentes células efectoras, dar lugar a la lisis de la célula infectada. A este mecanismo se le llama citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y tiene las características siguientes; la célula efectora (MAC, PMN y Asesina) debe poseer receptores capaces de unirse a la porción Fc de los anticuerpos unidos a la superficie celular y la lisis citotóxica se lleva a cabo en una fase muy temprana de la infección celular, antes de que el virus se disemine. (1,50)

Citotoxicidad Celular.- Otro tipo de células capaces de detener la multiplicación viral y la dispersión son los linfocitos T, los cuales pueden lizar directamente células infectadas por virus. Esta lisis se lleva a cabo mediante conocimiento directo, por parte del linfocito, de los antígenos virales de la superficie de la célula blanco (1). Esta citotoxicidad está restringida por requerir el conocimiento simultáneo de los antígenos virales y de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, el H-2 en ratones y el HLA en humanos (50,51)

2.- INTERACCION VIRUS-SISTEMA INMUNE. La interacción entre el virus y el sistema inmune depende en gran parte del tipo de virus infectante, a grandes rasgos se pueden considerar 4 diferentes interacciones (35):

a) Algunos virus producen infecciones que origina respuesta citolítica en un tiempo corto, la multiplicación viral en la célula huésped cambia completamente el metabolismo celular lisándola, la progenie sale al espacio extracelular donde se pone en contacto con los anticuerpos los cuales inactivan el virus evitando así su diseminación. Prototipo de esta interacción son los enterovirus, el caso más estudiando es el virus de la poliomielitis.

b) Cuando una infección viral no lleva rápidamente a la lisis celular y se tiene una producción significativa de virus durante varias generaciones, se considera que hay interacción de equilibrio con fase extracelular. El virus de la rubeola es un representante de esta cla-

se. En este tipo de infección para eliminar el agente se requiere tanto la participación de la respuesta humoral para inactivar al virus extracelular, así como la respuesta celular que se encarga de lisis a las células infectadas.

c) El tercer tipo de interacción virus célula huésped implica también una situación de equilibrio que se caracteriza por la diseminación de la infección viral de célula en célula sin fase viral extracelular. El caso clásico es la infección por HSV en las células nerviosas, la infección viral se lleva a cabo en presencia de una alta concentración de anticuerpos circulantes.

d) Existe además otra forma de interacción virus-célula que es la integración, durante la cual el virus no expresa su genoma por completo sino que permanece en forma latente y se transmite de generación en generación. Un virión de este tipo es el SV 40. Una posible forma de eliminar la infección por parte del organismo afectado es mediante una respuesta celular que sea específica en contra de los antígenos virales que la célula expresa en la membrana.

En la tabla 1 se muestra las características de los diferentes tipos de interacciones y la participación de la respuesta humoral y celular en cada uno de ellos (35)

3.- VIRUS DE HERPES. - El grupo de virus de Herpes es muy extenso, se han reportado más de 70 diferentes virus que pueden ser incluidos en él. Como virus de Herpes se entiende: virus de eucariontes que tienen ADN de doble cadena lineal con un peso molecular mayor de 80×10^6 daltones que se multiplican en el núcleo de las células infectadas, que se ensamblan en icosaedros de 100 nm de diámetro, cuya cápside tiene 162 capsómeros y tienen envoltura de glicoproteínas y lípidos (24)

Los virus de Herpes se han encontrado en una variedad de huéspedes tales como: ostras, hongos, peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Un mismo huésped puede ser infectado por varios virus de

Tabla 1 Importancia relativa de la respuesta inmune humoral o celular en la resistencia a diferentes tipos de infecciones virales.

Tipo	Presencia de fase viral extracelular.	Ejemplo	Importancia del tipo de respuesta.	
			Humoral	Celular
Lítico	+	polio	+++	0
De equilibrio	+	rubeola	++	++
De equilibrio	-	herpes simple	+	+++
De integración	-	SV-40	+	+++

herpes, ocasionando diferentes tipos de enfermedad, es frecuente en los virus de herpes el persistir en el huésped natural después de la primera infección originando una infección latente.

El hombre puede ser infectado por cinco diferentes virus de herpes; Herpes simple tipo 1, Herpes simple tipo 2, Herpes zoster, Citomegalovirus y Epstein-Barr. Estos virus pueden ser divididos en tres grupos según el tipo de células que infectan, la persistencia en el huésped y los efectos que ocasionan. En el primer grupo se tienen virus que causan enfermedades benignas autolimitantes en el huésped natural adulto, pero que ocasionan infecciones generalizadas en neonatos o adultos inmunodeficientes, en este grupo se tiene a los citomegalovirus.

El segundo grupo se le denomina linfotrópicos debido a que persisten en los linfocitos, el Epstein-Barr pertenece a este grupo, por lo general ocasionan una infección leve pasajera, sin embargo pueden producir linfomas en presencia de otros factores de tipo genético, ambiental, etc. El tercer grupo origina infecciones de la piel o del tracto respiratorio, estos virus persisten en forma latente en el sistema nervioso central y presentan recurrencias periódicas que generalmente son benignas, sin embargo pueden ocasionar infecciones severas en neonatos y adultos inmunodeprimidos; en este grupo tenemos al Herpes simple tipo 1, Herpes simple tipo 2 y Varicela zoster (16,30)

4.- VIRUS HERPES SIMPLE TIPO 1.- El hombre es el huésped del virus Herpes simple. Sin embargo los modelos experimentales como el cobayo, conejo y ratones pueden ser infectados por él, aunque ninguno de ellos muestra una reactivación en forma natural como ocurre en humanos. En estos modelos se ha estudiado ampliamente el mecanismo de latencia y reactivación, sin embargo aún no es posible integrar todos los resultados en un modelo congruente, pero si es posible establecer a ciencia cierta los siguientes puntos:

- 1) Los anticuerpos anti-HSV no son capaces de eliminar la fase aguda de la infección ganglionar ni de evitar la reactivación del virus (23, 15)
- 2) La transferencia de linfocitos en ratones muestra una clara protección en contra de HSV 1 (15)
- 3) La transferencia de inmunoglobulinas (inmunidad pasiva) no protege de la infección (23)
- 4) Se transmite intercelularmente a través de puentes citoplásmicos. (20)

Herpes labialis es una infección ocasionada por herpes simple tipo I por lo general son infecciones mucocutáneas localizadas y benignas, el virus coloniza los ganglios produciendo infección aguda que desaparece, pero el virus permanece en forma latente en las neuronas, periódicamente se reactiva y produce lesiones en el lugar de la primera infección aunque muchas de las reactivaciones son asintomáticas. La infección presenta las siguientes características.

- a) Se adquiere en los primeros años y es una infección con un alto índice de incidencia, se considera que de un 70 a 80% de la población tiene anticuerpos contra este virus, la incidencia depende del nivel socioeconómico, a más bajo nivel mayor incidencia. De los sujetos infectados aproximadamente un 15% presentan en el transcurso de su vida lesiones recurrentes en el mismo sitio, estas lesiones por lo general son localizadas pero en neonatos o inmunosuprimidos puede diseminarse el virus originando una infección sistémica con consecuencias fatales (30).
- b) Los individuos con inmunodeficiencias presentan lesiones severas (30).
- c) Puede aislarse de ganglios nerviosos de sujetos que presentan lesiones herpetiformes (23,48).
- d) Los estímulos tales como la inmunosupresión, el tratamiento hormonal, el stress, la menstruación o la exposición a la luz ultravioleta desequilibran el estado de latencia e inducen la multiplicación

reapareciendo las lesiones que generalmente son benignas y localizadas (33).

5.- PARTICIPACION DEL SISTEMA INMUNE EN EL CONTROL DE LAS INFECCIONES POR HERPES SIMPLE TIPO 1 .-

Los diferentes componentes del sistema inmune participan en controlar la infección por el virus herpes simple tipo 1 y la contribución e interacción de cada uno de los componentes depende de la vía que utiliza el virus para su diseminación en el organismo.

La célula infectada puede lisarse y de esa manera permitir la salida de los virus, al espacio extracelular, los cuales al ponerse en contacto con los anticuerpos son neutralizados.

El virus de herpes también puede transmitirse por vía intercelular, mediante puentes citoplásmicos, en este tipo de diseminación el anticuerpo no tiene acceso directamente al virus, sin embargo sí participa en el control de la infección viral ya que el HSV induce cambios en la membrana de la célula infectada y esta adquiere antígenos virales a los cuales se unen los anticuerpos, esto facilita la lisis mediada por complemento (2) y la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) que es causada por diferentes poblaciones de células como macrófagos, PMN, o linfocitos (12,45) Se ha demostrado "in vitro" e "in vivo" que la ADCC es muy importante en las infecciones por el virus herpes (28) además se lleva a cabo antes de que el virus disemine (43) y la concentración de anticuerpos requerida es muy baja ya que se ha observado ADCC con un suero positivo diluido en el orden de 1:100,000 (41)

6.- ESTUDIO DE LA PARTICIPACION DEL SISTEMA INMUNE EN LA INFECCION POR HERPES.-

El estudio "in vivo" de la participación de los diferentes componentes del sistema inmune en la infección por herpes se dificulta debido a la interacción entre los componentes y el hecho de que el sistema inmune es alterado en el curso de la infección. La simplificación del sistema que ofrecen los estudios "in vitro" (5,10,38,44)

ha facilitado el entender el mecanismo de acción de cada uno de los componentes, además ofrece la posibilidad de ser utilizado para diagnóstico ya que permite evaluar la reactividad de los componentes del sistema inmune en diferentes pacientes.

ANTECEDENTES.

Las infecciones por herpes simple tipo 1, por lo general son localizadas, benignas y se caracterizan por reactivaciones periódicas que pueden ser asintomáticas o presentar lesión activa.

Los sujetos inmunodeprimidos presentan recurrencias severas, en ocasiones puede no controlarse la multiplicación viral lo cual permite la diseminación que causa infecciones sistémicas con consecuencias fatales, esta complicación también la presentan los neonatos.

El herpes labialis es un ejemplo de este tipo de infecciones, En sujetos con herpes labialis se ha encontrado que:

- 1) La recurrencia se presenta en individuos que tienen altos títulos de anticuerpos neutralizantes de la infectividad viral (33).
- 2) Los individuos seropositivos con inmunidad mediada por células (IMC) deficiente sufren de herpes labialis severo(30)
- 3) La determinación "in vitro" de blastogenesis o citotoxicidad en sujetos con herpes labialis recurrente muestra un incremento en el índice de blastogenesis y un decremento en la citotoxicidad con respecto a los valores obtenidos en sujetos sin historia de herpes labialis pero que tienen anticuerpos contra HSV (32,40,47)
- 4) Las células mononucleares de sujetos con historia de herpes labialis obtenidas durante las dos primeras semanas de la presencia de la lesión secretan "in vitro" γ -interferón (6)
- 5) En las vesículas de herpes labialis se ha encontrado interferón, la cantidad de interferón en el fluido vesicular puede relacionarse con; el tiempo de presencia de la lesión y el título del virus

no así con la severidad de ella (46)

Estas observaciones apoyan al sistema inmune, principalmente a la IMC como responsable de evitar la diseminación del virus. Sin embargo al determinar la IMC por blastogenesis y citotoxicidad no se observó un incremento en los resultados al presentarse la lesión. Posiblemente esto se deba a que por medio de estas técnicas la evaluación de la IMC es parcial y no se determina directamente el efecto en la multiplicación viral. Por otra parte la producción de interferón si puede correlacionarse a la aparición de la lesión activa (6,32)

HIPOTESIS DE TRABAJO

El mecanismo por el cual la IMC interfiere a la multiplicación viral es: por lisis de las células infectadas y por secreción de factores que bloquean dicha multiplicación.

En este trabajo se planteó la posibilidad de determinar directamente y en forma global el efecto que las células mononucleares, macrófagos y linfocitos, ejercen en la multiplicación del virus herpes. Por esto, se determinó "in vitro" la protección dada por estas células contra la infección viral a través de determinar el efecto sobre el número de las placas virales. Se trabajó con dos líneas celulares las Vero y las OMK, ambas son permisibles para el virus, las Vero no codifican para interferón (7) de esa manera puede descartarse la participación del γ -interferón en el efecto protector. El estudio se hizo en sujetos con historia clínica de herpes labialis, algunos de ellos presentaron la lesión en el momento de tomar la muestra. En forma paralela se determinó en el plasma de estos individuos, el título de anticuerpos neutralizantes del HSV-1

O B J E T I V O.

Determinación de la respuesta inmune durante la fase latente y activa de la infección por HSV-1 en humanos.

MATERIALES Y METODOS.

MATERIALES BIOLÓGICOS.

Líneas celulares. Se trabajó con dos líneas celulares, las células epiteliales OMK (Old Monkey Kidney) donadas amablemente por el Dr. Robert Honess del National Institute for Medical Research Mill Hill, Londres, Inglaterra y las células Vero, fibroblastos de mono verde africano, donadas por el M.C. Julio de Mucha Macías del Instituto Nacional de Virología, México, D.F.

Virus. El virus con el que se trabajó fue el virus Herpes simple cepa Macropiaque (HSV-MP) aislado y donado amablemente por el Dr. Bernard Roizman de la Universidad de Chicago. Para adaptarlo a las líneas celulares se le dieron un mínimo de tres pases en monocapas de OMK y Vero respectivamente.

Medio de Cultivo. Se usó el medio de cultivo liofilizado Eagle modificado por Dulbecco (MEMD) procedente de GIBCO, New York, E.U.A. con No de Cat 430-1600 y No de Con 60P7703. La cantidad de polvo necesaria para la preparación de un litro se disolvió en agua destilada de Lab. Electropura, México, D.F. y desionizada en un aparato Corning Glass Works, LD-3.

Sueros. De ternera (ST), procedente de GIBCO New York, USA, con No de Cat 200 617.

Fetal de ternera (SFT), procedente de In Vitro, S.A., México, D.F., con No de Con 82023.

Procesados en el Laboratorio de Virología, Depto. de Ecología Humana.

De ternera obtenido en el rastro La Paz, Los Reyes, Edo. de México, México.

Humano (SH), con un título de anticuerpos neutralizantes anti-HSV-1 de 256.

De cobayo, con un título de 1, 022 UH₅₀C.

Descongelamiento de células. Las células OMK se recibieron en ampollitas de 2 ml congeladas durante su transporte y mantenidas sobre hielo seco, para restablecer su cultivo se trataron con el procedimiento descrito por Kuchler (19).

Las ampollitas se retiraron del hielo seco y se colocaron en baño María a 37°C agitándolas constantemente hasta su descongelamiento total.

Se desinfectaron con Etanol al 70% y se transfirió el contenido de cada ampollita, mediante una pipeta Pasteur, a una botella de cultivo Lux No. de Cat. 5350 de 50 ml que contenía 4 ml de MCC. Durante todo el manejo de las ampollitas se deben usar anteojos de seguridad como medida protectora en contra de la explosión de aquellas ampollitas mal selladas y llenas de Nitrógeno líquido.

Se agitaron suavemente las botellas para homogenizar el contenido y se incubaron a 37°C con atmósfera húmeda y 5% de CO₂. En lo sucesivo todas las incubaciones a esta temperatura son bajo estas condiciones a menos que se especifique otra.

Se incubaron las botellas hasta observar confluencia. Las células Vero se recibieron en botellas Lux de 50 ml en monocapas confluentes.

Desprendimiento y separación celular en un cultivo de superficie.

Cuando las células en el cultivo han crecido hasta formar una monocapa confluyente, están listas para ser sembradas, esto se lleva a cabo mediante la técnica descrita por Kuchler (19), con algunas modificaciones.

A una botella Lux de 50 ml con monocapa confluyente de células OMK o Vero se le retira el medio por succión utilizando una pipeta Pasteur. La capa celular se lava con 6 ml de BSF-LCM o EDTA y se retira la

solución. Se añaden 0.5 ml de Tripsina 0.25%. Se incuba la botella a 37°C y después de 4 min se observa si la capa celular se desprende, esto puede comprobarse a simple vista, en caso contrario se prolonga la incubación hasta lograr el desprendimiento total de las células.

Se agregaron inmediatamente a la botella 2 ml de MCC y se homogeniza la suspensión celular golpeando firmemente la botella con la palma de la mano, se cuida que el medio no llegue al tapón ni al cuello de la misma.

Se cuentan las células viables, se calcula y se ajusta la concentración celular en la botella, se adiciona medio para diluir hasta llegar a la concentración deseada, y se preparan las resiembras necesarias en botellas Lux No. de Cat. 5350 de 50 ml y en cajas Linbro de 24 pozos No. de Cat. 76-033-05.

Conteo y determinación de la viabilidad celular. El método para contar y calcular la concentración celular fué el descrito por Patterson (25) y la viabilidad celular se determinó por exclusión de Azul de Tripano de acuerdo al procedimiento de Buchler (19)

Se diluye 1:10 la suspensión celular obtenida en la técnica de desprendimiento y separación celular ó en la obtención de C M usando Azul de Tripano al 0.2% como diluyente. Con una pipeta se coloca una muestra de la suspensión celular en cada una de las cámaras de un Hemocitómetro y se tiene cuidado de no llenarlas en exceso, el cubreobjetos se debe mantener firme en su lugar.

Se cuentan las células observadas sobre cada cuadrado con un área de 1 mm^2 , en cada cámara el cubreobjetos se encuentra a una altura de 0.1 mm por lo que las células contadas corresponden al número de células que hay en 0.1 mm^3 .

Se suman las cuentas obtenidas para 10 cuadrados y se calcula la concentración celular de la solución original con la siguiente fórmula.

$$N \times 10 \times 1000 = \text{cel/ml.}$$

Donde N es el número de células contadas en 10 campos de 1 mm^2 , 10 es el inverso de la dilución (1/10) y 1,000 es la cantidad de mm^3 que hay en un ml.

CONTROL DE LINEAS CELULARES.

Se diseñó un sistema para registrar el número de pases, el origen fechas de pase, número de botellas y muestras congeladas de las líneas celulares.

A cada botella con células en cultivo se le asignó un número control y sobre papel cuadrícula se representó de la siguiente manera.

Sobre cada fila horizontal de cuadros se graficó una botella con una línea continua, considerando que cada fila vertical corresponde a un día del mes anotado en la zona superior. La línea se inicia el día en que se resembró la botella y parte de la línea correspondiente a la botella que la originó. Sobre la línea se trazan símbolos de acuerdo a los siguientes significados: $\triangle$; Desprendimiento, ∇ ; Pase, $\perp$; Lavado con BSF y sustitución del medio, $\times$; contaminada y desechada, ---HSV-1--- ; Infección con HSV-1, ∇_{CP} ; para resembrar cajas de petri, ∇_{CM} ; para resembrar cajas múltiples Linbro, ∇_{O} ; congelamiento de células.

Cada línea celular tiene una hoja de control con los siguientes datos.

Nombre de la línea celular
Fecha inicial y final de uso
Origen de la línea
Nombre del investigador
Laboratorio y Ciudad.

CONGELAMIENTO DE CELULAS.

Las líneas celulares se preservaron en varios lotes congelados a -196°C con Nitrógeno Líquido (unión Carbide tipo Super 30-A). El procedimiento de congelación fué el descrito por Kucher (19) con ligeras modificaciones.

Con la suspensión celular que se obtiene mediante la técnica de desprendimiento y separación celular se realizan los siguientes pasos:

- Se cuentan las células viables y se calcula el número total de las células en la suspensión.
- Se transfiere la suspensión a un tubo cónico Nalgene de 15 ml. y se centrifuga a 150 g durante 5 min.
- El botón celular se suspende en MCC a una concentración de 8×10^6 cel/ml.
- Se adiciona lentamente un volumen igual de MCC. suplementado con - 10% de Dimetil sulfoxido.
- Se distribuyen cantidades de 1.8 ml. en criotubos NUNC No. de Cat. 368632
- Los criotubos con las células se suspenden en la fase gaseosa del tanque de Nitrogeno Líquido durante 30 min y después se sumergen en la fase líquida.
- Los criotubos se etiquetan con los siguientes datos:

Nombre de la línea y No de pase
fecha de congelamiento
Iniciales del Investigador
Laboratorio y Ciudad.

PROPAGACION DEL HSV-MP

La propagación del virus se hizo según el método descrito por Doller y Weissbach (8)

A una capa confluyente de células OMK o Vero crecidas en una botella Lux de 50 ml se le retira el medio por succión utilizando una pipeta Pasteur.

La capa celular se lava con 5 ml de BSF retirando este.

Se infecta a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.01 al aplicar 0.2 ml. de una suspensión de HSV-MP con una concentración de 1.8×10^5 unidades formadoras de placa (ufp) por ml a una monocapa celular preparada previamente con 3.6×10^6 células.

Se incuba la botella durante 60 min a 37°C

Se retira el inóculo mediante succión con una pipeta Pasteur.

Se lava la botella con 5 ml. de BSF y se descarta este líquido.

Se agregan 5 ml. de MCI.

Se incuba a 37°C durante 48 h .

Se desprenden y rompen las células por sonicación en un aparato Cole Parmer 884650. Generalmente se requiere 1 min para conseguir este efecto.

La suspensión obtenida se centrifuga a 1,000 g durante 30 min a 4°C

Se colecta el sobrenadante, se titula el virus sobre la misma línea celular en que se propagó y se distribuye en alícuotas de 0.5 ml. en criotubos Nunc. No. de Cat. 368632

Se etiquetan los criotubos con los siguientes datos.

Nombre del virus, No de pase y fecha

Células sobre las que se propagó y No de pase

Título.

Iniciales de persona que lo propagó
Nombre del Laboratorio, Cd. y País.

Se congelan a -196°C . en un Tanque con Nitrógeno líquido de Unión Carbide tipo LR-10

En estas condiciones el virus se conserva por varios meses.

TITULACION DEL HSV-MP

La titulación del virus se hizo según Doller y Weissbach (8) con algunas modificaciones.

Con MCI se diluye en serie el virus, de 10^{-1} a 10^{-7} .

Se retira el medio a una caja Linbro de 24 pozos con monocapas confluentes de células Vero para titular virus crecido en las mismas u OMK, cuando el virus se haya crecido en OMK.

Se lava cada pozo con 1 ml. de BSF y se descarta el buffer .

Se añade a cada uno de tres pozos 0.2 ml. de la primer dilución viral y repitiendo este paso se continúa la inoculación de la caja, se usan tres pozos más por cada dilución sucesiva, (Fig 2).

Se añade a cada uno de los tres pozos restantes 0.2 ml de MCI, estos pozos servirán como controles celulares.

Se deja adsorber el virus 60 min a 37°C .

Después de este tiempo se descarta el medio y cada pozo se lava con 1 ml de BSF.

Se agrega a cada pozo 1 ml de MCI suplementado con 2% de SH inactivado a 56°C durante 30 min con un título de anticuerpos neutralizantes

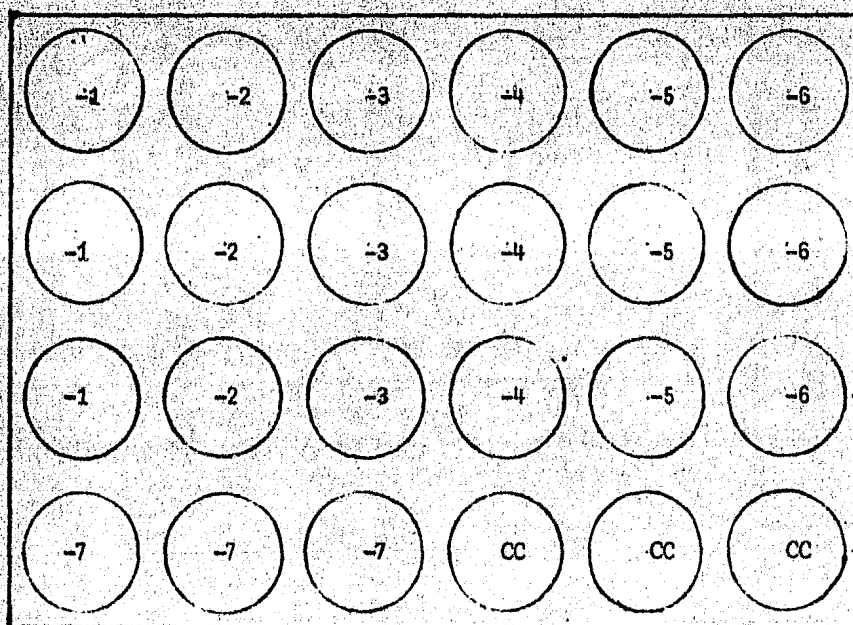


Figura No. 2.- Disposición de las diluciones virales en una caja
Linbro de 24 pozos, para titulación del HSV-MP. -1 a
-7; $\log_{10}$ de cada dilución, CC; Controles celulares.

anti-**HSV-1** de 512, este suero evita la formación de placas secundarias (20)

Se incuba la caja Linbro 48 h a 37°C.

Se observa la caja al microscopio y se comprueba que haya efecto citopático en los orificios correspondientes.

Se retira el medio y se aplica a cada uno de los orificios 1 ml. de Formaldehído al 4%.

Después de 4 min a 25°C se descarta el Formaldehído y se lavan las células con agua del grifo.

Se tñen durante 5 min con Cristal Violeta al 1% en Etanol al 50%, se descarta el colorante y se lava la caja con agua del grifo.

Se cuentan las placas virales con ayuda de un microscopio a un aumento de 15 diámetros y se calcula el título del virus en la muestra con la siguiente fórmula:

$$\frac{N \times 5}{\text{Dilución viral}} = \text{ufp/ml}$$

Donde N es el promedio de placas virales contadas en los pozos correspondientes a la dilución viral con mayor número de placas contables individualmente en 0.2 ml.

Obtención del complemento.- A un cobayo sano se le extrajeron por punción cardíaca 10 ml de sangre, los cuales se depositaron en un tubo de pyrex de 13 X 100 mm y se procesaron, según Garvey, et al (11), de la siguiente manera:

Se incubaron 2 h a 4°C y mediante una varilla de vidrio se despegó de la pared del tubo el coágulo formado.

Se incubó la muestra 24 h más a 4°C

Se aspiró lentamente el suero, con una pipeta Pasteur, se depositó en un tubo pyrex de 13 X 100 mm, y se centrifugó a 1 000 g a 4°C durante 30 min.

Se colectó el sobrenadante, se le determinó el título de complemento y se conservó a -196°C en alícuotas de 1 ml.

Titulación del complemento.- El complemento se tituló a un 50% de hemólisis (H_{50}) de acuerdo al método de The Microbiology Diagnostic Unit, Communicable Disease Center, E.U.A., 1959 y se hizo justo antes de usar el complemento.

La técnica se divide prácticamente en 3 pasos, los cuales se llevan a cabo con los reactivos a 4°C y trabajando con tubos y muestras en baño de hielo.

a) Preparación de una curva patrón de hemólisis , la cual se hace de la siguiente forma.

Se pipetea 2 ml de eritrocitos de carnero al 2% en BB en un tubo de centrifuga graduado de 15 ml Nalgene No. de Cat. 3103 - 0015, se adicionan 10 ml de BB, y se mezclan y se centrifuga el tubo 5 min a 600 g.

Se descarta el sobrenadante, mediante succión suave con una pipeta Pasteur y se agrega al tubo agua destilada hasta la marca de 9.6 ml.

Se agita la mezcla y se deja reposar 5 min, con este tratamiento se lisan los eritrocitos.

Se adiciona al tubo 2.4 ml de BB 5 veces concentrado y se mezclan.

De esta manera se preparó la solución de hemoglobina y al mismo tiempo se hizo una solución de eritrocitos al 0.33 % de acuerdo al método que se describe.

Se pipetea 2 ml de eritrocitos de carnero al 2% en un tubo de ensayo pyrex de 13 X 100 mm. se adicionan 10 ml de BB y se agitan.

Posteriormente se etiquetan 11 tubos pyrex de 10 X 100 con los porcentajes de hemólisis que se prepararán: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, y 100 y se colocan en baño de hielo. Se adicionan respectivamente; 0, 0.15, 0.30, 0.45, 0.60, 0.75, 0.90, 1.05, 1.20, 1.35 y 1.50 ml de la solución de hemoglobina y también respectivamente; 1.50, 1.35, 1.20, 1.05, 0.90, 0.75, 0.60, 0.45, 0.30, 0.15, y 0 ml de la suspensión de eritrocitos al 0.33%.

Se agitan las suspensiones y se centrifugan 600 g durante 5 min.

b) Titulación de la hemolisina y sensibilización de los eritrocitos.

Se diluye la hemolisina en las siguientes diluciones:

1: 1,000, 1: 2,000, 1: 3,000, 1: 4,000, 1: 5,000, 1: 6,000, 1: 7,000, 1: 8,000, 1: 10,000 y 1: 12,000 en BB.

Se etiquetan 10 tubos pyrex de 10 X 100 mm con las concentraciones de la hemolisina y se colocan en baño de hielo.

Se prepara una dilución 1:100 de complemento fresco de cobayo - (0.1 ml + 9.9 de BB)

Se pone una alícuota de 0.25 ml de cada dilución de hemolisina en cada uno de los tubos marcados y se les adiciona 0.25 ml del complemento diluido 1:100, 0.25 ml de eritrocitos al 2% y 0.75 ml de BB se agitan y se incuban en baño maría a 37°C durante 1 hora.

Se centrifugan los tubos a 1,000 g durante 5 min. Se considera una unidad hemolisante en 50% (UH₅₀) contenida en 0.25 ml para dilución correspondiente al tubo que dió el 50% de hemólisis con complemento fresco de cobayo al 1: 100.

Se diluye la hemolisina a una concentración de 4 UH₅₀/ 0.25 ml.
(Ejemplo: si el título fué de 1 UH₅₀/0.25 ml en la dilución 1:4,000 entonces la hemolisina se diluye 1: 1,000)

Se preparan 7 ml de eritrocitos sensibilizados mezclando 3.5 de hemolisina con 4 UH₅₀/ 0.25 ml y 3.5 ml de eritrocitos al 2%. Se incuban 10 min a 4°C y se usan al titular el complemento.

c) Titulación del complemento. Una vez preparada la curva de color y sensibilizados los eritrocitos se procede de la siguiente manera.

Se diluye el complemento que se va a titular 1:150 (0.1 ml + 14.9 de BB)

Se colocan 0.14, 0.16, 0.18, 0.19, 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.26, 0.28, y 0.30 ml del complemento diluido en cada uno de doce tubos pyrex de 10 X 100 mm colocados previamente en baño de hielo.

Se les adiciona respectivamente a cada uno: 0.86, 0.84, 0.82, 0.81, 0.80, 0.79, 0.78, 0.76, 0.74, 0.72 y 0.70 de BB y a todos 0.5 ml de la suspensión de eritrocitos sensibilizados, se agitan los tubos y se colocan en baño maría a 37°C durante 30 min, los tubos deben ser agitados dos o tres veces durante este período.

Se centrifugan las muestras y se comparan con la curva patrón de hemólisis.

El tubo que da exactamente un 50% de hemólisis contiene 1 UH₅₀C.

Se calcula el título del complemento con la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{UH}_{50}\text{C}}{\text{ml}} = \frac{1.5}{n} \times \frac{150}{1}$$

donde n es el volumen de complemento diluido 1: 150 que se llevó al tubo con 50% de hemólisis en la prueba, 1.5 es el volumen final del tubo y 150/1 es la recíproca de la dilución previa del complemento.

Efecto del complemento en la neutralización del HSV-MP por anticuerpos del plasma humano. Previamente al ensayo del título de anticuerpos se estudió el efecto que el complemento tiene sobre la neutralización del HSV-1. Para esto se usó medio con diferentes concentraciones de complemento en las diluciones de dos muestras diferentes de plasma humano y del virus a neutralizar y se siguió el procedimiento descrito por Ratner y Smith (33) para la prueba de neutralización.

Se diluyeron con MCT dos muestras de plasma humano en las siguientes proporciones: 1:32, 1:64 y 1:128 para la muestra A y 1:64, 1:128 y 1: 256 para la muestra B.

Se tomó una alícuota de 0.5 ml de cada una de las muestras y se le añadió 0.5 ml de HSV-MP quinto pase en Vero con un contenido aproximado de 500 ufp diluido en el mismo medio usado para las muestras.

Se preparó un control para el virus mezclado 0.5 ml de medio con 0.5 ml del mismo virus y un control para las células con 1 ml de medio solo.

Esta serie de pasos se repitió tres veces por separado empleando medio con diferentes concentraciones: 8.2, 4.1 y 0% de suero de cobayo

El suero de cobayo tuvo un título de 1,022 $UH_{50}C/ml$ y la concentración final de complemento en los medio fué de 84, 42 y 0 $UH_{50}C/ml$.

Se incubaron inóculos y controles durante 1 h a 25°C.

Se retiró el medio a tres cajas Linbro de 24 pozos con monocapas confluentes de células Vero y se lavó cada pozo con 1 ml de BSF retirando este.

Se inocularon con cada uno de los inóculos y controles tres monocapas de las cajas Linbro siguiendo el protocolo de la titulación del HSV-MP, para esto se sustituyeron las diluciones del virus a titular, por los inóculos preparados en esta prueba. Se varió la disposición de las muestras en las cajas Linbro (Figura 3)

Las monocapas se incubaron, se fijaron y se tñieron bajo las condiciones descritas en el mismo protocolo mencionado y las placas virales obtenidas se contaron a un aumento de 15 diámetros.

El título de anticuerpos neutralizantes se reporta como la recíproca de la dilución del plasma que reduce el número de placas en un 50%.

El porcentaje de reducción (PR) se calculó de la siguiente manera:

$$PR = 100 - \frac{(\text{No. de PV en la dil del Plasma} \times 100)}{(\text{No. de PV en el C. Viral})}$$

Por lo general ninguna de las diluciones reduce exactamente en un 50% dicho número, por lo cual el cálculo de ese valor se hace por el método de Irwin y Chessman (14), con la siguiente fórmula:

$$\log_2 x = \log_2 n - \frac{(\text{PR } 50) - 50}{(\text{PR } 50)}$$

Donde x es la dilución que reduce en un 50% el número de placas virales, n es la mayor dilución que redujo en la prueba más de un 50% de

placas virales, n es la mayor dilución que redujo en la prueba más de un 50% de placas y PR 50 es el porcentaje de placas reducidas en la dilución de n .

Una vez obtenido el $\log_2 x$ se calcula x del siguiente modo

Si $\log_2 x$ lo representamos como y entonces $2^y = x$ por lo tanto

y $\log_{10} 2 = \log_{10} x$ entonces $x = \text{Antilog}_{10} (y \log_{10} 2)$, para obtener finalmente que: $x = \text{Antilog}_{10} 0.301y$.

U _H ₅₀ C/ml	A			B		
	0	42	84	0	42	84
	-6	-5	-5	-6	-6	-6
	-6	-6	-6	-7	-7	-7
	-7	-7	-7	-8	-8	-8
	CV	CV	CV	CC	CC	CC

Figura 3.-Disposición de las diluciones de dos plasmas humanos en cada una de las 3 cajas Linbro usadas para la prueba de neutralización

viral a diferentes concentraciones de complemento. Símbolos: -5, -6 y -7; $\log_2$ de las diluciones de los plasmas, CV: Controles virales, CC: Controles celulares, A y B; muestras.

Titulación de los anticuerpos neutralizantes anti-HSV-1.

La prueba de neutralización se realizó siguiendo el método de Ratner y Smith(33) modificado.

El plasma humano obtenido durante la separación de las CM se inactiva a 56°C durante 30 min y se diluye en MCI. Las diluciones que se preparan son: 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512.

De cada una de las diluciones se toma una alícuota de 0.5 ml y se le añade 0.5 ml del HSV-MP, quinto pase en Vero, con 50 ufp diluidas en el mismo medio que el plasma. Se prepara un control para el virus -mezclando 0.5 ml de medio con 0.5 ml del virus y un control para las células usando 1 ml de medio solo.

Se incuban inóculos y controles durante 30 min a 25°C.

Se retira el medio a una caja Linbro de 24 pozos con monocapas confluentes de células Vero y se lava cada pozo con 1 ml de BSF retirando este.

Se titulan por triplicado los controles y las muestras virales tratadas con las diluciones del plasma. Para esto se sigue el protocolo de titulación viral con la sustitución de las diluciones virales del virus a titular por los inóculos preparados en esta prueba.

El título se calcula y se reporta de la misma manera que en la prueba de neutralización con complemento.

Obtención de Células Mononucleares humanas (CM).- La separación de las CM se hizo de acuerdo al método descrito en el Sigma Technical

Bulletin No. 1070 de diciembre de 1982.

Al individuo seleccionado se le extraen 22 ml de sangre por punción venal y se depositan suavemente en un tubo Lux de 50 ml No. de Cat. 4103 que contiene 0.2 ml de Heparina (1,000 UI/ml) y se agita suavemente.

Se adicionan al tubo 11 ml de BSF y se mezclan lentamente.

Se ponen 4 ml de Histopaque en cada uno de 4 tubos de polipropileno Falcon No. de Cat. 2059 de 15 ml.

Se depositan suavemente 8 ml de la mezcla sangre-buffer sobre la capa de Histopaque en cada tubo.

Se centrifugan los tubos 30 min a 400 g y 25°C. Se obtienen 3 fases: la superior de color usualmente amarillo que es el plasma de la muestra, una fase clara e incolora que corresponde al Histopaque con algunos contaminantes y en la porción inferior del tubo una fase de color rojo que corresponde a los eritrocitos. Entre las dos primeras fases se presenta una interfase opaca que está formada por las CM.

Se aspira con mucho cuidado la fase superior y se conserva a -10°C para la prueba de titulación de anticuerpos.

Se aspira con precaución la interfase de cada tubo y se colectan por separado en 3 tubos Lux de 50 ml. Se le adiciona a cada tubo 10 ml. de Cloruro de Amonio al 0.83% y se deja reposar 5 min a 25°C. Se centrifugan las CM durante 10 min a 250 g y 25°C.

Se desecha el sobrenadante, se resuspende el botón en 5 ml de MCI y se centrifuga 10 min a 250 g y 25°C.

Se descarta el sobrenadante y se resuspende el botón en 15 ml de MCI. Se reúnen las 3 fracciones en una sola y se centrifuga de nuevo en

las mismas condiciones.

Se descarta el sobrenadante y se resuspenden las CM en 5 ml de MCI suplementado con 2% de SH anti-HSV-1, el mismo usado para la titulación del virus.

Se aplica una muestra de esta suspensión sobre un portaobjetos, de manera que no queden células sobrepuestas, se deja secar y se trata con el colorante de Wright, según el Sigma Technical Bulletin No.840 de marzo de 1983, p.5 para realizar una cuenta diferencial.

Se cuentan las células viables, se calcula y ajusta la concentración en la suspensión a 1×10^6 CM/ml se usa MCI para esto con 2% de SH anti-HSV-1 y se emplea la suspensión en la prueba correspondiente de inmediato.

Efecto de las CM. en la multiplicación del HSV-MP en células Vero y OMK.

A una caja Linbro de 24 orificios con capas confluentes de células OMK o Vero se les retira el medio y cada orificio se lava con 1 ml de BSF retirándolo.

Se incuban 3 series de 6 pozos cada uno con 0.2 ml de las siguientes diluciones virales: 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} y con 0.2 de medio sin virus en controles (Figura 4). El diluyente fue MCI y se usó el virus HSV-MP crecido en OMK para infectar estas mismas o crecido en Vero para infectar células Vero según el caso.

Se incuba la caja 60 min a 37° C.

Se retira el medio de cada pozo y se lavan con 1 ml de BSF descartándolo.

Se agregan a varios pozos, de cada dilución viral, 1 ml de MCI con 2%

de SH anti-HSV-1 y a cada uno de los pozos restantes 1 ml del mismo medio que contiene 1×10^6 CM humanas en MEMD (figura 4) obtenidas mediante la separación con Histopaque.

Para este estudio se seleccionaron tres tipos diferentes de muestras sanguíneas:

- a) De individuos sin antecedentes de HSV-1
- b) De individuos con antecedentes pero sin infección activa en el momento del muestreo y
- c) De individuos con infección activa y antecedentes.

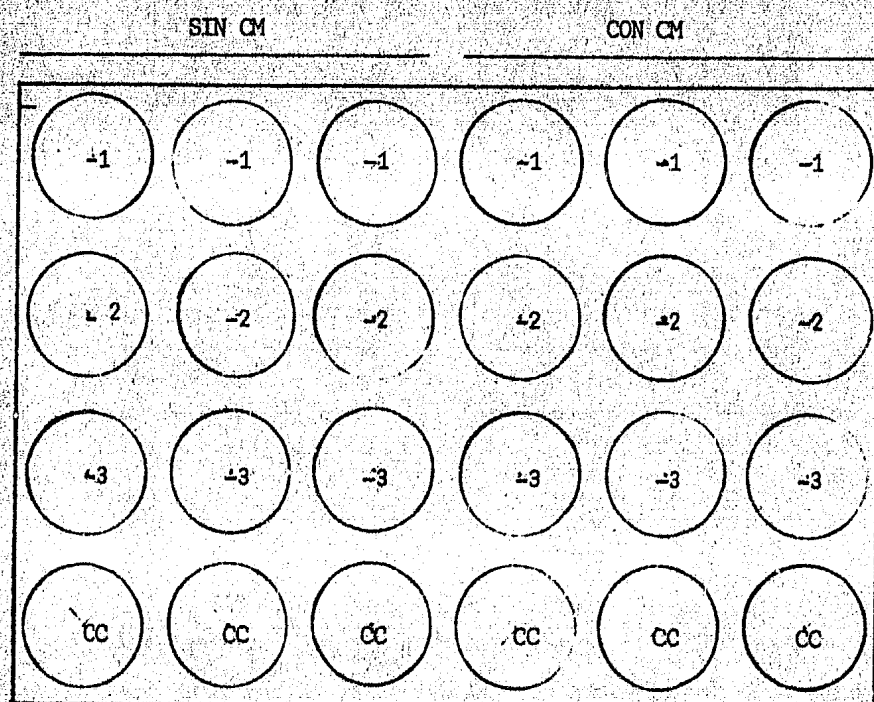


Fig 4.- Disposición en las CM y de las diluciones del HSV-MP en una caja múltiple Linbro para observar el efecto de las CM en la infección viral. -1, -2 y -3; $\log_{10}$ de las diluciones virales, CC; controles celulares.

Se incuba la caja de la prueba a 37°C durante 48 hrs.

Se retira el medio de los orificios y las células se fijan y tiñen siguiendo el procedimiento descrito al final de la prueba de titulación viral.

Se cuentan las placas virales con ayuda de un microscopio a un aumento de 15 diámetros.

RESULTADOS.

Preparación del modelo experimental. Para realizar el experimento central de este trabajo, es decir el estudio del efecto "in vitro" de la C.M. humanas en la multiplicación viral, fue necesario previamente estandarizar los parámetros de crecimiento de las líneas celulares, así como el método para obtener las suspensiones virales con los títulos requeridos para el experimento. Igualmente fue necesario determinar la estabilidad de la infectividad del virus durante el almacenamiento en Nitrógeno líquido y de esa manera poder planear nuestro trabajo.

Cinética de crecimiento de las líneas celulares. Para las dos líneas celulares con las que se trabajó se establecieron las condiciones que permitieran obtener capas confluentes tanto en botellas Lux de 50 ml con una superficie de crecimiento de 25 cm^2 y en cajas múltiples de 24 pozos con una superficie de crecimiento de 3 cm^2 por cada orificio. Para esto se sembraron en las botellas y en los orificios de las cajas diferentes concentraciones de células en un volumen constante de MCC. Tales volúmenes fueron de 1 y 5 ml respectivamente.

El tiempo de observación se estableció a las 24, 48, 72 y 96 h de crecimiento en incubadora a 37°C .

Para la botella Lux (tabla 2, Fig. 5), se encontró un tiempo de confluencia de 24 h cuando se utilizó una densidad celular de 6.0 a 9.0×10^5 células por ml es decir de 30 a 45×10^5 células en total. Cuando la densidad celular fue de 3×10^5 células en cada ml, 15×10^5 células en 5 ml para sembrar la botella el tiempo de confluencia fue de 48 h, cuando la densidad celular fue de 1.5×10^5 células en ml, 7.5×10^5 células en 5 ml, la confluencia se obtuvo a las 72 h y con una densidad de 0.75×10^5 cel/ml, 0.375 células en 5 ml el tiempo de confluencia fue de 96 h.

TABLA 2
Condiciones requeridas por las líneas celulares OMK y Vero para cubrir
con monocapa celular una superficie de 25 cm^2 *

Número de células en 5 ml de medio		Tiempo de confluencia
$\times 10^6$	Log.	h
4.5	6.65	24
3.0	6.67	24
1.5	6.17	48
0.75	5.87	72
0.375	5.57	96

* Se trabajo con botellas Lux No. de Cat. 5053

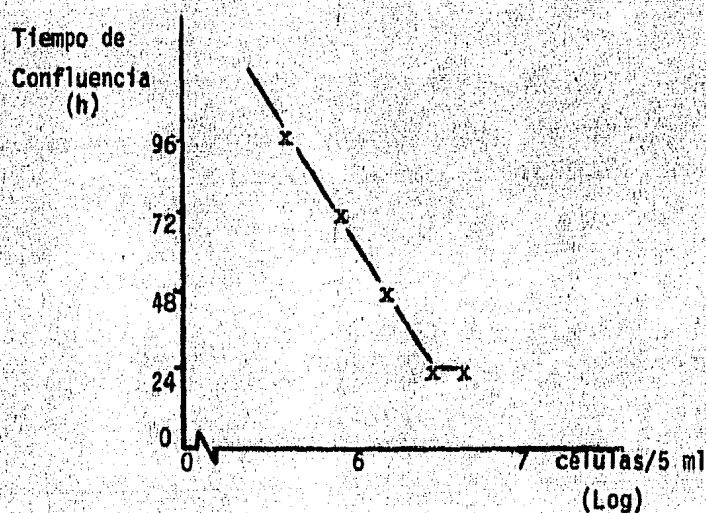


Fig. 5 Condiciones requeridas por las líneas celulares OMK Y vero para
confluir en una superficie de 25 cm^2 .

Para las cajas múltiples Linbro (Tabla 3, Fig. 6) se encontró que al utilizar en la resiembra 1 ml con una concentración de 2.0×10^5 células el tiempo de confluencia fué de 24 h, al trabajar con una densidad celular de 1.0×10^5 este tiempo fué de 48 h al reducir la concentración celular a 5×10^4 se requirieron 72 h para obtener confluencia y finalmente con una concentración de 0.25×10^5 cel/ml la confluencia se alcanzó a las 96 h.

Desprendimiento celular.- Se probaron cuatro diferentes procedimientos para desprender las monocapas celulares de las superficies de vidrio o plástico.

a) Se lavó la capa celular con BSF-LCM y se agregó tripsina diluida en la misma solución.

b) Se lavó la capa celular con BSF-LCM y se agregó tripsina diluida en EDTA.

c) El lavado se llevó a cabo con EDTA y la tripsina se diluyó en BSF-LCM.

d) Se lavó la monocapa con la solución de EDTA y se desprendió con tripsina diluida en la misma solución.

Se observaron los tiempos requeridos para el desprendimiento de las monocapas y el grado de separación entre las células (tabla 4)

En el primer caso cuando la monocapa celular se lavó con el BSF-LCM y la tripsina fué diluida en la misma solución se encontró un tiempo de desprendimiento de 25 min y en la mayoría de

TABLA 3

Condiciones requeridas por las líneas celulares OMK y Vero para cubrir con monocapa celular una superficie de 3 cm^2 *.

Número de células por orificio en 1 ml de medio		Tiempo de confluencia
$\times 10^5$	Log.	h.
2.5	5.39	24
2.0	5.30	24
1.0	5.00	28
0.5	4.69	72
0.25	4.39	96

* Se trabajó con cajas Limbro de 24 pozos, No. de Cat. 76-033-05

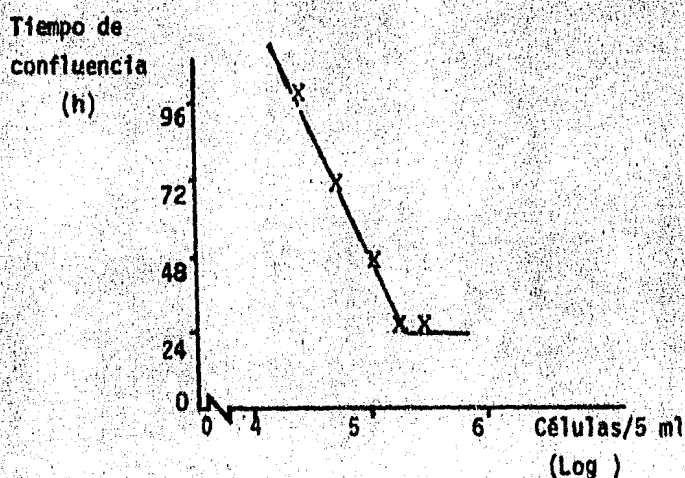


Fig. 6- Condiciones requeridas por las líneas celulares OMK y Vero para confluir en una superficie de 3 cm^2 .

TABLA 4

Diferencias en el desprendimiento y separación de las células ONK y Vero.

Solución de lavado	Solvente de la tripsina al 0.25%	Tiempo en que se desprende la monocapa min.	Separación intracelular
BSF-LCM	BSF-LCM	25	Incompleta
BSF-LCM	EDTA	10	Completa
EDTA	BSF-LCM	2	Completa
EDTA	EDTA	10	Completa.

los casos las células quedaron adheridas entre sí formando racimos. Con medio mecánico como agitación excesiva o pipeteo vigoroso de la suspensión celular no fué posible mejorar la separación de las células. Con el segundo sistema, después de lavar la monocapa con BSF-LCM agregar tripsina disuelta en EDTA, la monocapa celular se desprendió en aproximadamente 10 min, se le adicionó MCC y después de golpear suavemente la botella con la palma de la mano las células se separaron satisfactoriamente.

En el tercer caso al lavar las células con EDTA y desprenderlas con tripsina disuelta en BSF-LCM la separación de la monocapa fué muy rápida y las células quedaron separadas entre sí sin necesidad de una fuerte agitación, simplemente al agregar el medio se dispersaron en células individuales.

Finalmente mediante el cuarto sistema lavado las células en la botella con la solución de EDTA y agregando tripsina diluida en la misma solución se obtuvo un resultado semejante al segundo caso, las células se desprendieron en 10 min y quedaron bien separadas.

De acuerdo a los resultados anteriores se decidió usar en lo sucesivo el tercer sistema.

Conteo celular: Durante las separaciones anteriores se contaron las células viables de la misma manera que en la preparación de las monocapas para las pruebas de cinética celular. Por lo regular la viabilidad celular fué superior al 95%, frecuentemente no se observaron células muertas y se usaron siempre botellas recién confluentes. El número de células calculadas para las botellas Lux con 25 cm^2 de superficie fué de 3.5 a 4.5×10^6 con células Vero y de 3.0 a 6.0×10^6 con células OMK.

Cosecha y título del HSV-MP.- Con el fin de establecer las condiciones óptimas de cosecha del virus, se determinó la cinética de la multiplicación viral. Para esto se propagó el 3er. pase del virus en una botella Lux de 50 ml que contenía células OMK y en otra similar con células vero.

Se infectaron las botellas de acuerdo al protocolo respectivo y se observaron a los siguientes tiempos: 24, 48, 72 y 96 h.

Durante las primeras 24 h no fué posible observar alteración alguna sobre las monocapas de ambas botellas y no se determinó el título del medio.

A las 48 h es posible observar una alteración en las monocapas, se observan células fusionadas en grupos sincitiales, a este tiempo se retiró una alícuota de cada botella y se tituló.

A las 72 h el efecto citopático fué muy claro, se desprendió la mayor parte de las capas celulares y se formaron numerosos conglomerados celulares en el medio. Se tomó una muestra del sobrenadante en ambas botellas y también se tituló.

A las 96 h toda la monocapa se encontró desprendida. Se colectó el medio, se centrifugó a 600 g durante 5 min a 4° C y se determinó el título del sobrenadante.

Los títulos obtenidos para las muestras fueron los siguientes: a las 24 h no se llevo a cabo la prueba, a las 48 h el título fué del orden de 4 log, 3.5×10^4 y 7.0×10^4 en las botellas de OMK y Vero respectivamente, a las 72 h fué de 7.5×10^6 en células OMK y 3.5×10^7 en células Vero finalmente a las 96 h fué de 3.2×10^4 en células Vero y en células OMK fué de 1.5×10^4 (tabla 5 y fig 7)

Con base en los resultados anteriores se decidió en los sucesivos cosechar el virus a las 72 h.

TABLA 5

Títulos del HSV-MP 3er. pase en ONK y 3er. pase en Vero.

TIEMPO DE INCUBACION h	Título del virus obtenido en			
	ONK		VERO	
	ufp/ml	log	ufp/ml	log.
0	-	-	-	-
24	-	-	-	-
48	3.5×10^4	4.54	7.0×10^4	4.84
72	7.5×10^6	6.88	3.5×10^7	7.54
96	1.5×10^4	4.17	3.2×10^4	4.50

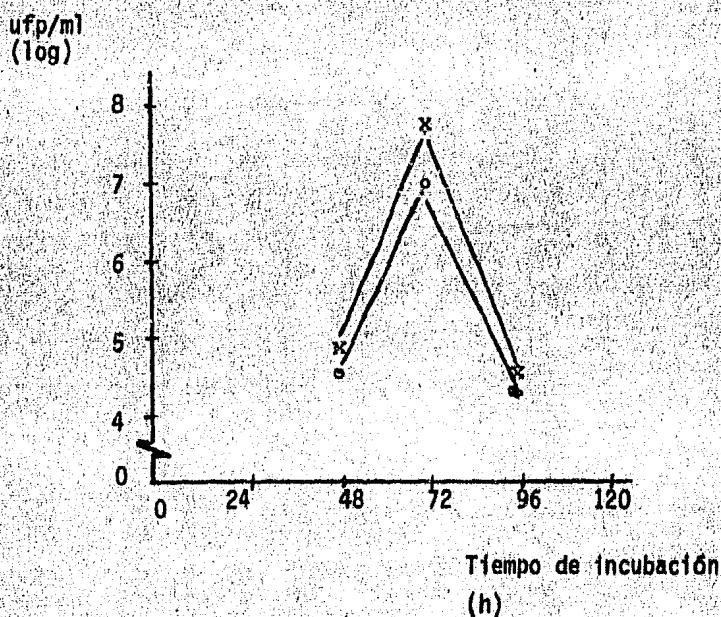


Fig. 7 Producción viral. En una monocapa celular con 3.6×10^6 cel infectada a una MOI de 0.01 e incubada a 37°C . Símbolos : o ; en cel ONK, x ; en Vero.

Estabilidad del HSV-MP conservado en Nitrógeno Líquido. La planeación del experimento central se hizo en forma tal que el número esperado de unidades formadoras de placa por orificio de la caja múltiple fluctuará entre 20 y 150. Para esto fué necesario determinar previamente la estabilidad del título de la suspensión viral en congelación. Lo cual se realizó de la siguiente manera:

Se titularon periódicamente durante 3 o 4 meses las suspensiones virales conservadas en un tanque para Nitrógeno Líquido de Union Carbide tipo LR-10. Para la titulación se retiró una alícuota de cada lote de virus. Se tuvo precaución de que los recipientes estuvieran sumergidos en el Nitrógeno líquido durante todo el tiempo de almacenamiento para así asegurarse que la temperatura de conservación fuera constante, de -196°C .

Estas determinaciones se hicieron tanto para los virus cosechados en células OMK como para aquellos cosechados en células Vero. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6 así como en la fig 8.

Como se puede apreciar en la tabla 6 el título viral descendió paulatinamente. En el caso del virus cosechado en células Vero durante los primeros 39 días el título bajó un poco mas de un logaritmo, para los siguientes 10 días bajó en 0.05 de logaritmo, en los siguientes 42 días descendió un poco menos de un logaritmo y finalmente en los 19 días posteriores de la prueba bajó en 1.25 de logaritmo. El título inicial fué de 3.5×10^7 ufp/ml.

En cuanto al virus crecido en células OMK el título se comportó de la siguiente manera: bajó durante los primeros 31 días en 0.82 de logaritmo, para los siguientes 10 días de baja fué de 0.22 de log durante los 42 días siguientes descendió en 0.66 de log y en los últimos 18 días bajó otros 0.48 de logaritmo.

El título inicial fué de 7.5×10^6 ufp/ml.

TABLA 6

Estabilidad a -196° C del HSV-MP 3er. pase en Vero y 3er pase en OMK

Células blanco	Tiempo de congelación días	Título, ufp/ml	Logaritmo del título.
Vero	0	3.5×10^7	7.54
	39	2.25×10^6	6.35
	49	2.0×10^6	6.30
	91	2.5×10^5	5.40
	109	1.4×10^4	4.15
OMK	0	7.5×10^6	6.88
	31	1.15×10^6	6.06
	41	7.0×10^5	5.84
	81	1.5×10^5	5.18
	101	5.0×10^4	4.70

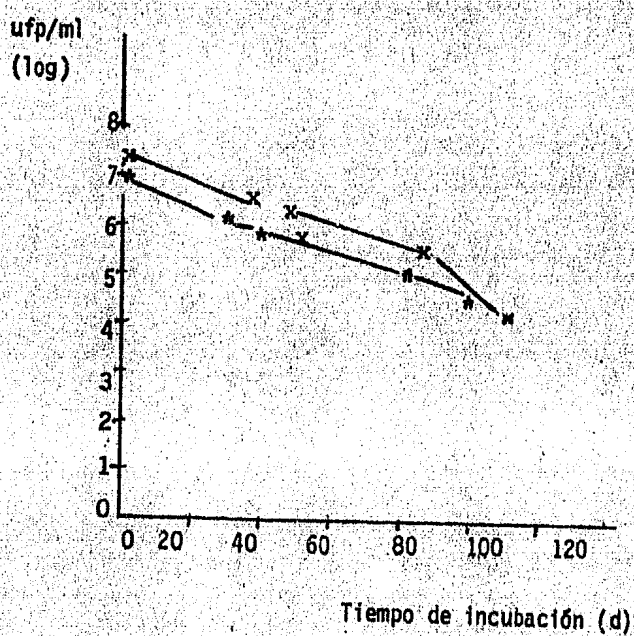


Fig 8 Estabilidad del HSV-MP a -196°C . Símbolos:

- * ; 3er. pase del virus en OMK.
- x ; 3er pase del virus en Vero.
- d ; días.

Efecto de la temperatura sobre el HSV-MP.- Para desarrollar la técnica de titulación de anticuerpos neutralizantes anti-HSV-1 fué necesario establecer la estabilidad a 25°C y 37° C de la infectividad del virus. Para esto se incubaron alícuotas del HSV-MP a diferentes tiempos, titulando las muestras. La tabla 7 muestra los datos obtenidos.

Se encontró que la incubación del virus a 25° C y 37° C disminuyó su infectividad con el transcurso del tiempo. A 25°C el título viral disminuyó de 9 a 6.7×10^4 en los primeros 30 min y descendió hasta 1.2×10^4 después de 60 min. A 37°C el descenso en la infectividad fué mayor de 3.35×10^5 bajó a 2.65×10^4 en los primeros 40 min de incubación y a 5.0×10^1 en 60 min adicionales. La comparación entre ambos descensos se muestra en la tabla 7 y fig 9 y 10.

Efecto del complemento en la neutralización del HSV-MP por anticuerpos del plasma humano. Para las pruebas de neutralización en las cuales se varió la concentración del complemento no se detectó diferencia significativa entre los resultados que a continuación se exponen:

Para la muestra A de plasma se encontró un título de 74 en ausencia de complemento, cuando el medio fué suplementado con 42 UH₅₀ C/ml el título fué de 79 y con 84 UH₅₀ C/ml fué también de 79.

Para la muestra B en la neutralización sin complemento el título fué de 72, usando medio con 42 UH₅₀ C/ml el título fué de 74 y usando medio con 84 UH₅₀ C/ml fué de 66.

Estos resultados se muestran en la tabla 8, y se pueden apreciar comparativamente en la fig 11.

Como no se observaron diferencias significativas se decidió llevar a cabo el resto de las titulaciones sin complemento e inactivando previamente los plasmas.

TABLA 7

Efecto de la temperatura sobre una suspensión de HSV-MP.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Título (ufp/ml)	Título (log)
37	0	3.35×10^5	5.52
	40	2.65×10^4	4.42
	100	5.00×10^1	1.70
25	0	3.35×10^5	5.52
	30	2.50×10^5	5.40
	60	4.45×10^4	.65

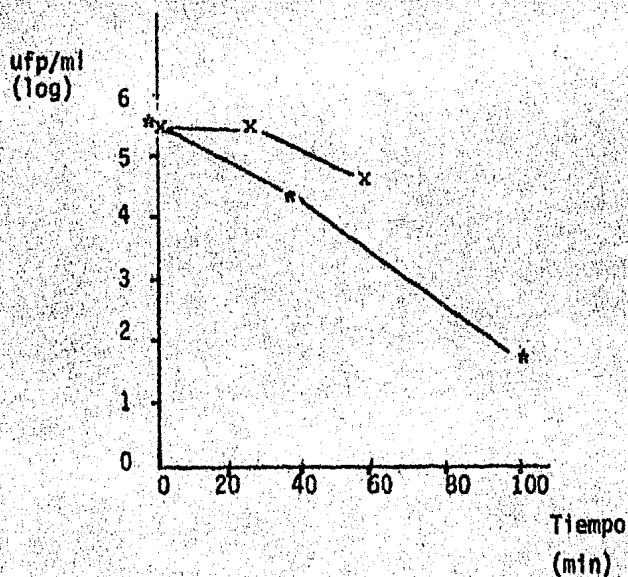


Fig. 9 Efecto de la temperatura en el HSV-MP

Símbolos: x-x; muestra incubada a 25° C, *-*- muestra incubada a 37 ° C.



Fig. 10.-Efecto de la temperatura sobre el título del HSV-MP. Título de una muestra incubada a 37°C , columnas : 1 y 2 ; 0 min, 3 y 4; 40 min. y 5 y 6; 100 min.
Filas: A; 10^{-1} , B; 10^{-2} , c; 10^{-3} y D; controles celulares.

TABLA 8
Efecto del complemento en la neutralización del HSV-1 por anticuerpos del plasma humano:

Sujeto	Dilución del plasma	Sin complemento Placas virales	PR*	T***	con 42 UH ₅₀ C/ml Placas virales	PR	T	con 84 UH ₅₀ C/ml Placas virales	PR	T
A:	1:32	9	9	11	90					
		40	28	43	62	74				
	1:64									
	1:128	84	68	64	25					
B:	CV**	96	100	-						
	1:64	40	43	32	61	72				
	1:128	92	86	80	12					
CV	1:256	89	106	111	0					
		96	100							

* PR.- Porcentaje de reducción.

** CV.- Controles virales

*** Título.

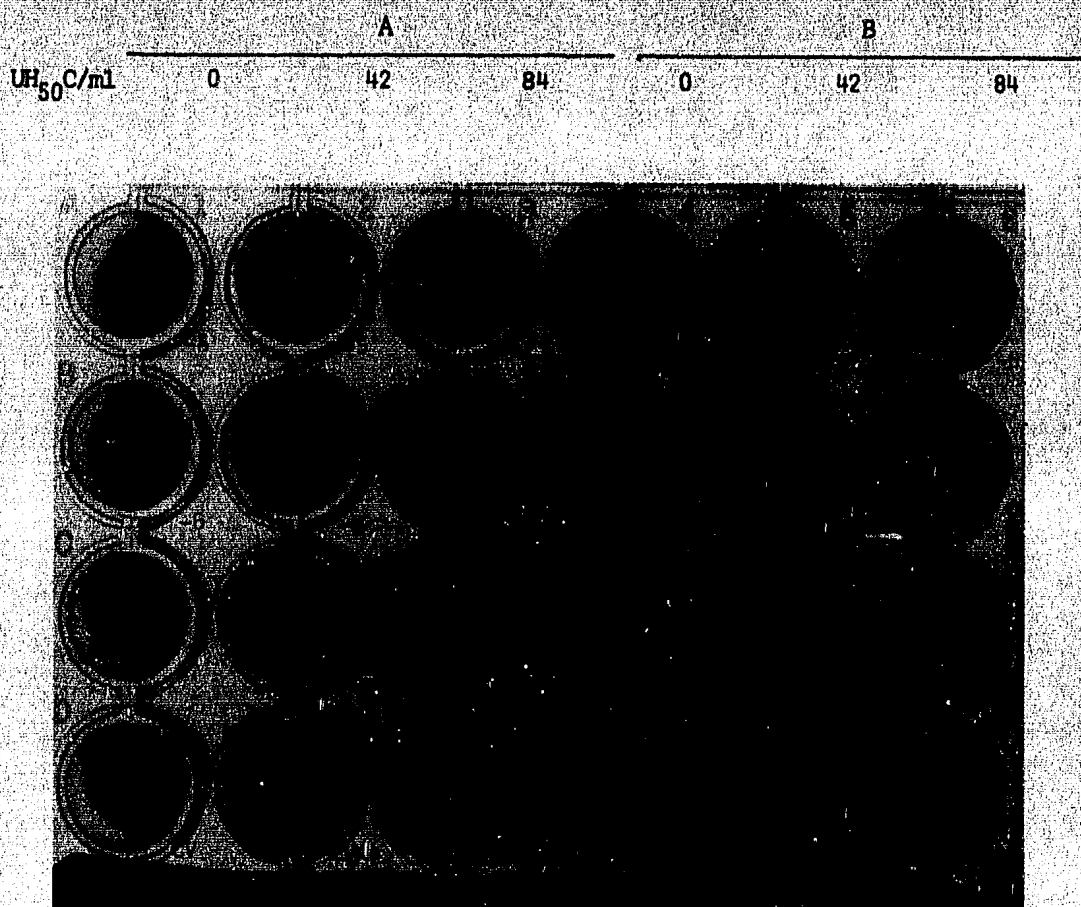


Fig. 11 Efecto del complemento en la neutralización del HSV-1 por anticuerpos de plasma humano.

-5, -6, -7, -8; log₂ de las diluciones de plasma.

CV; controles virales, CC; controles celulares.

A y B; muestras.

Título de los anticuerpos neutralizantes anti-HSV-1 en los plasmas humanos. La infección por el virus origina la síntesis de numerosos anticuerpos con una gran diversidad, sin embargo en nuestro estudio sólo consideramos los anticuerpos que interfieren con la viabilidad del virus, neutralizando su infectividad "in vitro"

Se determinó el título de estos anticuerpos en el plasma de los individuos a los que se les estudió el efecto de las CM. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9, en la primer columna se menciona el número de la muestra, en la segunda se encuentran las diluciones del plasma en que se presentó cerca de un 50% de reducción en el número de placas virales, en la tercer columna los números de placas obtenidos, en la cuarta el porcentaje de reducción y en la quinta el título obtenido mediante el procedimiento descrito en los métodos.

Se encontró así un título de 1,024 para la primer muestra para la número 2 un título de 631, para la número 3 uno de 74 y de 72 para la cuarta muestra, en la número 5 fué de 158, en la 6 de 574. Se obtuvo un título de 66 para la muestra 7 y de 87 para la número 8. El título fué de 166 en la muestra 9 y de 21 en la 10. Para la muestra 11, 12, y 13 el título fué de 282, 68, y 42 respectivamente.

Para obtener los títulos de las muestras 1, 2 y 6 se realizó una segunda prueba con las siguientes diluciones adicionales del plasma; 1: 1,024, 1:2,048, a causa de que en la primer prueba llevada a cabo con las diluciones indicadas en el protocolo original todas las diluciones redujeron en más de 50% el número de placas virales registrada en los controles.

Con la muestra 10 sucedió el fenómeno contrario, en ninguna de las diluciones usadas originalmente se presentó más de 50% de reducción por lo que se hizo también una segunda prueba con las siguientes diluciones; 1:8, 1:16 y 1:32.

TABLA 9

Neutralización del HSV-MP con los plasmas de 13 muestras de sangre humana.

Sujeto	Dilución del plasma	Placas virales			PR*	T***
1	1:512 1:1024 1:2048 CV**	-- 32 65 66	-- 34 72 77	-- 43 62 --	-- 50.0 0.26	1024
2	1:256 1:512 1:1024 CV	-- 55 49 82	-- 61 40 85	-- 59 45 --	70.4 46.5	631
3	1:32 1:64 1:128 CV	9 40 89 96	9 28 68 100	11 43 64 --	90.1 62.2 25	74
4	1:32 1:64 1:128 CV	-- 40 92 96	-- 43 86 100	-- 32 80 --	61 12	72
5	1:64 1:128 1:256 CV	-- 22 55 71	-- 15 43 69	-- -- -- --	-- 74 30	158
6	1:256 1:512 1:1024 CV	-- 30 51 82	-- 37 57 85	-- 35 61 --	-- 59 32	575
7	1:32 1:64 1:128 CV	4 12 14 25	4 12 21 23	1 10 21 24	88 52 22	66
8	1:32 1:64 1:128 CV	0 6 42 71	0 12 42 69	0 9 39 --	100 87 42	87

TABLA 9

Continuación

Sujeto	Dilución del plasma	Placas virales				T***
		PR*				
9	1:64	--	--	--	--	166
	1:128	12	12	16	80	
	1:256	42	39	30	44	
	CV**	66	67	--	--	
10	1:8	2	2	5	96	21
	1:16	10	10	16	83	
	1:32	61	75	71	0	
	CV	71	69	--	--	
11	1:128	--	--	--	--	282
	1:256	24	27	31	59	
	1:512	68	56	61	7	
	CV	66	67	--	--	
12	1:32	4	4	4	86	68
	1:64	12	14	14	55	
	1:128	17	23	20	32	
	CV	31	32	26	--	
	1:16	0	0	0	100	42
	1:32	3	5	5	82	
	1:64	18	16	17	28	
	CV	22	25	--	--	

Leyenda igual a la tabla 8.

Separación de C.M. Las células mononucleares se separaron del resto por centrifugación de las muestras de sangre sobre Histopaque, con este procedimiento sedimentan los eritrocitos y granulocitos no así las CM, las cuales quedan en una interfase que se encuentra por debajo del plasma y sobre el Histopaque.

Durante las pruebas de separación se utilizaron tubos de propileno Lux de 50 ml No. de Cat. 4103 y tubos de polipropileno Falcon de 16 ml No. de Cat. 2059. En estos últimos la separación fue clara con una interfase nítida y óptimas cantidades de CM separadas, en el primer caso fracasaron tres intentos diferentes de separación, no se formó interfase.

Las cantidades de CM obtenidas mediante el procedimiento de centrifugación sobre gradiente de densidad con Histopaque fueron de 20×10^6 células en cada muestra de 22 ml de sangre periférica y el porcentaje de CM fue mayor de un 90% determinado mediante la técnica de Wright y mayor de un 80% con la coloración de azul de Tripiano.

Efecto de las CM en células Vero y OMK infectadas con HSV-MP Se observó una protección dada por las CM en contra de la infección viral. Esta protección fue mayor cuando la muestra correspondía a un individuo con alto índice de recurrencia por HSV 1 y con infección activa y fue menor cuando este índice fue bajo reduciéndose a cero en aquellos casos sin antecedentes de HSV 1. Esta protección se observó como una reducción en el número de placas virales en las monocapas infectadas incubadas con CM con respecto a los controles del virus.

Los datos obtenidos para los casos de individuos con infección activa y con una frecuencia de lesión de 3 a 4 veces por año muestran una considerable reducción en el número de placas virales, el porcentaje de reducción fue de un 62% a un 74.

En los casos de CM obtenidas de individuos con infección activa

y con una frecuencia de lesión de 1 a 3 veces por año el porcentaje de reducción varió de 40 a 61%. Cuando las CM se obtuvieron de sujetos sin la infección presente pero con bajo índice de recurrencia, menos de una vez por año, la protección se presentó entre un 12 a un 32% y en aquellos casos en que las CM se obtuvieron de personas sin antecedentes de HSV 1 no se apreció efecto alguno (tablas 12 y 13). Se muestran los datos completos obtenidos con las muestras 3 y 10 en los cuales se observa un alto y un bajo efecto protector respectivamente. (tablas 10 y 11 ; figs. 12 y 13).

TABLA 10

Efecto de las CM en un individuo con infección activa de HSV-1 en la multiplicación "in vitro" del virus.

Células blanco	Dilución viral.	No. de PV ^a					
		sin CM			con CM		
	10 ⁻¹	Inc ^b	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc
	10 ⁻²	172	154	152	50	58	55
OMK	10 ⁻³	13	22	17	0	4	4
	10 ⁻¹	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc
VERO	10 ⁻²	202	178	195	62	69	73
	10 ⁻³	18	14	13	1	0	7

a.- Número de placas virales

b.- Incontables

Las CM correspondieron al sujeto 3 en las tablas 12 y 13

TABLA 11

Efecto de las CM de un individuo sin infección activa de HSV-1 en la multiplicación "in vitro" del virus.

Células blanco	Dilución viral	No. de PV ^a					
		sin CM			con CM		
OMK	10 ⁻¹	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc
	10 ⁻²	242	253	259	213	201	206
	10 ⁻³	26	22	28	22	20	20
VERO	10 ⁻¹	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc
	10 ⁻²	103	115	98	97	93	85
	10 ⁻³	8	10	13	10	5	13

a y b igual que en la tabla 10

las CM correspondieron al sujeto 10 en las tablas 12 y 13.



Fig. 12 Efecto de las CM de un individuo con infección activa de HSV-1 en la multiplicación "in vitro" del virus. Disposición de las muestras como en la Fig. 4.

Fig 13.- Efecto de las CM de un individuo sin infección activa del HSV-1 en la multiplicación "In vitro" del virus: Disposición de las muestras como en la Fig. 4.

TABLA 12
Efecto de las CM en la multiplicación del HSV en OMK.

Sujeto	No. de P V ^a Número de placas virales orificio						Porcentaje de reducción ^b	Indice de recurrencia (veces/año)
	sin CM			con CM				
1*	26	26	31	8	6	7	74.69	3-4
2*	23	24	20	8	4	8	70.15	3-4
3*	172	154	152	50	58	55	64.22	3-4
4*	70	68	79	--	46	32	62.41	3-4
5*	93	107	95	28	50	46	60.94	2-3
6*	54	42	34	20	19	18	65.15	1-2
7*	108	112	108	72	63	60	40.48	1-2
8	200	170	110	110	118	98	30.56	-1
9	23	24	20	16	19	18	20.63	1-2
10	252	242	260	201	213	206	12.29	-1
11	13	11	12	11	9	12	0	0
12	84	96	89	97	76	80	0	0
13	105	101	100	105	98	96	0	0

a Los valores corresponden a las alícuotas de la dilución viral que dió el mayor número de placas distinguibles en forma individual.

b.-Porcentaje de reducción $100 - \frac{\text{No. de PV con CM} \times 100}{\text{No. de PV sin CM}}$

*.-Con infección activa.

TABLA 13

Efecto de las CM en la multiplicación del virus HSV-1 en Vero.

Sujeto	No. de PV ^a						PR ^b	Indice de recurrencia (veces/año)
	sin CM			con CM				
1*	17	23	24	6	5	7	71.84	3-4
2*	--	--	--		--	--	--	---
3*	202	178	195	62	69	73	64.42	4-3
4*	150	153	148	--	57	58	61.49	3-4
5*	96	194	107	52	40	28	60.94	2-3
6*	--	--	--	--	--	--	--	---
7*	113	107	109	69	65	60	41.37	1-2
8	120	152	148	101	78	102	32.89	-1
9	--	--	--	--	--	--	--	---
10	103	115	98	97	93	85	13.05	-1
11	--	--	--	--	--	--	--	---
12	125	120	123	110	95	96	18.20	0
13	139	121	126	118	130	121	0	0

Leyenda igual a la tabla 12

Comparación entre el título de anticuerpos neutralizantes y el efecto protector "in vitro" de las CM.- Se comparó el título de anticuerpos y el efecto de las células mononucleares en todas las pruebas y no se observó una relación directa entre ambos. Los resultados se describen en la tabla 14.

TABLA 14

Comparación entre el título de anticuerpos neutralizantes y el efecto protector "in vitro" de las CM.

Sujeto	Título de anticuerpos ^a Neutralizantes	PR ^b	PR
		OMK	Vero.
1*	1024	74.69	71.84
2*	631	70.15	- - -
3*	74	64.42	64.42
4*	72	62.41	61.49
5*	158	60.94	60.94
6*	575	56.15	- - -
7*	66	40.48	41.37
8	87	30.56	32.89
9	66	20.63	- - -
10	21	12.29	13.05
11	282	11.12	- - -
12	68	0	18.20
13	42	0	0

a El título de anticuerpos neutralizantes se reporta como la dilución del plasma en la cual la reducción es de 50%.

b y * igual que en la tabla 12.

DISCUSION.

Los virus de herpes simple tipo-1 originan, en humanos y en modelos experimentales, infecciones en las que persiste el genoma viral en estado latente. En el establecimiento, mantenimiento y reactivación de la latencia participa estrechamente el sistema inmune (1). Sin embargo no se han reportado cambios fundamentales en el sistema inmune al reactivarse la multiplicación viral.

Por una parte las determinaciones que se reportan de la respuesta humoral son en su mayoría pruebas de neutralización, sin embargo no hay congruencia entre tales reportes; algunos autores encuentran incremento en estos títulos en presencia de la lesión, otros en cambio no encuentran diferencia alguna en estos mismos títulos entre la fase activa y la fase latente (33)

Por otra parte la respuesta celular que está representada por células inmunes se puede determinar midiendo la actividad directa de estas células o bien midiendo la actividad de los factores que son capaces de liberar. En el primer caso la determinación se lleva a cabo mediante pruebas de citotoxicidad, las cuáles miden la lisis de células infectadas en la presencia de células inmunes (citotoxicidad directa) (40) o de suero inmune y células efectoras (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) (15, 17, 18, 36, 39, 42). También se puede medir la respuesta celular con pruebas de proliferación, en las cuáles se mide la capacidad de los linfocitos para multiplicarse después de un estímulo viral antigénico (32, 47).

En el caso de la producción de linfocinas, estas se determinan midiendo su capacidad para interferir con la replicación viral (32, 49). Los resultados de los ensayos "in vitro" tanto de citotoxicidad y blastogénesis como de producción de linfocinas, la mayoría de las veces son contradictorios, en algunos casos se ha observado una depresión en la respuesta durante una recurrencia mientras que en otros no la hay

o bien se presenta un incremento en los valores obtenidos.

En este trabajo se planteó la posibilidad de determinar la inmunidad mediada por células en forma diferente, es decir a través del efecto que tienen las células mononucleares en la multiplicación viral "in vitro", de esta manera el valor obtenido incluye el efecto directo de las células así como la de los factores producidos por ellas. La inmunidad humoral se determinó por neutralización.

Para llevar a cabo estas pruebas fué necesario establecer previamente las condiciones óptimas de trabajo para: crecer células, obtener las suspensiones virales y determinar los anticuerpos.

Cinética de crecimiento celular. El diseño del experimento requirió establecer la cinética de crecimiento de las líneas celulares con las que se trabajó, Vero y OMK, para esto se determinó la cantidad de células requeridas para obtener confluencia en dos diferentes superficies 3 y 24 cm² y a diferentes tiempos: 24, 48, 72 y 96 h.

De los datos obtenidos se puede calcular el número de veces que se duplican las células con relación al tiempo de incubación es decir la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación. Si consideramos que las células se están dividiendo mitóticamente el número de células se puede calcular mediante la siguiente expresión matemática.

$$y = x \cdot 2^n$$

donde "y" es el número de células al final del período de observación "X" es el número al inicio y "n" es el número de divisiones (19). De los resultados (tablas 2 y 3) se deduce que el tiempo requerido para que las células se dupliquen es aproximadamente de 24 h debido a que la cantidad seleccionada de células confluye en 24 h, la mitad de la misma lo hace en 48 h, la cuarta parte en 72 h y la octava en 96, por

lo tanto en la ecuación $y=x2^n$, "n" se puede considerar directamente como el número de días de incubación durante la fase exponencial de crecimiento y la tasa de crecimiento corresponde al número de divisiones con respecto al tiempo, es decir una división por día para ambas líneas celulares.

Desprendimiento celular.- Se probaron 4 diferentes métodos para desprender las monocapas celulares y se seleccionó el que requería un mínimo de tiempo, esto es: lavar la monocapa con solución de EDTA y desprenderla con solución de tripsina en BSF-LCM. La función del EDTA en este método es atrapar los cationes divalentes Mg^{++} y Ca^{++} que son importantes para mantener la integridad de la matriz intercelular en los tejidos (19), por lo que la unión de las células entre sí igualmente que con la superficie de crecimiento, se ve debilitada y al añadir la tripsina se obtiene una separación inmediata. En cambio en el sistema que usa BSF-LCM como solución de lavado el tiempo de desprendimiento fué de 25 min al resuspender las células en medio nuevo se adherieron rápidamente entre sí formando racimos. Esto se puede interpretar como que la acción combinada del EDTA y de la tripsina debilitó completamente las uniones intercelulares y permitió la separación completa de las monocapas en células individuales. Estas condiciones no afectaron la viabilidad celular.

Propagación del HSV-MP.- Para propagar el virus sobre las líneas celulares se utilizó una multiplicidad de infección de 0.01, con esta multiplicidad se logró producir 100% de efecto citopático en un tiempo relativamente corto y con cantidades pequeñas de virus. Las monocapas que se infectan para cosechar el virus tienen alrededor de 10^6 células y regularmente las suspensiones virales cosechadas tuvieron títulos de 1×10^6 ufp/ml, por lo tanto para infectar con una multiplicidad de 1 se requerirían alícuotas de 1 ml o más, en cambio con una multiplicidad de 0.01 solamente se requieren alícuotas de 10 microlitros. Además al trabajar con altas multiplicidades se favorece el enriquecimiento de partículas defectuosas en las suspensiones virales (4)

Efecto de la temperatura sobre la infectividad del HSV-MP. Los resultados de las incubaciones de suspensiones virales a diferentes temperaturas muestran que el virus se inactiva rápidamente a 37°C y lo hace más lentamente a temperatura ambiente. La cinética de inactivación de la infectividad viral, a diferentes temperaturas y tiempos, se realizó con la finalidad de estandarizar el método de la titulación de anticuerpos, puesto que en la literatura se reporta una gran diversidad de condiciones para esta determinación, los extremos son: Temperatura de 0°C a 37°C y el tiempo de 30 min a 1 h. En este trabajo se escogieron como condiciones de incubación del suero con el inóculo viral 30 min a 25°C, con el propósito de que el virus pierda la menor infectividad posible, y 30 minutos es tiempo suficiente para que se lleve a cabo la reacción antígeno-anticuerpo.

Efecto del complemento en la titulación de anticuerpos neutralizantes.

La neutralización de la infectividad se determinó utilizando diferentes concentraciones de complemento. Como puede observarse en la tabla 9, no hay diferencias significativas en los títulos obtenidos a diferentes concentraciones de complemento o en ausencia de él. El hecho de que la presencia de complemento no altere el título de anticuerpos sugiere que los plasmas sanguíneos con los que trabajó contienen principalmente I_G, puesto que el complemento no afecta la neutralización -- viral cuando las inmunoglobulinas son de ese tipo (13) en cambio si -- tiene efecto cuando son I_M.

Titulación de anticuerpos neutralizantes anti-HSV-MP. El título de anticuerpos neutralizantes se reportó como dilución del plasma en la cual se encontró una inhibición del 50% de la infectividad viral. Por lo general no se observan neutralizaciones de un 50% sino que este valor se calcula utilizando la fórmula de Reed y Muench (34) o la de Irwin y Cheeseman (14), esta última fué la que se utilizó en el trabajo.

Es interesante señalar que el título aparente de anticuerpos puede -

verse modificado por diferentes tiempos y temperaturas de incubación ya que las interacciones entre viriones y anticuerpos son hasta cierto punto reversibles.

Efecto de las CM en la infección "in vitro" del HSV-1. El planteamiento inicial fué trabajar con un sistema alogénico, es decir usar líneas celulares, células mononucleares y virus de origen humano. Para establecer las condiciones óptimas del efecto protector de las CM en la infección viral "in vitro" se probaron: a) Densidades de CM. b) Diferentes líneas celulares permisivas para el virus herpes simple tipo-1 y c) Dos cepas virales (resultados no reportados).

c) Se utilizaron tres diferentes densidades de CM: 5×10^5 , 1×10^6 y 5×10^6 células/ml, la densidad de 5×10^5 y la de 1×10^6 no mostraron efecto alguno en las líneas celulares, en cambio al utilizar 5×10^6 células/ml se observaron alteraciones en la monocapa; por lo que se decidió trabajar con la concentración de 1×10^6 células/ml.

b) Al incubar las líneas celulares de origen humano Hep-2 y de hígado de Chang con las CM mostraron muerte celular, por lo tanto fueron descartadas, posiblemente ese efecto se debió a una reacción de antígenos de histocompatibilidad (51). Con la idea de evitar este efecto se probaron líneas de procedencia animal y se conservaron los virus y las CM de origen humano. Se trabajó con 3 líneas celulares de origen animal; la BHK, la OMK y la Vero. La BHK fué descartada debido a que las CM estimularon el crecimiento celular como se demostró por incorporación de ^3H -timidiana. Las líneas OMK y Vero no mostraron cambios morfológicos ni incremento en la incorporación de ^3H -timidiana al ser incubadas con CM humanas, por lo tanto se trabajó con ambas.

c) En los ensayos iniciales se trabajó con el virus herpes simple tipo 1 silvestre obtenido del laboratorio de virología, Glasgow, Inglaterra, sin embargo este virus presenta variaciones en el tamaño de la placa de lisis por lo que se dificultó observar un cambio en el tamaño de la placa. Con el motivo de evitar este problema se probó la cepa Ma-

croplaque (MP) aislada por el Dr. Roizman en la Universidad de Chicago esta mutante tiene la característica de producir placas de tamaño uniforme y produce sincitios debido a que el locus syn 2 y el syn 1 están mutados (24).

Una vez establecidas las condiciones se determinó el efecto protector a la infección "in vitro", para esto se trabajó con CM de 13 sujetos con historia clínica de herpes labialis; algunos de ellos presentaron infección activa en el momento de tomar la muestra.

Los resultados obtenidos en las líneas celulares Vero y ONK se muestran en las tablas 13 y 14 respectivamente. Como se puede observar hay correlación entre el factor de protección "in vitro" y la presencia y frecuencia de la lesión, además se obtiene el mismo factor de protección "in vitro" en las células Vero y las ONK.

Las tablas 12 y 13 muestran que 5 sujetos que presentan lesión en el momento de la muestra tienen un factor de protección superior al 60% y esta protección llega al 75% cuando la frecuencia es de 3 a 4 veces al año, en un sujeto con frecuencia de 1 a 2 veces mostraron protección de aproximadamente 40%; es interesante notar que no hay diferencia significativa entre los valores obtenidos en células Vero y los obtenidos en ONK. En las mismas tablas se puede observar la protección de la infección que varía de 13 a 32%, presentada por sujetos con infección latente y frecuencia de lesión ocasional de 1 vez cada 1 a 3 años y sujetos sin lesión y con frecuencia esporádica de una vez cada 3 o más años no muestran protección alguna excepto el sujeto #12 que en células Vero da un valor de 18%. Una vez más se puede observar que los valores obtenidos en células Vero son comparables a los de ONK.

Por lo que respecta al mecanismo protector se sabe que las CM pueden interferir en contra de la infección viral mediante los siguientes factores:

Citotoxicidad celular (MAC, CAN y Linfocitos T) (29, 31, 49).
 Cicotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (células A) (12, 39)
 Efecto de linfocinas (Interferón γ , Linfotoxinas) (21)
 O bien una combinación de los anteriores (1)

Al observarse una correlación estrecha entre la lesión viral el efecto protector se pueden descartar los mecanismos no específicos como los responsables (CAN), los macrófagos también se descartan en virtud de la baja concentración que hay de esta subpoblación en las CM, en cuanto a las células T para que sean citotóxicas se requiere el conocimiento tanto de los antígenos virales como el de los antígenos de histocompatibilidad y en caso del modelo experimental empleado, se trata de un sistema xenogénico por lo que se descarta este mecanismo como principal responsable de la protección observada.

La citotoxicidad dependiente de anticuerpos se ha demostrado ampliamente con CM de individuos con y sin sensibilización previa (18) y en nuestros resultados no se observa efecto protector con las CM de varios sujetos por lo que también se descarta este mecanismo como responsable de la interferencia.

Al parecer los resultados apoyan la interpretación de que el γ -interferón es el principal responsable de la protección "in vitro" que se observa y esto concuerda con el hecho de que durante una infección activa las CM aumentan su capacidad de sintetizar interferon "in vitro" (6).

Los otros tipos de interferón no se consideran ya que la respuesta parece tener relación directa con las exposiciones previas de las CM al antígeno (recurrencias lo que habla por un interferon inmune y además las células Vero no son capaces de sintetizar γ -interferon (7).

La determinación de la respuesta humoral se muestra en la tabla 15 y como puede observarse el título de anticuerpos neutralizantes varió

ampliamente desde 9 hasta 1024 y no se puede apreciar relación alguna entre el valor del título y la frecuencia y presencia de la lesión recurrente, lo cual no coincide con el reporte de Ratner y Smith (33). La discrepancia en nuestros resultados y los de estos autores no puede deberse al método utilizado para la determinación de anticuerpos ya que se hicieron ensayos de acuerdo al protocolo reportado por los autores y no se obtuvo variación alguna en los títulos obtenidos con diferentes concentraciones de complemento (tabla 9).

Finalmente los resultados obtenidos muestran que la exposición frecuente a los antígenos de herpes simple tipo 1 incrementa la protección de los CM contra la infección "in vitro", este incremento puede explicarse por un aumento en la proporción de células efectoras o por una mayor actividad de las mismas (secreción de linfocinas, citotoxicidad, etc.) sin embargo la protección "in vitro" no representa necesariamente una protección "in vivo" contra la recurrencia ya que los mecanismos que mantienen la latencia en el organismo son hasta la fecha virtualmente desconocidos.

CONCLUSIONES.

Se encontró una relación estrecha entre el efecto protector de las CM en contra de la infección "in vitro" y la presencia y frecuencia de la lesión.

La magnitud del efecto protector fué independiente de la línea celular utilizada para la prueba.

No se observó correlación entre la frecuencia de la lesión y el título de anticuerpos neutralizantes en el plasma.

APENDICE.

REACTIVOS

Procedentes de Marck, S.A., Edo. de México, México:

Acido clorhídrico, HCl, en solución al 37%, No de Cat 319 No de L 6355118.

Acido 5,5-diethylbarbitárico sal sódica, $C_8H_{11}N_2NaO_3$, No de Cat 6310 No de L 0036577.

Bicarbonato de sodio, $NaHCO_3$, No de Cat 6329, No de L 9719990.

Citrato de trisodio dihidratado, $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, No de Cat 106448 No de L 21131.

Cloruro de amonio, NH_4Cl , No de Cat 201145, No de L 809295

Cloruro de Calcio, $CaCl_2$, No de Cat 2382, No de L 903385.

Cloruro de potasio, KCl, No de Cat 6404, No de L 106570N.

Cloruro de sodio, NaCl, No de Cat 6404, No de L 206160R.

Etanol, C_2H_5OH , No de Cat 1/15853, No de L 211430N.

Formaldehído, HCHO, en solución al 36%, No de Cat 15858, No de L 201338N.

Fosfato de potasio monobásico, KH_2PO_4 , No de Cat 104873, No de L 901018.

Fosfato de sodio dibásico anhidro, Na_2HPO_4 , No de Cat 206586, No de L 804353.

Hidróxido de sodio, NaOH, No de Cat 6498, No de L 214102R.

Procedentes de J.T. Baker, S.A. de C.V., Xalostoc, México.

Cloruro de Magnesio, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, No de Cat 24444, No de L M-30321

Dimetil Sulfoxido, $(CH_3)_2SO$, No de Cat 9224, No de L 425475.

Etilendinitrilo tetracetato disódico, (EDTA) $Na_2C_{10}H_{14}N_2O_8 \cdot 2H_2O$, No de Cat 8993, No de L M-26729.

Procedente de Laboratorios Reforma, México, D.F.

Heparina, Reparina 1,000 UI/ml. No de Cat 621, No de L 01U003,

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

Colorante de Wright al 0.25%, No de Cat 840-100 No de L 30f01782

Cristal Violeta, No de Cat C3886

Histopaque 1077, No de Cat 1977-1, No de L 81F-6090

L-Glutamina con No de Cat 6-3126, No de L 70F-0544

Penicilina G Sódica con No de Cat PEN-NA y No de L 121F-0542

Sulfato de Estreptomicina con No de Cat S-6501 y No de L 21F-0399

Procedente de DIFCO, E.U.A.

Tripsina 1:250, No de Cat 450268

Procedente de Behring Institute, Alemania.

Hemolisina anti-sheep, Amboceptor 6000, No de L 30126B

Procedente de GIBCO, Nueva York, E.U.A.

Azul de Tripano al 0.4%, No de Cat 630-5250, No de Co H-79

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO.Medio Eagle modificado por Dulbecco. (MEMD)

La preparación de este medio se llevó a cabo bajo las indicaciones dadas por la compañía distribuidora (GIBCO) y descritas en la caja de 10 paquetes para un litro.

Con agua destilada y desionizada se mide el 90% del volumen requerido y se vierte en él lentamente la cantidad de liofilizado correspondiente, se agita a baja velocidad y temperatura ambiente, el liofilizado se disuelve en unos cuantos minutos.

Se añaden 3.7 g de Bicarbonato de Sodio por cada litro a preparar de medio.

Se ajusta el pH de la solución a 6.9 usando una solución de Hidróxido de Sodio 1 N si el pH es menor o de Ácido Clorhídrico 1 N si es mayor.

Se afora al volumen deseado.

Se esteriliza por filtración a través de membranas Millipore No. de Cat. GSMP 047 00 con un tamaño de poro de 0.22 μ m.

Se prueba la esterilidad incubando, durante cuatro días a 37° C, una alícuota de 3 ml por cada botella de medio preparada y al no detectar crecimiento de microorganismos se considera estéril. Se conserva a 4°C.

Medio incompleto. (M.I.)

El MEMD se suplementó con Penicilina G sódica 100 UI/ml, Sulfato de Estreptomicina 100 μ g/ml y L-Glutamina 0.03% justo antes de su empleo.

Medio de Cultivo completo (MCC).

Al medio incompleto se le adiciona 10% de Suero fetal de ternera.

Buffer Salino de Fosfatos (BSF).

Este buffer se preparó con la fórmula de Dulbecco y Vogt (9). Se disuelven en 700 ml de agua destilada y desionizada los siguientes:

REACTIVOS:	GRAMOS
Cloruro de Sodio	8.0
Cloruro de Potasio	0.2

Fosfato de sodio dibásico anhidro	0.96
Fosfato de Potasio monobásico	0.2

En 100 ml se disuelven por separado cada uno de los siguientes cloruros:

Cloruro de Magnesio	0.1
Cloruro de Calcio	0.1

Se adicionan lentamente y bajo agitación constante las soluciones de Calcio y Magnesio a la solución de Fosfatos.

Se ajusta el pH a 7.2 con las mismas soluciones que para el MEMD, se afora a 1 lt y se esteriliza por filtración de igual manera que el MEMD.

Buffer salino de fosfatos libre de calcio y magnesio (BSF-LCM).

Se prepara igual que el BSF sin añadir las sales de Magnesio y Calcio. Se ajusta al pH a 7.8 y se esteriliza por calor húmedo a 121°C durante 30 min.

Buffer de Barbital.

La solución buffer de barbital (BB) se preparó de acuerdo a Mayer et al(22). BB 5 veces concentrado. Se disolvieron 8.15 gramos de ácido dietilbarbitúrico, sal sódica en 50 ml de agua destilada a 90°C y se adicionan los siguientes componentes:

REACTIVOS	GRAMOS
Cloruro de Sodio	83.80
Bicarbonato de Sodio	2.52
Cloruro de Magnesio hexahidrato	1.00
Cloruro de Calcio dihidrato	0.20

Se enfrió la solución y se llevó a 2,000 ml con agua destilada.

Se esterilizó por filtración y se conservó a 4°C.

BB solución de trabajo. Se diluyó 1.5 la solución anterior en agua destilada, se ajustó el pH a 7.3 con HCl o NaOH 1 N antes de aforar y se esterilizó por filtración.

Tripsina 2.5 y 0.25 %

Esta solución se preparó mediante el método de Kuchler (19) modificado. En 10 ml de BSF-LCM se disuelven 250 mg de Tripsina, se esterilizan por filtración con membranas Millipore No. de Cat. GSWP 025 00 y se conservan a -10°C. Para su uso se diluye con BSF-LCM o solución de EDTA en una proporción de 1:10.

Solución de EDTA.

Esta solución se preparó a la concentración empleada por Petterson et al (26). Se disolvieron en 900 ml. de agua destilada y desionizada 9.0 gr. de Cloruro de Sodio y 0.2 gr. de EDTA. Se esterilizó por calor húmedo de 121°C durante 30 min después de aforarse a 1 lt.

Solución concentrada de antibióticos.

Según el procedimiento de Kuchler (19), modificado, se disuelven 100 mg de Sulfato de Estreptomicina y el equivalente a 100,000 UI de Penicilina G Sódica en 10 ml de BSF y se esterilizan por filtración (igual que la solución de Tripsina. Se conserva a -10°C. y en el momento de usarse se adiciona 1 ml a 99 de MEMD.

L-Glutamina 3%. Se disuelven 300 mg de L-Glutamina en 10 ml de BSF y se esterilizan por filtración de la misma manera que la Tripsina. Se conserva y se usa en la misma proporción que los antibióticos.

Suero de ternera (ST.) En tres viajes diferentes al rastro de la Paz en los Reyes, Edo. de México, se colectaron por corte de la yugular

2, 2 y 10 lt de sangre de ternera y en cada ocasión la sangre se procesó según el método de Garvey et al(11) adaptado.

Se incubó 2 h a 4°C y mediante una varilla de vidrio se desprendió el coágulo formado de la pared del recipiente.

Se almacenó a 4° C durante 24 h.

Se retiró el suero succionado suavemente con una pipeta serológica de 10 ml y para clarificarlo se centrifugó a 1,000 g a 4° durante 30 min en una centrífuga International PR-2

Se filtró el sobrenadante en membranas Milipore No. de Cat. RAMP 047 00 con un tamaño de poro de 1.2 μ m.

Se esterilizó el suero por filtración en membranas Milipore con No de Cat. RAMP 047 00 con un tamaño de poro de 0.45 μ m.

Se probó la esterilidad de la misma manera que para el MEMD. Se conservó a -10°C y se adicionó al medio en la concentración requerida justo antes de su uso.

Suero humano anti HSV-1 (SH). A cada uno de los individuos se les extrajo por punción venal y en condiciones asépticas 20 ml de sangre periférica y se depositaron en un tubo Lux de 50 ml. Esta muestra se procesó de acuerdo a Garvey et al(11)

Se incubó 2 H a 4°C y mediante una varilla de vidrio se despegó el coágulo formado de la pared del tubo.

Se incubó 24 h adicionales a 4°C.

Se aspiró con cuidado succionando lentamente, con una pipeta Pasteur, el suero y se transfirió a dos tubos de vidrio Pyrex de 13 X 100 mm.

Los tubos se centrifugaron a 1,000g y 4°C durante 30 min en una centrífuga Internacional PR-2.

El sobrenadante se inactivó a 56°C durante 30 min.

Se le determinó el título de anticuerpos neutralizantes anti-HSV-1 y se conservó a -10°C .

Suspensión de eritrocitos de carne o al 2%. Se colectan 20 de sangre de carnero por punción venal y se mezclan con 24 ml de Citrato de Sodio al 3.8%. Se almacenan en refrigeración. En estas condiciones se puede conservar durante un mes sin mayor problema.

Se filtran 3 ml de la mezcla sangre-citrato a través de dos capas de gasa estéril y se colectan en un tubo de centrifuga graduado de 15 ml. Se adiciona 9 ml de BB se mezclan y se centrifuga el tubo 600 g durante 5 min.

Se descarta el sobrenadante y con mucho cuidado se descarta también la siguiente capa que son las células blancas.

Se adiciona al tubo 10 ml de BB, se coloca la palma de la mano sobre la boca del mismo y se agita suavemente para mezclar el contenido.

Se centrifuga a 600 g durante 5 min.

Se descarta el sobrenadante, se resuspende el paquete en 10 ml de BB y se vuelve a centrifugar a las mismas condiciones.

Se mide el volumen de células en el botón, se descarta el sobrenadante y se adiciona la cantidad necesaria de BB para hacer una suspensión 2% (49 veces el volumen de eritrocitos). Si el volumen de BB necesario es mayor de 15 ml se transfieren totalmente los eritrocitos a un recipiente mayor.

La suspensión se puede almacenar una semana en refrigeración.

B I B L I O G R A F I A.

- 1.- Babiuk, L.A. y B.T. Rouse, 1979. Immune control of herpes virus latency. *Can. J. Microbiol.* 25:267-274.
- 2.- Babiuk, L.A., R.C. Wardley y B.T. Rouse. 1975. Defense mechanisms against bovine herpes virus. Relationship of virus-host cell events to susceptibility to antibody-complement lysis. *Infect. Immun.* 12: 958-963.
- 3.- Baron, S., P.A. Brunell y S.E. Grossbert 1979. Mechanisms of action and Pharmacology: The immune and interferon systems. in, "Antiviral Agents and Viral Diseases of Man" (ed. Balasso, G.J. et al) Raven Press, New York, pp 151-208
- 4.- Bohn, E.M. y D.V. Alstyne, 1981, The generation of Detective Interfering Rubella virus particles. *Virol.* 111:549-554.
- 5.- Centifanto, Y.M. Z.S. Zam y W.E. Kaufman 1977. In vitro studies on the mechanism of herpesvirus plaque growth inhibition by sensitized lymphocytes. *Infect. Immun.* 17: 350-355.
- 6.- Cunningham, A.L. y T.C. Merigan, 1983. γ - interferon production appears to predict time of recurrence of herpes labialis. *J. Immunol.* 130: 2397-2400.
- 7.- Desmyter, J., J.L. Melnick y W.E. Rawls 1968. Defectiveness of interferon production and of Rubella virus interference in a line of african green monkey kidney cells (Vero). *J. Virol.* 2:955.
- 8.- Doller, E., J. Aucker y A. Weissbach 1979. Persistence of herpes simplex virus type-1 in rat neurotumor cells. *J. Virol.* 29:43-50.

- 9.- Dulbecco, R. y M. Vogt, 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 99: 167-171.
- 10.- Ennis, F.A., 1973. Host defense mechanisms against herpes simplex virus. *Infect. Immun.* 7: 898-904.
- 11.- Garvey, J.S., N.E. Cremer y D.H. Sussdorf 1977. *Methods in Immunology*. W.A. Benjamin Inc. London.
- 12.- Grewall, A.S., B.T. Rouse y L.A. Babruck 1977. Mechanisms of resistance to herpes virus. Comparison of the effectiveness of different cell types in mediating Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. *Infect. Immun* 15: 698-703.
- 13.- Hirsh, R.C., 1982. The Complement System: Its importance in the host response to viral infection. *Microbiological Reviews*. 46: 71-85.
- 14.- Irwin, J.O. y E.A. Cheeseman, 1939. On a method of determining the median effective dose and its error, in the case of a quantal response. *J. Hyg.* 39: 574-580.
- 15.- Kirchner, K., C.H. Schröder, R. Kawatsky y Ch. Kleinicke 1979. The role of cellular immunity in the infection with herpes simplex virus. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Disease* 2: 149-158.
- 16.- Klein, R.J. 1982. The pathogenesis of acute, latent and recurrent herpes simplex virus infections. *Archives of Virology* 72: 143-168.
- 17.- Kohl S., A.L. Cahall, A.L. Walters y V.E. Shaffner 1979. Murine Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity to herpes virus-infected target cells *J. Immunol.* 123: 25-30

- 18.- Kohl, S., S.E. Starr, J.M. Oleske, S.L. Shore, R.C. Ashman y A.J. Nahmias 1977. Human monocyte-macrophage-Mediated Antibody-Dependent Cytotoxicity to herpes simplex virus infected cells J. Immunol. 118: 729-735.
- 19.- Kuchler R.J. 1977 Biochemical Methods in Cell Culture and Virology. Dowden, Hutchinson & Ross, Penn, USA.
- 20.- Lodmell, D.L., A.Niwa, K. Hayashi y A.L. Nokins 1973. Prevention of cell to cell spread of herpes simplex virus by kocytes. J. Exp. Med. 137: 706-720
- 21.- Lodmell, D.L. y A.L. Kotkins. 1974. Cellular Immunity to herpes simplex virus mediated by interferon, J. Exp. Med. 140: 764-778
- 22.- Mayer M.M. A.G. Osler O.G. Bier y M. Heidelberger. 1946. The activating effect of magnesium and other cations on the hemolytic function of complement. J. Exp. Med. 84: 535-540
- 23.- McKendall, R.R. T. Klassen y J.R. Barienger 1946. Host defense in herpes simplex infections of the nervous sistem. Effect of antibody on disease and viral spread. Infect. Immun. 23: 305-311.
- 24.- Norrild, F. 1980. Immunochemistry of herpes simplex virus glycoproteins. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 90:67-106
- 25.- Patterson, Jr. M.K. 1979 Measurement of growth and viability of cells in culture. in "Methods in Enzimology (Colowick, S.P. Ed.) Vo. LVIII, p 141-152.
- 26.- Patterson, E.D., W.F. Simpson y B. Hukku 1979. Cell culture characterization; Monitoring for cell identification. in "Methods in Enzimology (Colowick, S.P. Ed.) Vol LVIII p 164-178.

- 27.- Pleager-Marshall, S. y J.W. Smith 1978. Experimental infection of subpopulations of human peripheral blood leukocytes by herpes simplex virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 158: 263-267.
- 28.- Rager-Zisman, B. y B.R. Bloom 1974. Immunological destruction of herpes simplex virus Type-1 infected cells. *Nature* 251:542.
- 29.- Rager-Zisman, B. y B.R. Bloom 1982. Natural Killer cells in resistance to virus-infected cells. *Springer Semin., Immunopathol.* 4: 397-414.
- 30.- Rand, R.H., L.E. Rasmussen, R.B. Pallard, A. Arvin y T.C. Merigan. Infections in cardiac transplant patients. *New Engl. J. Med.* 296: 1372-1377.
- 31.- Rasmussen L.E. T.C. Merigan, 1978. Role of T- Lymphocytes in cellular immune responses during herpes simplex virus infections in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:3957-3961.
- 32.- Rasmussen, L.E., G.W. Jordan, D.A. Stavens y T.C. Merigan 1974. Lymphocyte interferon production and transformation after herpes simplex infections in humans. *J. Immunol.* 112: 728-736.
- 33.- Ratner, J.J. y K.O. Smity. 1980. Serum antibodies to herpes simplex virus type-1 during active oral herpes infection. *Infect. Immun.* 27: 113-117
- 34.- Reed, L.J. y H. Muench, 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.

- 35.- Rola Pleszczynski, M. 1979. Mecanismos de controle de la respuesta immune antivirale- role de l'immunité cellulaire. 1^o Union Medicale, tomo 108-9:1-3.
- 36.- Romano, T.J. y S.L. Shore, 1977. Lysis of virus-infected target cells by Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity. Cell. Immunol. 30: 66-81.
- 37.- Rosenthal, L.J., 1979. Replication of herpes virus and latency. Can. J. Microbiol. 25: 239-244.
- 38.- Rouse, B.T., y L.A. Babiuk, 1975. Host defense mechanisms against infectious bovine rhinotracheitis virus. Cell. Immunol. 17: 43-56.
- 39.- Rouse, B.T., R.C. Wardley y L.A. Babiuk, 1976. The role of Antibody Dependent Cytotoxicity in recovery from herpes virus infections. Cell, Immunol 22: 182-186.
- 40.- Russell, A.S., J.S. Percy y T. Kovithavongs, 1975. Cell mediated immunity to herpes simplex in humans; Lymphocyte cytotoxicity measured by ⁵¹Cr released from infected cells. Infect. Immun. 11: 355-359.
- 41.- Shore, L.S., A.J. Nahmias, S.E. Starr, P.A. Wood y D.E. McFarlin. 1974. Detection of cell dependent cytotoxic antibody to infected with herpes simplex virus. Nature 251:350-352.
- 42.- Shore, L.S., C.M. Back, F.M. Melewicz, P.A. Wood y A.J. Nahmias. 1976. Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity to target cells infected with type-1 and type-2 herpes simplex virus J.Immunol. 116:194-201

- 43.- Shore, L.S., T.L. Cromeans y B. Norrild 1979. Early damage of herpes infected cells by Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity; Relative roles of virus specified cell-surface antigens and input virus. J. Immunol. 123: 2239-2234.
- 44.- Simmons, R.S., Y. Centifante y H.E. Kaufman, 1974. Plaque size reduction as a measure of viral cell mediated immunity. Infect. Immun. 10: 1034-1039.
- 45.- Smith J.W. y A.M. Sheppard, 1982. Activity of rabbit monocytes, macrophages and neutrophils in Antibody Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity of herpes simplex virus infected corneal cells. Infect. Immun. 36: 685-690.
- 46.- Spotswood L.S., J.A. Green, G. Chiv. T. Yeh, G. Wenerstrom and J.C. Overall, Jr. 1982. Pathogenesis of Herpes simplex labialis; Correlation of Vesicle Fluid Interferon with Lesion Age and Virus Titer Infect. Immun. 36: 907-910.
- 47.- Steele, R.W. M.M. Vicent, S.A. Hersen, D.A. Fuccillo i.A. Chapa y L. Canales 1975. Cellular immune response to herpes simplex virus tupe-1 in recurrente herpes labialis: In vitro blatogenesis and Cytotoxicity to infected cells lines J. Infect. Dis. 131:528-534.
- 48.- Stevens J.G., 1975. Latent herpes simplex virus and the nervous sistem. in "Current Topics in Microbiology and Immunology" 70: 31-50.
- 49.- Stanwick, T.L. D.E. Campbell y A. Nahmias, 1980. Spontaneous cytotoxicity mediated by human monocyte-macrophage against human fibroblast infected with herpes simplex

virus augmentation by interferon. *Cell Immunol.* 53: 413.

50.- Wheelock, R.F. y Toy, S.T., 1973. Participation of lymphocytes in viral infections. *Adv. Immunol.* 16-123-184.

51.- Zinkernagel, R.M. y P.C. Doherty. 1975. H-2 Compatibility requirement for T-Cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus J. *Exp. Med.* 141:1427-1435.