

Producción y evaluación anti-herpética de una molécula recombinante de interferón beta

Standardization of production and anti-herpetic evaluation of a recombinant interferon beta molecule

Jaime E. Castellanos*, Sheilla Ledesma-Ortiz*, Jeanette Prada-Arismendy†

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) es un patógeno humano altamente prevalente que causa infecciones en la superficie de la mucosa y región perioral. Después de la primoinfección, la progenie viral viaja a través de las terminaciones nerviosas sensitivas hacia el ganglio trigeminal donde establece infecciones latentes, desde donde se reactiva generando infecciones recurrentes. Aunque los fármacos antivirales existentes reducen la morbilidad y la mortalidad potencial del virus, nunca hay una resolución absoluta de la infección. Es muy conocido el importante papel de los interferones tipo 1 en el control de la infección por HSV-1, pero poco se conoce acerca de cuál es el papel de esta citoquina en el establecimiento de la latencia y la aparición de recurrencias.

OBJETIVO

Estandarizar la producción de Interferón β recombinante para probar su efecto anti-herpético *in vitro*, con el fin de usarlo en pruebas posteriores en cultivos de neuronas trigeminales.

RESULTADOS

Se encontró un significativo efecto antiviral de la proteína producida, en un bioensayo con virus de estomatitis vesicular. Posteriormente, se evidenció que la infección por HSV-1 causó efecto citopático al 24% de las células neuronales SH-SY5Y, mientras que la mortalidad fue 10 veces menor (2,5%) en las neuronas tratadas con los sobrenadantes de las células transfectadas para IFN- β , aunque no ocurrió disminución en la cantidad de virus producido por las células SH-SY5Y.

CONCLUSIONES

La molécula de IFN- β recombinante producida tuvo un leve pero significativo efecto anti-herpético en cultivos de células de neuroblastomas SH-SY5Y. Se deben mejorar las condiciones de producción de la molécula para mejorar su actividad.

PALABRAS CLAVES

Herpes Simplex Virus, cultivo celular, Interferón β , antiviral, bioensayo.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) is the main viral pathogen causing mouth and perioral epithelial infections. After primary mucosal infection, virus goes through nerve endings toward trigeminal ganglion where it establishes latent infection and it can

be reactivated when some stimuli or conditions favors the viral gene transcription resulting in a recurrent infection. Despite anti-herpetic drugs can reduce herpes morbidity and mortality, latency and recurrences are a lifespan threat which is little known. Interferons type 1 are recognized antiviral cytokines, even in HSV -1 infections, but it is not known its role during latency establishment or recurrences apparitions.

Grupo de Patogénesis Infecciosa, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia. †Grupo de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá Colombia.
*Contacto: jcastellanos@unal.edu.co Recepción: 10-26-2011. Aceptación: 04-10-2012.

OBJECTIVE

In this work we standardized the production of recombinant Interferon β and tested its *in vitro* anti-herpetic activity.

RESULTS

It was found an antiviral effect against Vesicular Stomatitis Virus in a classical antiviral bioassay. Infection with HSV-1 caused cell death in 24% of SH-SY5Y neuroblastoma cells, but treatment with supernatants from cells transfected with an IFN- β construct, did protect the neuronal cell line SH-SY5Y against cytopathic effect (cell death 2,5%) induced by HSV-1 without changes in virus yielding.

CONCLUSIONS

Recombinant IFN- β had a light but significant anti-herpetic activity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. It is necessary to improve the molecule production to reach better activity of IFN- β .

KEY WORDS

Herpes Simplex Virus. Cell culture. Interferon β . Antiviral. Bioassay.

INTRODUCCIÓN

La familia *Herpesviridae* abarca un gran grupo de virus animales que se caracterizan por tener una doble cadena de ADN de la cual hace parte el herpes simplex Virus tipo 1 (HSV-1, acrónimo oficial). Todos los miembros de la familia poseen habilidad para persistir indefinidamente en sus hospederos estableciendo una infección latente, que al reactivarse causa un amplio rango de signos y síntomas.¹ Su transmisión requiere un íntimo contacto de las superficies mucosas o piel lesionada de una persona seropositiva con una seronegativa para iniciar la infección, la cual pocas veces es fatal.² Después de la replicación del virus en el sitio primario de la infección, el virus entra a las neuronas sensoriales por transporte retrógrado a través de los axones hasta el soma neuronal en el ganglio trigeminal estableciendo una infección latente.³ El virus latente es periódicamente reactivado y transportado anterógradamente por el axón al tejido donde ocurrió la primoinfección. En humanos, la reactivación se da por estímulos locales a las neuronas latentemente infectadas del dermatoma implicado o por estímulos sistémicos como el estrés emo-

cional o físico, estados de hipertermia, exposición a luz UV y desequilibrios hormonales.⁴ Más de la mitad de la población mundial, ha sido infectada con este virus. Su reservorio principal es el ganglio trigeminal (GT) latentemente infectado, cuya reactivación causa la recurrencia del herpes labial/facial. La frecuencia de estas lesiones recurrentes es relativamente constante oscilando alrededor del 33% de la población.⁵ La infección oral causada por el virus HSV-1 representa uno de los problemas más importantes en la consulta odontológica. Toda persona infectada, establece una infección latente y desarrolla lesiones recurrentes, aumentando de este modo, la propagación de la infección. Se trata de un agente infeccioso para el cual no existe un tratamiento curativo. Aunque se sabe que la infección, rara vez es fatal, hay casos en los cuales puede causar enfermedades más serias como la encefalitis herpética, pues por el neurotropismo del virus puede alcanzar el sistema nervioso central. El sistema inmune no es suficiente para controlar permanentemente al HSV-1 y es un problema de salud que sigue sin resolverse.

La respuesta innata del organismo a la infección viral incluye la producción celular de IFN tipo 1 (IFN- α/β). El aumento de esta citoquina dentro de la célula induce la producción de más IFN por parte de la misma célula (regulación autocrina), involucrando también a las células circundantes (regulación paracrina). El IFN- β al unirse a su receptor activa una cascada de señalización que conduce a la expresión de genes que codifican para proteínas específicas que inhiben la replicación viral. En cultivos de ganglio trigeminal murino infectados con HSV-1 se ha demostrado la producción y regulación autocrina/paracrina de IFN- β ⁶ y la producción de Oligo-adenilato sintetasa 1a y 1b (Oas 1a y Oas 1b) que contribuyen a la degradación del ARN viral y celular.⁷ Existen varias investigaciones en las que se ha comprobado la producción y el efecto protector de esta citoquina en modelos murinos *in vivo* e *in vitro*; sin embargo, no se ha establecido un modelo de células neuronales humanas en el cual se evalúe el efecto antiviral del IFN- β contra el virus HSV-1. Por tal razón, en este trabajo nos propusimos establecer la producción recombinante de IFN- β y su evaluación preliminar como molécula anti-herpética en el propósito de establecer un modelo de estudio del virus en células de neuroblastoma humano, como un paso hacia la búsqueda de alternativas terapéuticas que benefician a los pacientes con infecciones por HSV-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

PRODUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PARA IFN- β MURINO

Se utilizaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α previamente transformadas con el plásmido recombinante pkCMV-IFN- β (donación del Dr. Daniel J.J Carr; U. of Oklahoma; Dept. of Ophthalmology). Este plásmido, contiene el gen para IFN- β bajo el control de un promotor de citomegalovirus, por lo que sirve como vector de expresión en células mamíferas. Las bacterias transformadas se seleccionaron en un medio con kanamicina 30 μ g/ml (ICN), ya que el plásmido posee un gen de resistencia a este antibiótico.⁸ A partir de las bacterias transfectadas, se hizo purificación del plásmido con el estuche *Wizard Plus SV Minipreps ADN Purification System* siguiendo el protocolo del fabricante y se verificó la calidad y cantidad de ADN plasmídico usando un espectrofotómetro a 260 nm. Los plásmidos fueron verificados mediante un ensayo de PCR, que permitía la amplificación específica de un fragmento del gen de IFN- β humano.⁶

Se hizo digestión de una alícuota del plásmido con la enzima de restricción Sca-I (Promega) que corta el plásmido en la secuencia correspondiente a IFN- β , para usarlo como control de transfección, ya que se conoce que los sistemas de transfección pueden inducir la expresión de IFN. El plásmido cortado, se separó por electroforesis y se re-purificó y cuantificó y fue usado como control de transfección (mock).

TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS L929 CON EL PLÁSMIDO PKCMV-IFN- β

Se cultivaron 20.000 células L929 (ATCC, Catálogo CCL-1) por pozo en cajas de 24 pozos (Corning) en medio DMEM y Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco) al 5% por 24 horas. Para la transfección se utilizó el sistema de liposomas catiónicos *TransFast Transfection Reagent* (Promega). Se realizaron 2 controles, uno con medio fresco más liposoma catiónico y el otro con liposoma catiónico y plásmido cortado (Mock). Adicionalmente se transfectaron dos grupos de células con 1 y 2 μ g de ADN plasmídico más TransFast. Después de 48 horas de transfección se recogieron los sobrenadantes de las células, se liofilizaron y se guardaron a -80°C hasta su uso.

RT-PCR PARA IFN- β MURINO

Se hizo extracción de ARN de las células L929 en todas las condiciones del experimento de transfección,

utilizando el sistema de tiocianato de guanidinio (Trizol, Invitrogen). El ARN obtenido se resuspendió en 30 μ l de agua libre de ARNasas (DEPC 0,1%, Sigma) y se almacenó a -70°C hasta su uso. La transcripción reversa se hizo a partir de 150 ng de cada muestra de ARN usando *primers* oligo-(dT) y buffer de retrotranscripción (buffer 5X, dNTPs 1 mM, ARNsin 0.5 μ l, transcriptasa reversa M-MLV 1 μ l y ddH₂O). Se incubó la reacción por 60 minutos a 42 °C. El ADNc se usó para amplificar por PCR los mensajeros de IFN- β en una reacción que contenía 2 μ l de ADNc de muestra, MgCl₂ 25 mM (Promega), dNTPs 10 μ M (Sigma), enzima Taq polimerasa 0,25 μ l (Promega), primer sentido 20 μ M (GCA GCT GAA TGG AAA GAT CA), primer antisentido 20 μ M (TGG CAA AGG CAG TGT AAC TC).⁶ Las condiciones utilizadas para amplificar este gen fueron: temperatura inicial 94°C por tres minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 64°C por un minuto, 72°C por un minuto; extensión final a 72°C por 10 minutos. Para el análisis de los productos de la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Lonza) y teñidos con bromuro de etidio 0,5 μ g/ml (Sigma). La amplificación positiva se verificó por la presencia de amplicones de 97 pb.

BIOENSAYO PARA IFN- β EN CÉLULAS L929

El bioensayo, consiste en probar la actividad biológica del IFN- β producido, sobre un sustrato celular desafiando con un virus sensible a la actividad de IFN (virus de estomatitis vesicular, VSV); si la citoquina esta activa, protegerá a las células de la muerte inducida por el virus (efecto citopático, ECP). Los fibroblastos murinos L929 se cultivaron en cajas de 96 pozos (Corning) con DMEM (Sigma) más 5% de SFB y se trataron por 6 horas con diluciones 1:8 y 1:4 del sobrenadante de las células transfectadas (IFN- β). Luego de retirar el IFN- β se adicionaron varias diluciones del inóculo viral de VSV por una hora (MOI: 0,2, 0,5 y 1, MOI: Multiplicity of Infection 1, significa que se inocula una partícula viral por cada célula en el pozo). Los controles se trataron con el sobrenadante de las células transfectadas con el plásmido cortado (mock) o con medio de cultivo fresco.

Todas las células se dejaron por 18 horas post infección (p.i.) a 37°C y se procesaron para evaluar el ECP por la técnica de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio, Sigma). Este compuesto, de color amarillo se reduce formando

cristales de formazán de color violeta, por una reacción enzimática llevada a cabo por deshidrogenasas celulares, demostrando la integridad metabólica. Se adicionan 100 μ l de MTT (0,5 mg/ml, Sigma) en cada pozo y se incuba por 4 horas a 37°C, luego de retirarlo, el formazán se solubiliza con dimetil sulfoxido por 10 min y se leyó la absorbancia en un lector de ELISA (Stat Fax 2100) a 570 nm. El color y la absorbancia será mayor entre mas células viables haya. Cada condición se hizo por cuadruplicado y se repitió dos veces. Los datos de absorbancia fueron promediados y analizados por una prueba *t de Student*, comparando las absorbancias de los cultivos infectados, no infectados y tratados o no con el sobrenadante o con el mock.

EVALUACIÓN ANTI-HERPÉTICA DEL IFN- β MURINO RECOMBINANTE SOBRE NEURONAS SH-SY5Y

El HSV-1 fue cosechado a partir de células Vero inoculadas con una muestra de una vesícula de un paciente con herpes labial recurrente, cuya confirmación se hizo mediante ensayo de PCR, que permitía la amplificación específica de un fragmento del gen de la polimerasa viral de HSV-1, usando *primers* reportados previamente.⁷ El sobrenadante (cosecha viral) fue recolectado 96 h después de la inoculación cuando se evidenció ECP y se hizo titulación sobre células Vero con el ensayo de formación de placas de lisis. La línea celular neuronal SH-SY5Y fue adquirida comercialmente (CRL-2266, ATCC); se cultivó en medio de cultivo DMEM con un suplemento de 10% de SFB, y se mantuvo a 37°C con 5% de CO₂. En experimentos previos se definió que se debía infectar a estas neuronas con una MOI: 0,5 de HSV-1 por 18 horas. Fueron sembradas 50.000 células por pozo en cajas de 24 pozos y luego de 48 h de adhesión, fueron tratadas por 6 horas con diluciones 1:8 y 1:4 de los sobrenadantes de las L929 transfectadas (IFN- β), luego se retiró el tratamiento y se adicionó la suspensión viral (HSV-1, MOI: 0,5) por una hora, se lavó y se incubaron las células por 18 horas adicionales. Momento en el cual se procesaron por la técnica de MTT para evaluar el ECP. Se usó como control negativo, el tratamiento con los sobrenadantes de las células L929 transfectadas con el plásmido cortado (Mock).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos realizados a los valores de absorbancia de todas las pruebas se hicieron mediante la prueba estadística *t de Student* con una cola, asumiendo

varianzas iguales; prueba en la cual el valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El trabajo de investigación se llevó a cabo bajo toda la normatividad ética vigente, tal como se establece en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, Títulos IV, capítulos I y II y Título V.

RESULTADOS

OBTENCIÓN DEL IFN- β MURINO RECOMBINANTE Y ESTANDARIZACIÓN DEL BIOENSAYO EN CÉLULAS L929

La amplificación de los ARN mensajeros para IFN- β se realizó por RT-PCR de los cultivos de células L929 transfectadas con el plásmido pkCMV- IFN- β que contiene el gen que codifica para dicha citoquina. La presencia de amplicones, producto de la PCR se hizo evidente luego de la electroforesis en gel de agarosa. El ARNm para IFN- β de las células L929 transfectadas con 1 μ g y 2 μ g de ADN plasmídico se evidencia por una banda intensa en el gel de agarosa (Figura 1). En el bioensayo sobre las células L929, usando sobrenadantes de células transfectadas, se encontró que un MOI:0,5 de VSV causa más del 50% de muerte celular a las 18 horas (ECP) con respecto a las células tratadas con los sobrenadantes de células transfectadas con el plásmido cortado (Mock) (Figura 2). El tratamiento con ambas diluciones de IFN- β produjo un leve aumento del 25% en la viabilidad de las células ($p < 0,05$), cuando fueron infectadas con VSV a un MOI de 0,5 (Figura 3).

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTI-HERPÉTICO DE IFN- β MURINO RECOMBINANTE EN NEURONAS

El HSV-1 causó una pérdida del 24% en la viabilidad de los cultivos de células neuronales humanas en todos los MOI probados. Las células infectadas por 18 horas se observan con pérdida de la morfología neuronal y un hinchamiento citoplasmático típico del efecto citopático. La infección por HSV-1 hace que éstas se agrupen y generen un recogimiento de sus prolongaciones, perdiendo así, superficie de adhesión. La prueba de protección al ECP inducido por el HSV-1, en células SH-SY5Y tratadas con IFN- β , se demostró mediante la prueba del MTT. En este caso, la mortalidad fue significativamente menor (2,5%) en de las células tratadas con ambas diluciones (1:4 y 1:8)

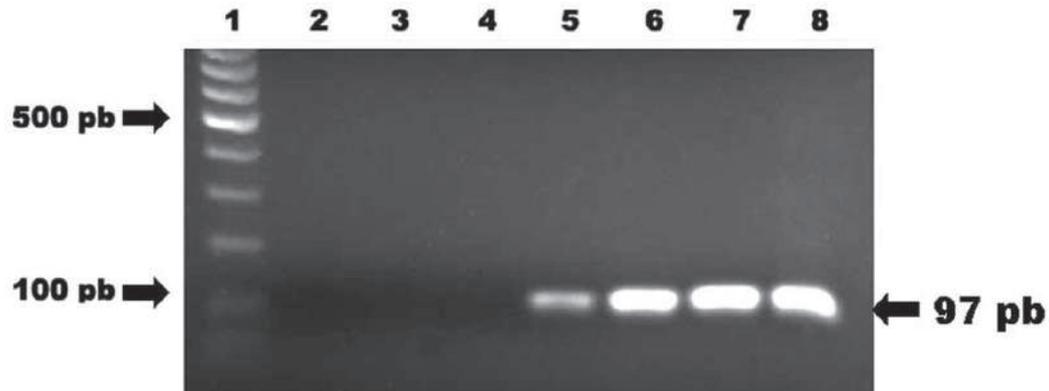


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones para IFN- β obtenidos por RT-PCR a partir de RNA de células L929 transfectadas. Tamaño esperado del producto, 97 pb Carril 1. Marcador de peso molecular. Carril 2. Control negativo (agua). Carriles 3 y 4. Cultivos no transfectados. Carril 5. Cultivo transfectado con el plásmido pkCMV- IFN- β cortado. Carril 6. Cultivo transfectado con 1 μ g de DNA plasmídico. Carril 7. Cultivo transfectado con 2 μ g de DNA plasmídico. 8. Control positivo, amplificación del plásmido.

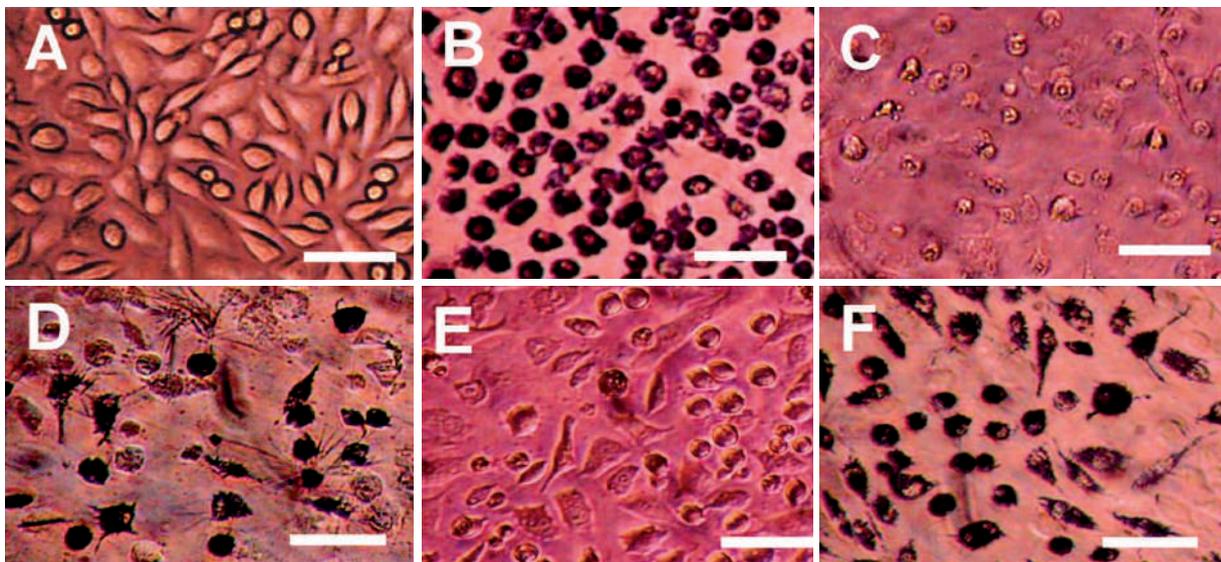


Figura 2. Estandarización del bioensayo para IFN- β , sobre células L929 usando virus de estomatitis vesicular. **A y B.** Controles, cultivos no infectados y tratados con el sobrenadante de células L929 transfectadas con el plásmido cortado (mock). En A, se observa una foto de contraste de fase de células con aspecto normal de un cultivo tratado con el mock y sin infectar. En B, se observan con precipitado morado las células viables que reducen el MTT. C y D. Cultivos tratados con el sobrenadante mock e infectados con VSV, aspecto en el microscopio de contraste de fase (C) y después de la incubación con el MTT (D). Note que hay un menor número de células adheridas y viables. E. Fotografía de contraste de fase de un cultivo de células tratado con una dilución 1:4 del sobrenadante de células transfectadas (IFN- β) e infectadas con VSV. F. Aspecto de los cristales de formazán después de la incubación con el MTT, el número de células positivas (viables) para MTT aumentó significativamente. Las barras de magnificación corresponden a 50 μ m.

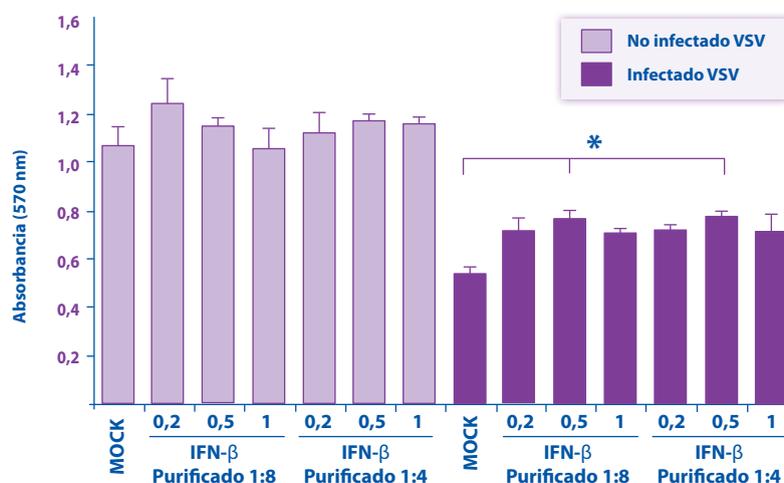


Figura 3. Datos de la absorbancia (test de viabilidad) de células L929 infectadas con VSV a diferentes MOI (0,2 – 0,5 – 1) y tratadas o no tratadas (mock) con IFN-β recombinante. Las barras grises representan la absorbancia de los cultivos no infectados y las barras negras la absorbancia de los cultivos infectados. El tratamiento con ambas diluciones de IFN-β indujo un aumento significativo en la viabilidad solamente en los cultivos infectados a un MOI:0,5. El asterisco indica diferencias significativas con el control infectado y tratado con el mock ($p < 0,05$).

de los sobrenadante de las células L929 transfectadas con respecto a los controles con medio y los controles mock (Figura 4). En resumen, el HSV-1 causa muerte celular en las neuronas SH-SY5Y que es revertido parcialmente por el pre-tratamiento con IFN-β. No se

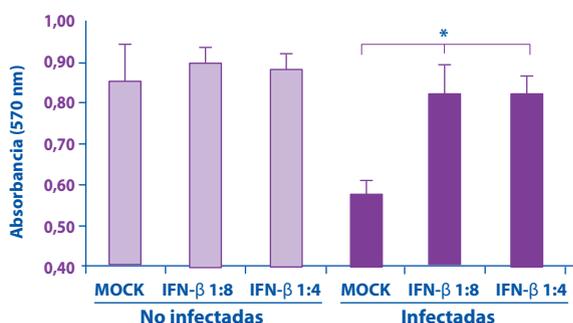


Figura 4. Medidas de las absorbancias (test de viabilidad) en células de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas con IFN-β recombinante e infectadas con HSV-1 a MOI 0,5. Las barras grises representan los cultivos no infectados y las barras negras, los cultivos infectados. El asterisco señala diferencias significativas con respecto a los cultivos tratados con el mock antes de la infección con HSV-1 ($p < 0,05$).

evidenció una disminución en la cantidad de partículas virales producidas por los cultivos en cada condición (resultados no mostrados), cuando se hizo el ensayo de formación de placas, ya que el título obtenido en el control de infección fue de $7,0 \times 10^4$ UFP/ml y en los cultivos tratados con el mock fue de $8,6 \times 10^4$ UFP/ml. Cifras similares se encontraron en los cultivos tratados con una dilución 1:8 del sobrenadante de células transfectadas con el plásmido de IFN-β ($1,0 \times 10^5$ UFP/ml) y los tratados con una dilución 1:4 del sobrenadante ($1,0 \times 10^5$ UFP/ml).

DISCUSIÓN

Los Interferones α/β endógenos son citoquinas antivirales que antagonizan la replicación del virus HSV-1 a nivel de transcripción y traducción. Estas citoquinas, controlan la infección aguda por HSV-1 y facilitan la respuesta inmune adaptativa durante la infección. Sin embargo la infección persiste, evidenciando que el virus es capaz de bloquear la respuesta antiviral protectora del IFN. Los IFN- α/β actúan a través del mismo receptor, facilitando la transfosforilación y activación de Tyk2 y JAK1, y por último a la molécula STAT.⁹ Se

ha demostrado por ensayos de inmunoquímica, que la infección por HSV-1 en ratones induce la producción de IFN- β y el aumento en la síntesis del respectivo receptor para la citoquina; demostrando de esta manera que parte de su alta efectividad antiviral, se debe a la capacidad de regulación autocrina/paracrina.⁶

Este mecanismo involucra el nivel de expresión y/o fosforilación de JAK1 y STAT1. La fosforilación de STAT1, permite la translocación al núcleo del factor ISGF3; lo cual induce la transcripción de genes estimulados por IFN. Dos vías antivirales principales se activan con la unión de IFN- β al receptor: OAS y PKR. OAS permite la activación de ARNasa-L endógena, la cual degrada transcritos virales e inactiva la maquinaria transcripcional. Por su parte PKR cataliza la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF-2 α , impidiendo el intercambio de nucleótidos de guanina, catalizado por este factor; inhibiendo de ésta manera la traducción en la célula hospedera. Se sabe que la infección con HSV-1 en cultivos de ganglio trigeminal murino, induce un aumento en la transcripción de los genes OAS-1a, OAS-1b, PKR y ARNasa L. A pesar de haber un mayor número de células no neuronales en dichos cultivos, las células más susceptibles a la infección son las neuronas, evidenciando de esta manera el neurotropismo de este agente viral.⁶ Estos resultados se relacionan con el notable efecto citopático observado en los cultivos de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y infectadas con HSV-1 a diferentes MOI en este trabajo.

No se conoce la forma como el HSV-1 antagoniza la activación de la cascada de señalización inducida por IFN durante la infección. Se propone que la proteína ICP0 puede estar implicada en este bloqueo por la disrupción de los dominios nucleares ND-10; lugar donde se lleva a cabo la activación de los genes relacionados con IFN.¹⁰ Otra vía por la cual puede ocurrir dicho bloqueo, es debido a que el virus HSV-1 antagoniza la fosforilación de STAT1 inhibiendo la activación de JAK1.¹¹

En este trabajo se estandarizó el bioensayo para probar el efecto del IFN- β murino recombinante en células L929 infectadas con virus de estomatitis vesicular a diferentes MOI, encontrando un efecto protector del IFN- β murino recombinante producido. Este efecto protector se relaciona con los resultados obtenidos por Maheshwari et al,¹¹ en los cuales se demostró mediante microscopía electrónica que el tra-

tamiento con IFN- β murino en células L (las células L929 son un clon de la cepa L) infectadas con VSV, reducía significativamente las glicoproteínas superficiales del VSV,¹³ generando de esta manera, viriones con poca capacidad infecciosa.

En estudios recientes se evaluó la eficacia anti-herpética del IFN- β y de los diferentes subtipos de IFN- α en cultivos de células L929 mediante transfección usando como vector el mismo plásmido usado en este trabajo (pkCMVintPolylink). Se demostró que las células transfectadas con el plásmido recombinante de IFN- β son menos sensibles a la infección por el virus HSV-1, que las células transfectadas con el plásmido recombinante que contenía los diferentes tipos de IFN- α . Esta diferencia en el efecto protector se debe a la fuerte activación de STAT1 por parte del IFN- β a las 18 horas después de realizada la transfección y a que el IFN- β transgénico suprime la expresión de los genes virales α , β y γ (ICP27, TK y gB respectivamente).^{14,15} La transfección de células Vero con el plásmido de IFN- β reprime la replicación del ADN y la síntesis de proteínas del HSV-1, con un aumento concomitante de transcritos para STAT1, PKR y OAS.¹⁶ En este trabajo encontramos que el IFN- β murino recombinante producido con el mismo vector, tiene un efecto protector significativo tanto contra el VSV como el HSV-1 en células L929 y en células SH-SY5Y a las 6 horas de realizado el tratamiento; sugiriendo una activación del efecto protector del IFN- β y la consecuente inhibición en la expresión de genes de ambos virus.

Previamente se ha reportado, mediante PCR para amplificar transcritos del HSV-1 que el tratamiento con IFN- β humano no evita que el HSV-1 entre a las células SK-N-SH (las células SH-SY5Y fueron clonadas a partir de esta línea) y el efecto inhibitorio puede ser bloqueado incrementando el MOI a utilizar.¹⁷ Esto podría explicar en parte que a pesar de haber encontrado un efecto anti-herpético del IFN- β murino recombinante en células SH-SY5Y humanas en este trabajo, evidenciado mediante mediciones de la viabilidad celular; los sobrenadantes recolectados de este experimento analizados por el ensayo de plaqueo, no muestran una disminución en la producción de partículas virales con dicho tratamiento. Hay evidencias que indican que la combinación del IFN- β con el IFN- γ potencializa el efecto anti-herpético *in vitro* e *in vivo*.¹⁸ En este trabajo no se comparó la bioactividad del IFN- β murino recombinante producido con

un IFN- β estándar (entre otras cosas porque no esta disponible). Por esta razón, es posible que el moderado efecto anti-herpético del IFN- β murino recombinante en las células SH-SY5Y, se deba a la falta de calidad o a una falla en la producción de la proteína recombinante. Se requiere, cuantificar por ELISA la proteína producida o compararla contra un estándar comercial, para evidenciar la calidad de IFN producido. Ello esta siendo llevado a cabo en la segunda parte de nuestro trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Teresa Rugeles, del Grupo de Inmunovirología de la Universidad de Antioquia por facilitarnos la cepa de virus de estomatitis vesicular usada en este trabajo. Agradecimientos al Dr. Daniel J.J. Carr del Dpt. of Ophthalmology de la University of Oklahoma, por la donación del plásmido usado en el trabajo. Los fondos usados en esta investigación fueron aportados parcialmente por el Centro de Investigaciones de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores de este manuscrito declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Akhtar J, Shukla D.** Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.* 2009; 276: 7228-36.
2. **Amir J, Harel L, Smetana Z, Varsano I.** Treatment of herpes simplex gingivostomatitis with aciclovir in children: a randomised double blind placebo controlled study. *Br Med J.* 1997; 314: 1800-3.
3. **Penfold ME, Armati P, Cunningham AL.** Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91: 6529-33.
4. **Sawtell NM, Thompson RL.** Rapid *in vivo* reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *J Virol.* 1992; 66: 2150-6.
5. **Ship II, Miller MF, Ram C.** A retrospective study of re-current herpes labialis (RHL) in a professional population, 1958-1971. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1977; 44: 723-30.
6. **Marín LM.** Expresión de oligoadenilato sintetasa 1b (OAS-1b) en neuronas trigeminales infectadas con HSV-1. Trabajo de grado, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia. 2007.
7. **Sun, Y, Kum, R, Hoon, S, Pei, P.** Detection and Genotyping of Human Herpes Simplex Viruses in Cutaneous Lesions of Erythema Multiforme by Nested PCR. *J Med Virol* 2003; 71: 423-428.
8. **Al-khatib K, Williams BR, Silverman RH, Halford W, Carr DJ.** The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR and the murine 2,5'-oligoadenylate synthetase-dependent RNase L are required for IFN-beta-mediated resistance against herpes simplex virus type 1 in primary trigeminal ganglion culture. *Virology* 2003; 313:126-35.
9. **Samuel S.** Antiviral Actions of Interferons. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 14: 778 – 809.
10. **Poon AW, Gu H, Roizman B.** ICP0 and the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 independently block histone deacetylation to enable gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 9995-99.
11. **Chee AV, Roizman B.** Herpes simplex virus 1 gene products occlude the interferon signaling pathway at multiple sites. *J Virol.* 2004; 78: 4185-96.
12. **Maheshwari R, Friedman R.** Effect of interferon treatment on vesicular stomatitis virus (VSV): Release of unusual particles with low infectivity. *Virology* 1980; 101: 399 – 407.
13. **McSharry J, Compans R and Choppin P.** (1971). Proteins of Vesicular Stomatitis Virus and of Phenotypically Mixed Vesicular Stomatitis Virus-Simian Virus 5 Virions. *J Virol.* 1971; 8: 722-29.
14. **Cui B, Carr DJ.** A plasmid construct encoding murine interferon beta antagonizes the replication of herpes simplex virus type I *in vitro* and *in vivo*. *J Neuroimmunol.* 2000; 108: 92 - 102.
15. **Härle P, Cull V, Agbaga M, Silverman R, Williams B, James C, Carr DJ.** Differential effect of murine alpha/beta interferon transgenes on antagonization of herpes simplex virus type 1 replication. *J Virol.* 2002; 76: 6558-67.
16. **Härle P, Noisakran S, Carr DJ.** The application of a plasmid DNA encoding IFN-alpha 1 postinfection enhances cumulative survival of herpes simplex virus type 2 vaginally infected mice. *J Immunol.* 2001; 166: 1803-12.
17. **Sainz B, Halford W.** Alpha/Beta interferon and gamma interferon synergize to inhibit the replication of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2002; 76: 11541-50.
18. **Pierce A, DeSalvo J, Foster T, Kosinski A, Weller S and Halford W.** Beta interferon and gamma interferon synergize to block viral DNA and virion synthesis in herpes simplex virus-infected cells. *J Gen Virol.* 2005; 86: 2421-32.