

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA
INDUCIDA POR INTERFERÓN- β FRENTE A HERPES SIMPLEX VIRUS
TIPO 1 EN CULTIVOS PRIMARIOS DE GANGLIO TRIGEMINAL MURINO**

Ana María Low Calle

Universidad El Bosque
Facultad de Ciencias
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
Bogotá D.C.
2011

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA
INDUCIDA POR INTERFERÓN- β FRENTE AL VIRUS HERPES SIMPLEX
TIPO 1 EN CULTIVOS PRIMARIOS DE GANGLIO TRIGEMINAL MURINO**

Ana María Low Calle

Tesis

**Para optar el título de
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas**

Jaime E. Castellanos MSc. PhD.

Director

Instituto de Virología

Jeanette Prada-Arismendy MSc.

Codirectora

Instituto de Virología

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Bogotá D.C.

2011

AGRADECIMIENTOS

A Jaime y a Jeanette.

A Lina Marín.

A la convocatoria Interna de Pequeños proyectos de Investigación de la Universidad El Bosque.

A la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional.

A Colciencias y el programa Jóvenes investigadores Virginia Gutiérrez de Pineda.

A mis compañeros de Virología.

Al mismo tiempo agradezco especialmente:

A mis papás y a mi hermano.

A Santi.

A Mel y a Lali.

Gracias por su apoyo, no lo hubiera logrado sin ustedes.

CONTENIDO

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
1. EL VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 1	10
1.1. Estructura viral	11
1.1.1. Región Central o Core	11
1.1.2. La Cápside	12
1.1.3. El Tegumento	12
1.1.4. La Envoltura	12
1.2. Ciclo viral del HSV-1	12
1.2.1. <i>Entrada del virus a la célula epitelial</i>	12
1.2.2. <i>Expresión de genes virales y Replicación Viral</i>	13
Genes Inmediatamente Tempranos (Genes α)	13
Genes Tempranos (Genes β)	13
Genes tardíos (Genes γ)	14
1.2.3. <i>Ensamblaje del virión y salida de la progenie viral</i>	15
1.2.4. <i>Infección latente en el Ganglio Trigeminal</i>	15
<i>Establecimiento de la latencia</i>	16
<i>Mantenimiento de la latencia</i>	16
<i>Reactivación</i>	19
2. EL GANGLIO TRIGEMINAL	20
3. EL INTERFERÓN-β	21
4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL IFN-β	21
5. REGULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN JAK/STAT	22
5.1. <i>Supresor de Señalización de Citoquinas-3</i>	23
6. GENES INDUCIDOS POR INTERFERÓN (ISGs) Y SU ACTIVIDAD ANTIVIRAL	23
6.1. Proteína Kinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR)	23
6.2. 2'-5'- Oligoadenilato Sintetasa y RNasa L	24
7. MECANISMOS DEL HSV-1 PARA EVADIR LA RESPUESTA A IFN	24
II. OBJETIVOS	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Cultivos primarios de ganglio trigeminal murino	27
2. Tratamiento con IFN- β e Infección con HSV-1	27
3. Ensayo de viabilidad celular y determinación de la dosis de IFN- β	28

4. Títulos Virales y Ensayo de Plaqueo	28
5. Ensayo de inmunoperoxidasa para Neurofilamento	29
6. Ensayo de inmunoperoxidasa para HSV-1	30
7. Extracción de RNA, Retro-transcripción y PCR cuantitativa	30
8. Obtención de Lisados celulares totales	32
9. SDS-PAGE y transferencia	33
10. Western blot	33
11. Análisis Estadístico	35
IV. RESULTADOS	35
1. Caracterización de Cultivos de GT Murino	35
2. El tratamiento con 1000 U/ml de IFN- β disminuye la producción de partículas virales y evita la muerte celular causada por la infección	36
3. El tratamiento con IFN-B protege las células de GT de la infección por HSV-1	39
4. Infección con HSV-1 induce la sobre-expresión de Rnasa L y levemente de Oas1a, pero disminuye la expresión constitutiva de Pkr	41
5. IFN- β disminuye la expresión de los tres tipos de genes virales α , β , y γ	43
6. La infección por HSV-1 induce la expresión del gen Socs-3	44
7. La infección por HSV-1 inhibe parcialmente la activación de la cascada de señalización de Jak-Stat inducida por IFN- β	45
V. DISCUSIÓN	47
El cultivo de GT murino enriquecido en neuronas puede ser una aproximación mejor para evidenciar la respuesta de las neuronas del GT frente al HSV-1	47
El IFN- β disminuye la producción de partículas virales de HSV-1, evita la muerte celular y la diseminación del virus en la monocapa de células	48
El IFN- β causa una inhibición transcripcional de los genes virales que podría controlar la infección aguda en el GT	49
La infección incrementó los transcritos de Rnasa L e incrementó ligeramente los de Oas1a en cultivos de GT	51
La infección con HSV-1 disminuye los niveles constitutivos de Pkr	51
El IFN- β induce la expresión de Pkr y Oas en cultivos de GT	52
El IFN- β no incrementó los transcritos de Rnasa L en el GT in Vitro	53
La infección de cultivos de GT con HSV-1 induce la expresión de Socs-3, pero el tratamiento con IFN- β inhibe esta expresión	54

La Infección con HSV-1 causa una inhibición parcial de la activación de la cascada de señalización Jak-Stat inducida por IFN- β	55
VI. CONCLUSIONES	57
VII. PERSPECTIVAS	58
VIII. REFERENCIAS	59

RESUMEN

El virus *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1) es el principal causante de infecciones virales en la mucosa oral y regiones periorales. Esta infección es seguida por la diseminación del virus a neuronas sensoriales del ganglio trigeminal donde establece una infección latente de por vida. Se ha descrito que la respuesta inmune es importante para el control de la infección por HSV-1 y para el establecimiento de infecciones en el ganglio trigeminal. Sin embargo, no se conoce totalmente el papel de la respuesta inmune innata, en especial la de los Interferones (IFNs), frente al HSV-1 en el ganglio trigeminal. Por esto, se propuso indagar el papel del IFN- β ante a la infección por HSV-1 en cultivos primarios de ganglio trigeminal de ratón. Así como evidenciar la expresión de genes inducidos por IFN en estas células tras la infección por HSV-1 y tras el tratamiento con IFN. Al mismo tiempo, evaluar la activación de la cascada de señalización Jak-Stat activada por IFN- β en cultivos de GT infectados con HSV-1.

Se evidenció que el IFN- β tiene un efecto antiviral frente al HSV-1 en cultivos primarios de GT murino, causando una inhibición transcripcional de los 3 tipos de genes virales del ciclo lítico del virus, disminuyendo la producción de partículas virales y evitando la muerte celular por el virus.

Adicionalmente la infección con HSV-1 incrementó los transcritos de *Oligoadenilato sintetasa-1a* y *Rnasa L*. El tratamiento con IFN- β causó la sobre-expresión de los genes de la *Proteína kinasa R* y *Oligoadenilato sintetasa-1a*; indicando que la actividad antiviral del IFN- β puede estar mediada por estas moléculas. Además, la infección disminuyó significativamente los niveles constitutivos del gen de la *Proteína kinasa R*, que participa en la inhibición traduccional mediada por IFN. Lo cual podría indicar que en el ganglio trigeminal ocurre un mecanismo nuevo de evasión viral al IFN, que hasta el momento no había sido descrito.

Asimismo, la infección por HSV-1 causó la inducción del gen del Supresor de Señalización de Citoquinas-3 relacionado con el apagamiento de la señal del IFN- β , pero esta inducción disminuyó con el pre-tratamiento con IFN- β . Finalmente se evidenció que la infección con HSV-1 inhibió parcialmente la activación de la cascada de señalización Jak-Stat inducida por IFN- β , lo cual también podría representar un nuevo mecanismo de evasión viral que ocurre en el GT durante la etapa de infección aguda. Estos mecanismos virales de regulación de la respuesta inducida por IFN, que no han sido reportados previamente en ganglio trigeminal, podrían permitirle al HSV-1 establecer infecciones agudas de forma más eficiente, al contrarrestar parcialmente la

respuesta inmune innata mediada por IFN- β en el GT y favorecer la instauración de la latencia.

ABSTRACT

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is the main pathogen that causes viral infections in oral mucosa and perioral regions. This is followed by viral diffusion through the sensory neurons in trigeminal ganglion, where it establishes life-long latent infections. It has been described that immune response is important to control HSV-1 infections and establishment of latency. However, it is not well known completely, the role of innate immune response, especially the role mediated by Interferons (IFNs), against HSV-1 infections in trigeminal ganglia. For all these, we aimed to dig into the IFN- β role against HSV-1 infection in mice trigeminal ganglion primary cultures. To evaluate IFN stimulated gene expression, in these cells after HSV-1 infection or IFN- β treatment. Besides, we aim to evaluate activation of IFN- β Jak-Stat signal transduction in trigeminal ganglion cultures after HSV-1 infection.

It was observed that IFN- β exerts an antiviral effect against HSV-1 in trigeminal ganglion cultures that causes transcriptional inhibition of viral lytic genes decreasing virions production and impairing cell death induced by viral infection.

Additionally, HSV-1 infection increased *Oligoadenylate synthetase-1a* y *Rnase L* mRNA; and IFN- β treatment caused *Oligoadenylate synthetase-1a* and *Protein kinase R* induction, which implies that IFN- β antiviral activity may occur through these molecules. Besides infection significantly decreased constitutive levels *Protein kinase R* gene, that causes translational inhibition after IFN treatment. This could suggest that in trigeminal ganglia, a viral evasion mechanism exists that has not been described previously.

Furthermore, HSV-1 infection caused Suppressor of Cytokine signalling-3 gene up-regulation, which is related to IFN negative feedback. But this induction decreased after IFN- β pre-treatment. Finally HSV-1 infection partially inhibited IFN Jak-Stat pathway after infection. This also could be a novel viral evasion mechanism that occurs in trigeminal ganglion during acute herpes infection. These viral mechanisms of immune regulation to IFN allow the virus to establish acute infections more efficiently, by partially counteracting IFN- β innate immune response in trigeminal ganglia favoring viral latency establishment.

INTRODUCCIÓN

1. EL VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 1

El virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) es un patógeno humano con distribución mundial, que afecta entre el 60-80% de la población mundial (Cunningham *et al.* 2006). Este virus causa infecciones en las células epiteliales de la mucosa oral y la piel produciendo una serie de manifestaciones clínicas que van desde la completa asintomatología, hasta fiebre, edema, lesiones vesiculares y gingivostomatitis (Taylor *et al.* 2002). Las infecciones por HSV-1 comunmente no ponen en riesgo la vida, pero en personas inmunocomprometidas y neonatos, pueden llegar a causar patologías graves como queratits, encefalitis e infecciones severas y ampliamente diseminadas (Taylor *et al.* 2002).

Este virus se clasifica dentro del grupo de virus de DNA doble cadena, en la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *simplexvirus*. Dentro de la familia *Herpesviridae* se encuentran el *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1) y tipo 2, el Citomegalovirus Humano, el virus de Varicela-Zoster, el virus de Epstein-Barr, y los virus Herpes 6, Herpes 7 y Herpes 8 humanos. Todos infectan humanos y tienen como característica que su replicación destruye la célula infectada, y que poseen la capacidad de establecer infecciones latentes (Pellett y Roizman, 2007).

El HSV-1 promueve una infección lítica en células epiteliales de la mucosa oral o la piel de la cara, resultando en la producción de partículas virales infecciosas y en la muerte de la célula infectada. Posteriormente, el virus se disemina por transporte retrógrado hacia las neuronas sensoriales del ganglio trigeminal, donde establece una infección latente; caracterizada por la presencia del genoma viral, sin replicación y con una baja expresión génica (Steiner *et al.* 2007). En este estado, el virus mantiene el potencial para reactivarse, replicarse y causar infecciones recurrentes (Bohmer y Lehman, 1997; Steiner *et al.* 2007).

Las infecciones primarias se adquieren por contacto directo de membranas mucosas o abrasiones de la piel con lesiones o fluidos corporales de individuos infectados. Tras un periodo de incubación de 2-20 días, aparecen erupciones vesiculares que progresan a úlceras y que finalmente sanan al cabo de 10-14 días, sin dejar cicatriz (Fatahzadeh y Schwartz, 2007; Arduino y Porter, 2008).

Tras la infección primaria, el virus infecta neuronas sensoriales del ganglio trigeminal donde establece infecciones latentes, a partir de las cuales sólo entre el 20-40% de los casos presentan reactivaciones (Fatahzadeh y Schwartz, 2007). El herpes labialis es la forma más común de reactivación, y se caracteriza por lesiones vesiculares en el labio, la piel o el ala de la nariz (Hubber, 2003). También pueden aparecer vesículas genitales tras el contacto de lesiones orales activas o asintomáticas con la mucosa genital (Steiner *et al.* 2007). Adicionalmente, pueden ocurrir manifestaciones oculares, (queratitis, entre otras) como consecuencia de la diseminación hacia el ojo desde un sitio no ocular infectado (Kaye y Choudhary, 2006; Arduino y Porter, 2008; Fatahzadeh y Schwartz, 2007; Roizman *et al.* 2007). Adicionalmente, el HSV-1 es la causa más común de encefalitis esporádica viral y fatal, y es una de las manifestaciones más devastadoras de este virus (Cunningham *et al.* 2006 y Steiner *et al.* 2007).

1.1. Estructura viral

El HSV-1 es un virus envuelto con un genoma formado por DNA de doble cadena y el virion consta de 4 partes:

1.1.1. Región Central o Core: es el área del virion donde se encuentra el genoma viral, que es una molécula lineal de DNA de doble cadena, con un tamaño de 152.260 pares de bases (McGeoch *et al.* 1988). El genoma se encuentra asociado a proteínas altamente básicas que neutralizan parte de la carga negativa del DNA permitiendo el plegamiento del DNA en el interior de la cápside. El genoma codifica cerca de 84 productos génicos, que regulan el proceso infeccioso en múltiples etapas (Taylor *et al.* 2002). También, posee 3 orígenes de replicación en 2 fragmentos de DNA unidos covalentemente, el fragmento largo L y el fragmento corto S. Cada uno de estos fragmentos está formado por secuencias únicas (U_L o U_S) flanqueadas por repeticiones invertidas denominadas ab y ac (Taylor, *et al.* 2002; Roizman *et al.* 2007).

1.1.2. La Cápside: posee estructura icosaédrica y rodea el genoma viral. Está compuesta de 4 proteínas virales (VP) VP5, VP26, VP23, y VP19C. Dentro de estas, VP5 es la proteína principal que forma la cápside y la proteína VP26 está presente en forma de anillo sobre VP5. VP23 y VP19C forman las tripleteas que conectan entre sí los capsómeros formados por VP5 y VP26. Estas proteínas conforman la estructura externa de la cápside. En el interior la cápside también contiene la proteína pUL6 que está organizada en un dodecamero formando un portal, a través del cual es DNA es

empaquetado en el interior de la cápside durante el ensamblaje viral. VP24 es una proteasa que procesa parte del interior de la cápside durante la encapsidación del DNA (Roizman *et al.* 2007).

1.1.3. El Tegumento: se encuentra en el espacio entre la envoltura lipídica y la cápside. Contiene cerca de 23 proteínas virales, dentro de las que se encuentran proteínas tales como ICP4, ICP0, ICP34.5, vhs (del inglés *viral host shutoff*), Timidina kinasa, VP16, entre otras (Kelly *et al.* 2009). El tegumento sirve como un compartimiento para el transporte de las proteínas necesarias en las etapas tempranas de infección (Bohmer y Lehman, 1997; Whitley y Roizman, 2001). Se ha descrito que el tegumento, cumple diferentes papeles durante la infección viral, entre ellos se encuentran: transportar la cápside durante la entrada del virus a la célula, permitir el transporte de la cápside hacia el núcleo, regular la transcripción y la traducción, participa en la replicación del DNA y en la apoptosis durante la infección. El tegumento también está involucrado en la regulación de la respuesta inmune, la salida de la cápside del núcleo, el ensamblaje y la salida del virión (Kelly *et al.* 2009).

1.1.4. La Envoltura: consiste en una bicapa lipídica con 11 glicoproteínas virales en su superficie: glicoproteína B (gB), gC, gD, gE, gG, gH, gI, gL, gM, varias de ellas formadas por 2 subunidades proteicas, así como proteínas de membrana no glicosiladas (Roizman *et al.* 2007).

1.2. Ciclo viral del HSV-1

1.2.1. Entrada del virus a la célula epitelial

El HSV-1 se une inicialmente a la membrana de la célula epitelial, a través de las proteínas gC y gB de la envoltura del virión, las cuales se unen al proteoglicano heparán sulfato de la membrana celular. A continuación la proteína viral gD se une a varias proteínas reportadas como receptores celulares, tales como: Nectina-1 y -2 que están presentes en el epitelio y en las uniones sinápticas de las neuronas. El Mediador de Entrada de Virus Herpes (HVEM) presente en linfocitos T humanos y células Natural Killer (Garner, 2003; Rey, 2006). Posteriormente la gD interactúa con gB y gH/gL permitiendo la fusión de la envoltura viral con la membrana celular (Taylor *et al.* 2002; Roizman *et al.* 2007). Así, la cápside y el tegumento son liberados en el citoplasma y transportados hacia el núcleo usando microtúbulos y el motor molecular dineína. El genoma viral es introducido al núcleo a través del poro nuclear, donde se

inicia la síntesis de RNAs mensajeros virales y donde ocurre la replicación viral (Sodeik *et al.* 1997; Garner, 2003; Arduino y Porter, 2008).

1.2.2. Expresión de genes virales y Replicación Viral

Durante la infección productiva, el HSV-1 utiliza la célula para expresar cerca de 84 productos génicos necesarios para su replicación y diseminación. La transcripción de estos genes ocurre en el núcleo celular, mediado por la RNA polimerasa II celular. Esta expresión ocurre en forma de una cascada altamente regulada, según la cual los genes se clasifican en 3 grupos diferentes: Genes inmediatamente tempranos, tempranos y tardíos (Roizman *et al.* 2007).

Genes Inmediatamente Tempranos (Genes α)

Tras el ingreso del DNA viral al núcleo, se inicia la transcripción de genes α . Su expresión ocurre entre 2-4 h post infección y activan la expresión de genes virales tempranos (β) y tardíos (γ) (Honess y Roizman, 1974; Roizman *et al.* 2007).

Los productos de los genes α son las proteínas multifuncionales: ICP0 (del Inglés *Infected Cell Protein 0*), ICP4, ICP22, ICP27 y Us1.5, funcionan como activadores transcripcionales de otros genes virales, como represores, o controlan algunas funciones de la célula (Taylor *et al.* 2002; Roizman *et al.* 2007). **ICP0**, es una proteína codificada por el gen $\alpha 0$. Está presente en el tegumento y no es esencial para la replicación viral. La proteína ICP0 posee 775 aminoácidos, y junto con proteínas celulares activa la transcripción de genes virales α , β y γ . También altera la célula para crear un ambiente propicio para la replicación viral y la síntesis de proteínas virales (Taylor *et al.* 2002; Roizman *et al.* 2007). Funciona como ligasa de ubiquitinas, cumple un papel en el establecimiento y reactivación de la latencia; y se ha descrito que altera la vía de señalización de interferón (Mossman y Smiley, 2002; Hagglund y Roizman, 2004; Melroe *et al.* 2004; Efstathiou y Preston, 2005; Melroe *et al.* 2007).

Genes Tempranos (Genes β)

Los genes virales tempranos o genes β , se expresan entre 4 y 8 h post infección, al cabo de las cuales su expresión disminuye. Marcan el inicio de la replicación del genoma viral y requieren de la presencia de proteínas α funcionales para la activación de su expresión (Honess y Roizman, 1974; Taylor *et al.* 2002; Roizman *et al.* 2007).

Las proteínas β están involucradas en la replicación del DNA viral y en el metabolismo de nucleótidos, promueven la expresión de genes virales γ y no aumentan su

expresión después de la replicación viral (Roizman *et al.* 2007). Con el inicio de la transcripción de los genes β , la replicación del genoma viral inicia; primero en forma de θ (Theta) y luego en forma de círculo rodante produciendo múltiples copias del genoma, generadas en forma de concatámeros que son clivados en monómeros para su posterior ensamblaje dentro de la cápside (Lehman y Boehmer, 1999). Con la aparición de las proteínas β y el inicio de la replicación del DNA viral, se disminuye la expresión de genes α y de los mismos genes β (Honesty y Roizman, 1974). Dentro las proteínas más importantes, codificadas por genes β , que participan en la replicación del genoma viral están: U_L9 que es una proteína de unión al origen de replicación, el complejo helicasa-primasa (U_L5, U_L8, U_L52) y la DNA polimerasa (U_L30 y U_L42) (Taylor *et al.* 2002). También son necesarias otras proteínas β para el procesamiento del DNA y el metabolismo de nucleótidos como timidina kinasa, ribonucleótido reductasa, así como ligasas y topoisomerasas (Taylor *et al.* 2002). La **Timidina Kinasa (TK)**, es una proteína codificada por el gen β U_L23, que fosforila nucleósidos de tipo pirimidina e incluso purinas, que son los precursores necesarios para la síntesis del DNA viral. Esta enzima viral es importante en células que no se dividen activamente, como neuronas, ya que en estas células no se expresa una enzima celular con función análoga a la de la enzima viral TK. Por lo tanto esta enzima es indispensable para la reactivación del virus en las neuronas (Roizman *et al.* 2007).

Genes tardíos (Genes γ)

Los genes γ codifican las principales proteínas estructurales, se expresan una vez ha comenzado la síntesis de DNA viral, e incrementan su expresión hasta las 12h post infección (Honesty y Roizman, 1974).

Los genes γ se han dividido en dos grupos, los genes tardíos tempranos (del inglés *Leaky late*) o γ_1 , que se expresan un poco más temprano en la infección y de forma independiente de la replicación. Su expresión se incrementa poco tras la síntesis del DNA, y dentro de este grupo se encuentran los que codifican para las proteínas ICP34.5, gB, gD e ICP5 (Weir, 2001; Roizman *et al.* 2007). El segundo grupo, los genes tardíos verdaderos o γ_2 se expresan más tarde en la infección y dependen de la replicación previa del genoma viral para su expresión (Roizman *et al.* 2007). La **Glicoproteína B (gB)** es una proteína codificada por el gen γ_1 denominado U_L27. Posee 904 aminoácidos y es una proteína esencial para la entrada del virus a la célula, ya que se une al heparán sulfato y permite la fusión con la membrana celular,

por lo cual los virus que no poseen esta proteína no son infecciosos (Roizman *et al.* 2007).

1.2.3. Ensamblaje del virión y salida de la progenie viral

Las proteínas γ que formarán la cápside, son sintetizadas en el citoplasma y posteriormente transportadas hacia el núcleo donde ocurre el ensamblaje final de las cápsides. En el ensamblaje, la proteína VP5 se organiza en estructuras denominadas capsómeros y es la principal proteína formadora de la cápside. Estos capsómeros se unen entre sí por estructuras más pequeñas formadas por VP19C y VP23. Adicionalmente a estas proteínas que forman la estructura externa de la cápside, se encuentra VP22a y VP21 que son proteínas de andamiaje que se encuentran en el interior de la cápside, formando una estructura alrededor de la cual, las proteínas de la cápside se ensamblan. Estas proteínas se asocian, formando una procápside, junto con la proteína U_L6, que es la que forma el portal de entrada para el DNA viral. Posteriormente, la procápside sufre un cambio estructural adquiriendo la estructura poliédrica que la caracteriza (Roizman *et al.* 2007). Finalmente, el DNA viral es clivado en monómeros y empaquetado dentro de la cápside formando la nucleocápside, la cual adquiere la envoltura viral a partir de membranas obtenidas por evaginación de la membrana nuclear interna. O se libera en el citoplasma y adquiere su envoltura a partir de compartimientos derivados del aparato de Golgi. Luego es transportada en vesículas hacia la membrana citoplasmática donde el virión es liberado en el espacio extracelular. Donde se disemina localmente en el epitelio y hacia las neuronas sensoriales que inervan el epitelio infectado (Taylor *et al.* 2002; Roizman *et al.* 2007).

1.2.4. Infección latente en el Ganglio Trigeminal

Tras la infección y replicación local en el epitelio, el HSV-1 entra a células neuronales por fusión de la envoltura viral con la membrana celular de la terminal nerviosa, de forma dependiente de pH (Nicola *et al.* 2005). Esta fusión está mediada por la proteína Nectina-1 que es una proteína de adhesión celular presente en uniones sinápticas y que actúa como el receptor principal del virus en neuronas (Simpson *et al.* 2005). Desde la terminal de la neurona sensorial, el virión es llevado por transporte axonal retrógrado asociado a microtúbulos, hacia el núcleo de las neuronas sensoriales. En el núcleo, el genoma viral permanece de por vida en estas células en forma circular extracromosomal, no replicativa y asociado a nucleosomas (Efstathiou y Preston, 2005; Roizman *et al.* 2007; Arduino y Porter, 2008).

Dentro de las neuronas ocurre un ciclo más restringido, en el cual el virus no se replica y la expresión de genes líticos es suprimida. Lo que favorece el establecimiento de la latencia. En este estado, sólo se expresan un conjunto de transcritos denominados Transcritos Asociados a Latencia (LAT), cuya función será descrita posteriormente (Efsthathiou y Preston, 2005; Cunningham *et al.* 2006). El ganglio trigeminal es el principal sitio de establecimiento de la infección latente que permite el mantenimiento del genoma viral, de por vida, en una forma no patogénica, no replicativa. Esta forma de infección sirve como reservorio de virus para la generación de infecciones posteriores y diseminación (Arduino y Porter, 2008). Al recibir ciertos estímulos, que se mencionaran posteriormente, se genera la reactivación del virus, que activa la expresión de genes virales del ciclo lítico que ingresando el virus al ciclo productivo de infección. Este ciclo termina en la producción de viriones que por transporte anterógrado son liberados en el sitio periférico del epitelio generando infecciones recurrentes (Efsthathiou y Preston, 2005; Roizman *et al.* 2007).

La infección latente se divide en 3 etapas principales

Establecimiento de la latencia:

El establecimiento de la latencia inicia con la entrada del genoma viral a la neurona, seguido de una etapa de infección aguda en el GT. En esta etapa de infección aguda, de aproximadamente una semana de duración, ocurre una extensa replicación y expresión de genes virales; en la cual se pueden detectar partículas virales infecciosas producidas en el GT (Kramer *et al.* 1998). Sin embargo se ha descrito que esta etapa de replicación de la fase aguda, no es requisito para el establecimiento de la latencia. Ya que algunas cepas de virus HSV-1 que no se replican, pueden establecer infecciones latentes (Coen *et al.* 1989). Posteriormente, esta expresión de genes virales del ciclo lítico se apaga y se inicia la transcripción de LAT. Lo que indica el establecimiento de la infección latente (Efsthathiou y Preston, 2005; Perng y Jones, 2010).

Es requisito para el establecimiento de infecciones latentes, la inhibición de la expresión de genes virales α , que se cree ocurre en neuronas por falta de factores celulares para inducir su expresión. O por otro lado, esta inhibición se puede dar por factores de transcripción presentes en las neuronas sensoriales que funcionan como represores de la expresión de genes α . Este es el caso del factor HCF (Host Cell

Factor) el cual interactúa con el trans-activador viral VP16 para iniciar la expresión de genes α (Perng y Jones, 2010). Se ha descrito que en células no neuronales permisivas a la infección por HSV-1, HCF está localizado en el núcleo (Kristie *et al.* 1995), pero en neuronas se localiza en el citoplasma (Kristie *et al.* 1999), indicando que este factor HCF podría secuestrar el factor viral VP16 en el citoplasma, inhibiendo la expresión de genes virales α (Perng y Jones, 2010). Otros factores neuronales descritos que pueden contribuir a esta inhibición, son las proteínas Luman y Zhangfei que secuestran el factor de transcripción HCF en el citoplasma en neuronas sensoriales (Lu y Misra, 2000).

Mantenimiento de la latencia:

Es la etapa de la infección que dura por el resto de la vida del hospedero. Está definida como el periodo en el cual no se pueden detectar partículas virales infecciosas en el GT. En esta etapa, no ocurre expresión de los genes virales necesarios para que ocurra una infección lítica, en cambio se expresa en abundancia el transcrito LAT (Perng y Jones, 2010).

LAT, es una serie de transcritos co-lineares, que se localizan predominantemente en el núcleo de las neuronas sensoriales y son codificados por el gen LAT, ubicado dentro del genoma viral en las repeticiones invertidas que flanquean la región U_L. El transcrito LAT presente en menor cantidad dentro de las neuronas, es denominado LAT menor y posee un tamaño de 8.3 Kilo pares de bases (Kpb). De él se derivan por splicing, los LAT más abundantes o mayores, de 2 kpb y 1.5 Kpb que son RNAs muy estables (Perng y Jones, 2010).

El papel preciso de LAT en el establecimiento de la latencia es controvertido, porque se ha demostrado que LAT es importante, pero no indispensable para este proceso. Ya que algunas cepas virales con deleciones en este gen, mantienen la capacidad de establecer infecciones latentes; pero con una frecuencia de reactivación menor (Steiner *et al.* 1989). Esto podría indicar que la función principal de LAT es promover el establecimiento de infecciones latentes (Perng y Jones; 2010).

Uno de los roles que se le han asignado a LAT es el de suprimir la expresión de genes α , para permitir el establecimiento de infecciones latentes. Con respecto a esto, se ha descrito que el transcrito LAT menor de 2 Kpb codificado antisentido al gen ICP0, disminuye los niveles de mRNA de ICP0 en líneas celulares neuronales, de forma directa y no por un efecto de LAT sobre el promotor de ICP0 (Mador *et al.* 1998),

sugiriendo que este transcrito puede funcionar como un mecanismo antisentido de represión de la expresión de genes virales α .

Otro mecanismo por medio del cual LAT suprime la expresión de genes virales α es su función como precursor de micro-RNAs en neuronas infectadas latentemente con HSV-1 (Umbach *et al.* 2008). Los micro-RNAs son RNAs endógenos de 23 nucleótidos que regulan pos-transcripcionalmente la expresión de genes, por complementariedad con mRNAs, que codifican proteínas (Bartel, 2009). Los miRNAs codificados por LAT, han sido implicados en la disminución de los niveles de las proteínas ICP0 e ICP4. Lo cual podría facilitar el establecimiento y mantenimiento de la latencia; al disminuir post-transcripcionalmente los niveles de estas proteínas (Umbach *et al.* 2008). Adicional a este mecanismo, también se ha descrito que el LAT de 1.5Kpb codifica 2 RNAs Pequeños (small-RNAs: s-RNA1 y s-RNA2) que inhiben la apoptosis en células de neuroblastoma y han sido detectados en el GT de ratones con infección latente. El LAT s-RNA1 inhibe la infección productiva 1000 veces y s-RNA2 inhibe la expresión de la proteína viral ICP4 e inhibe la infección productiva 5 veces, indicando que estos RNAs pequeños codificados por LAT, también pueden tener un papel en el ciclo de latencia-reactivación, inhibiendo la apoptosis y la infección productiva (Shen *et al.* 2009).

Se ha descrito también, que LAT reprime la expresión de genes virales durante la infección aguda en el GT de ratones infectados con HSV-1, indicando un papel facilitador en el establecimiento de la latencia (Chen *et al.* 1997; Garber *et al.* 1997). Adicionalmente LAT posee propiedades antiapoptóticas, ya que su expresión impide la apoptosis de las neuronas *in vivo* e *in vitro*. Promoviendo la supervivencia de las neuronas tras la infección aguda, e inhibiendo la activación de las caspasas 8, 9 y 3 (Perng *et al.* 2000; Inman *et al.* 2001; Ahmed *et al.* 2002; Jin *et al.* 2003; Henderson *et al.* 2002; Carpenter *et al.* 2007). Por esto se cree que es el único gen con actividad antiapoptótica, que se expresa durante la infección latente (Perng y Jones; 2010).

También se ha descrito que LAT interfiere y retrasa la expresión y producción de IFN- α e IFN- β *in vitro* en células de neuroblastoma infectadas con HSV-1, e *in vivo* en el GT de ratones con infección aguda (Perng *et al.* 2005). Así, los autores plantean que esta interferencia de LAT en la expresión de IFN puede disminuir la probabilidad de que el sistema inmune elimine las neuronas infectadas, promoviendo su supervivencia, inhibiendo la apoptosis y permitiendo que las funciones neuronales continúen tras la

infección. De esta manera, la inhibición de la expresión de IFN podría incrementar la supervivencia de las neuronas a largo plazo durante los ciclos de latencia y reactivación (Peng *et al.* 2005).

También, frente al mantenimiento de la latencia, se ha evidenciado un papel importante del IFN- γ y de los linfocitos CD8+. Se ha descrito que el IFN- γ inhibe la expresión de ICP0 durante la infección lítica de células no-neuronales, e inhibe la reactivación en células neuronales por el bloqueo de la expresión de ICP0 *ex vivo* (Decman *et al.* 2005). Además durante la latencia, el sistema inmune, en especial los linfocitos T CD8+ y el IFN- γ controlan la infección, mantienen la latencia y limitan la propagación del virus en las uniones sinápticas (Roizman *et al.* 2007; Arduino y Porter, 2008). Apoyando esta afirmación, se ha descrito que en modelos de infección en ratones, la aparición de células T CD8+ en el GT coincide con la eliminación completa del virus en replicación y continúa hasta el establecimiento de la infección latente. Favoreciendo el establecimiento de un infiltrado de células T CD8+ de memoria en el GT (Khanna *et al.* 2003; Divito *et al.* 2006).

Reactivación:

Se inicia cuando estímulos externos, como estrés, inmunosupresión, trauma local, hipotermia y luz ultravioleta, entre otros, inducen una serie de señales que conducen a la reactivación del virus latente en el GT (Arduino y Porter, 2008; Peng y Jones, 2010). En general, estímulos de algún tipo sobre las neuronas con infección latente, son un detonante para la reactivación del virus. Pero la naturaleza de la transducción de señales producida por estos estímulos es desconocida. Tampoco el mecanismo de reactivación del virus se ha establecido completamente. Pero se ha descrito que estos estímulos causan la expresión de genes virales del ciclo lítico α , β , y γ ; la replicación del genoma viral y la expresión de proteínas virales en cantidad suficiente para producir una progenie viral (Halford, *et al.* 1996; Nichol *et al.* 1996; Tal-Singer *et al.* 1997, Roizman *et al.* 2007). Así, los nuevos viriones producidos en las neuronas son llevados por transporte axonal anterógrado hacia la terminación nerviosa, donde son liberados en el interior del epitelio Iniciando de esta forma un nuevo ciclo de infección lítica causando infecciones recurrentes (Arduino y Porter, 2008; Peng y Jones, 2010).

Se ha descrito que la expresión de ICP0 cumple un papel importante en la reactivación, debido a que virus mutantes para ICP0 a MOIs bajos tienen tendencia a

establecer infecciones latentes y tienen una capacidad baja de reactivación (Sacks y Schaffer, 1987; Halford y Schaffer, 2001; Leib *et al.* 1989). Adicionalmente se ha observado que ocurre una disminución en la acetilación en el promotor de LAT junto con una disminución en la cantidad de mRNA para LAT, al mismo tiempo que se incrementa la acetilación en el promotor de ICP0 incrementando su transcripción (Amelio *et al.* 2006). Lo que indica que la disminución de la expresión de LAT coincide con el inicio de la transcripción de ICP0 y con la reactivación del virus.

Los mecanismos detrás de la reactivación viral aún permanecen sin dilucidar por completo; sin embargo se ha visto que los estímulos mencionados anteriormente, pueden generar altos niveles de corticosteroides que tienen un efecto sobre la actividad neuronal. Se ha descrito que corticosteroides sintéticos inducen la expresión de genes virales y estimulan el origen de replicación del HSV en neuronas (Halford *et al.* 1996). Por otro lado, estudios con virus mutantes para VP16 (que es el activador de la expresión de genes α), han revelado que en condiciones de estrés celular, la transcripción de genes virales está restringida solo a ICP0 e ICP4 (Yang *et al.* 2002). Sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre esta transcripción se desconoce, pero es indicio de que la co-activación de estos 2 genes virales puede cumplir un papel importante en el inicio de la reactivación (Efthathiou y Preston, 2005).

2. EL GANGLIO TRIGEMINAL

Es el sitio más común de establecimiento de la latencia del HSV-1 (Arduino y Porter, 2008). Es un ganglio sensorial, que contiene los cuerpos celulares de neuronas aferentes que transmiten la información sensorial, desde la periferia hacia el sistema nervioso central. Se ubica a lado y lado de la cabeza entre los ojos y el oído (Baker y Bronner-Fraser, 2001).

El ganglio trigeminal da origen al nervio trigeminal que se divide en tres ramas: la rama oftálmica, que transmite la información sensorial de la frente, el globo ocular, y la piel de la nariz. La rama maxilar, que inerva el maxilar superior, los dientes. Y la rama mandibular que inerva el maxilar inferior incluyendo los dientes inferiores y la sensibilidad de la lengua (Baker y Bronner-Fraser, 2001).

Las neuronas sensoriales trigeminales extienden axones periféricos para detectar estímulos mecánicos, químicos y térmicos, así como el tacto, el dolor, y la propiocepción. Los axones centrales se dirigen hacia el tallo cerebral para comunicar estos impulsos hacia el sistema nervioso central (Baker y Bronner-Fraser, 2001).

3. EL INTERFERÓN- β

Los interferones (IFN) son un componente clave en la primera línea de defensa frente a las infecciones virales. Se han descrito tres clases de Interferones: el IFN tipo I (IFN- α e IFN- β), el tipo II ó IFN- γ y el tipo III o IFN- λ (Sadler y Williams, 2008). Estas moléculas presentan actividad autocrina y paracrina. Afectan varios procesos incluyendo la regulación del crecimiento celular, la diferenciación, apoptosis y además modulan la respuesta inmune (Samuel, 2001; Sadler y Williams, 2008; Katze *et al.* 2002).

El IFN- β posee actividad antiviral, antitumoral y antiproliferativa; y es producido como respuesta inicial frente a infecciones virales. Siendo rápidamente secretado por células somáticas infectadas, como fibroblastos, células dendríticas entre otras (Samuel, 2001). Funciona como un homodímero, que al unirse a su receptor induce la expresión de moléculas efectoras antivirales que limitan la replicación y diseminación de los virus. Su producción es necesaria para inducir la amplificación del estado antiviral hacia las células vecinas (Samuel, 2001; Haller *et al.* 2006).

Los interferones tienen un papel importante en el control de las infecciones por HSV-1. Esto se evidencia en ratones knock-out para el receptor de IFN-I, los cuales son altamente susceptibles a la infección por HSV-1. Además en la infección latente ya establecida, se ha visto que los linfocitos CD8+ localizados en el ganglio trigeminal junto a neuronas infectadas, secretan IFN- γ lo cual que evita la reactivación del HSV-1 (Khanna *et al.* 2004). Adicionalmente se ha descrito que *in vivo* en ratones durante la infección aguda por HSV-1 ocurre la expresión de IFN- α y - β en el GT (Peng, *et al.* 2005).

4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL IFN- β

La vía de señalización y la activación transcripcional inducida por el IFN tipo I está mediada por proteínas de la vía Jak/Stat (Samuel, 2001). La vía de señalización inicia cuando el IFN- β se une a su receptor IFNAR, lo que induce cambios conformacionales en la porción citoplasmática del receptor, que conduce a que las kinasas Jak-1 y Tyk-2 se aproximen permitiendo su activación por transfosforilación (Kisseleva *et al.* 2002). En este proceso, Tyk-2 interactúa con la subunidad IFNAR-1 del receptor y Jak-1 interactúa con la subunidad IFNAR-2 (Samuel, 2001). Para el caso de Jak-1 la fosforilación ocurre en los aminoácidos Tyr1038 y Tyr1039 (Kisseleva *et al.* 2002).

Estas proteínas Jak-1 y Tyk-2 fosforiladas y activadas, catalizan la fosforilación de residuos específicos de tirosinas en el receptor, que sirven como sitios de anclaje para la molécula Stat (del inglés, *Signal Transducers and Activators of Transcription*). Una vez reclutados en el receptor, Stat-1 y -2 son fosforilados por Jak-1 y Tyk-2, en residuos de tirosina específicos, que para Stat-1 es la tirosina 701 (Kisseleva *et al.* 2002). Los Stat-1 y -2 fosforilados forman un dímero, que unido al IRF-9 (del inglés *IFN Regulator Factor 9*) se transloca al núcleo y constituye un complejo conocido como ISGF-3. El cual al unirse a los promotores ISRE (del inglés *Interferon-Stimulated Response Elements*) inicia la transcripción de genes estimulados por IFN ó ISGs (del inglés, *Interferon Stimulated Genes*) (Bonjardim, 2009; Platania, 2005).

Se han descrito otras vías alternativas de señalización activadas por IFN, que pueden ser activadas independientemente o en paralelo a la vía Jak-Stat, como la vía de MAP Kinasa y de Fosfatidil Inositol-3 Kinasa. La vía de MAP Kinasa ayuda a regular la expresión de genes dependiente de Stat-1, y la activación de la vía Fosfatidil Inositol-3 Kinasa mediada por IFN-I puede conducir a la fosforilación de Stat-1 para iniciar la transcripción de genes. Esta variedad de señales confiere especificidad y al mismo tiempo permite que se dé una respuesta más robusta y coordinada de las diferentes acciones del IFN (Samuel, 2001; Bojardim *et al.* 2009).

5. REGULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN JAK/STAT

Debido a que esta vía de señalización está implicada en muchos procesos, como defensa inmune, diferenciación, proliferación y oncogénesis, existen varias formas de regulación de la misma. La regulación negativa de esta vía de señalización se puede dar por varios mecanismos diferentes: por endocitosis del receptor, por inactivación de Jak o Stat a través de fosfatasas SHP-1 y -2, o por Proteínas inhibidoras de Stat activados (PIAS). Adicionalmente puede ocurrir inactivación y degradación de las proteínas de señalización, a través de la interacción con supresores de la señalización de citoquinas (Kisseleva *et al.* 2002).

5.1. Supresor de Señalización de Citoquinas-3

Las proteínas SOCS (del inglés, *Suppressors of Cytokine Signaling*) son una familia de proteínas que se expresan tras el estímulo con citoquinas. Su transcripción es activada por Stat; y regulan negativamente la transducción de señales inducida por las citoquinas. Dentro de esta familia se encuentran 8 proteínas, Socs-1 a Socs-7 y CIS (Yoshimura *et al.* 2007). Los miembros de esta familia poseen un dominio amino-terminal variable, un dominio central SH2 y un dominio carboxi-terminal de 40 aminoácidos conocido como caja Socs. Esta caja funciona como ligasa de ubiquitina que media la degradación de las proteínas asociadas a Socs a través de su extremo amino-terminal (Yoshimura *et al.* 2007).

El mecanismo de acción de Socs-3 radica en que posee la capacidad de interactuar tanto con el receptor de citoquinas, como con las kinasas Jak asociadas a éste. Inicialmente SOCS-3 se asocia con el dominio citoplasmático del receptor de citoquinas a través de su dominio SH2, posteriormente a través de su Region Inhibidora Kinasa (KIR) inhibe la actividad enzimática de Jak y puede inducir su degradación por proteosoma (Yoshimura *et al.* 2007; Crocker *et al.* 2008).

Sólo las proteínas Socs-1 y Socs-3 han sido implicadas en la regulación negativa de la transducción de señales de IFN (Song *et al.* 1998). Sin embargo, Socs-3 también inhibe la señalización de otras moléculas como Interleucina -1, -2, -3, -4, -6, hormona de crecimiento, prolactina, insulina, entre otras (Alexander, 2002).

6. GENES INDUCIDOS POR INTERFERÓN (ISGs) Y SU ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Muchos de los productos génicos inducidos por IFN son moléculas que detectan productos virales, modulan vías de señalización, actúan como factores de transcripción que incrementan la producción de IFN ó son proteínas con actividad antiviral directa. Entre las proteínas con actividad antiviral están: oligoadenilato sintetasa, ribonucleasa latente y proteína kinasa dependiente de RNA de doble cadena, entre otras (Platanias, 2005).

6.1. Proteína Kinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR):

Esta proteína se activa por la presencia de RNAs de doble cadena, que inducen su autofosforilación y dimerización. Cataliza la fosforilación de la subunidad alfa del factor de iniciación 2 de la síntesis de proteínas (eIF-2 α), lo que conduce a la inhibición de la

traducción, por inhibición del intercambio de GDP por GTP en los ribosomas, deteniendo la traducción de los mRNAs celulares y virales. También está involucrada en el control de la proliferación celular y la apoptosis (Samuel, 2001; Sadler y Williams, 2008).

6.2. 2'-5'- Oligoadenilato Sintetasa y RNasa L:

2'-5'- Oligoadenilato Sintetasa (OAS) cataliza la síntesis de oligómeros de adenosina, a partir de ATP, unidos por enlaces 2'-5' fosfodiéster. (Samuel, 2001; Sadler y Williams, 2008). Estos oligómeros de adenosina con enlace 2'-5' activan la RNasa L permitiendo la formación de homodímeros que poseen actividad endoribonucleasa. La cual cataliza la degradación de RNAs tanto celulares como virales, incluyendo RNAs ribosomales celulares (Samuel, 2001).

7. MECANISMOS DEL HSV-1 PARA EVADIR LA RESPUESTA A IFN

Debido a que la respuesta inmune innata promueve la eliminación del virus, es importante para el HSV-1 tener mecanismos que contrarresten estas vías, para infectar de forma productiva las células y establecer finalmente infecciones latentes en las neuronas sensoriales (Johnson *et al.* 2008).

Dentro de estos mecanismos se ha descrito que la proteína viral $\gamma_134.5$ inhibe la acción del IFN por medio de la activación de la proteína celular fosfatasa 1 que desfosforila el factor traduccional eIF2 α . De esta forma se reversa el bloqueo de la traducción producido por PKR (Chou *et al.* 1995; He *et al.* 1997).

Por otro lado, la proteína viral ICP0 evita la acumulación nuclear del factor de transcripción IRF-3, impidiendo la producción de IFN- β (Melroe *et al.* 2004, 2007). También las proteínas virales del tegumento *virion host shut-off* (vhs) y UL13, han sido implicadas en la disminución de la sensibilidad frente a IFN- α (Chee y Roizman, 2004, Yokota *et al.* 2005).

Adicionalmente, otros estudios sugieren que la infección por HSV-1 causa una disminución de la fosforilación de Stat y de Jak (Yokota *et al.* 2001; Chee y Roizman, 2004). Al respecto, se ha demostrado que la proteína del virus ICP27 es responsable de esa disminución en la fosforilación de Stat-1 y de un bloqueo parcial en la translocación al núcleo de Stat-1 (Johnson *et al.* 2008; Johnson *et al.* 2010). También

se ha descrito que la disminución de la sensibilidad al IFN- α tras la infección por HSV-1, es mediada por la inducción temprana de la expresión de Socs-3, lo cual contribuye a que la replicación del virus sea más eficiente (Yokota et al. 2004 y Yokota et al. 2005).

Estas múltiples estrategias de evasión del HSV-1 se han descrito en diferentes tipos y líneas celulares, pero no se conoce su posible ocurrencia en células del ganglio trigeminal. Adicionalmente, no se conoce completamente el rol de la respuesta mediada por IFN- β frente al HSV-1 en esta etapa de infección en ganglio trigeminal. Por lo anterior nos proponemos indagar acerca del papel de IFN- β en la infección por HSV-1, cómo se regula la expresión de Oas-1a, Pkr, Rnasa L y Socs-3 en cultivos primarios de ganglio trigeminal murino infectados con HSV-1 y si existe algún posible mecanismo de modulación de la respuesta a IFN mediado por la infección por HSV-1.

Por lo tanto el presente trabajo, pretende ampliar el conocimiento de la infección viral en el ganglio trigeminal y los posibles mecanismos que el HSV-1 implementa frente a la actividad del IFN- β durante la infección desarrollada en cultivos de ganglios trigeminales. Con este conocimiento, se busca ayudar a esclarecer posibles mecanismos virales que modulan la respuesta inmune innata y que podrían estar contribuyendo al establecimiento de infecciones latentes así como contribuir al conocimiento de los mecanismos detrás de esta etapa de infección.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta antiviral del IFN- β frente a HSV-1 en cultivos de ganglio trigeminal murino, en términos de activación de componentes de la vía de señalización JAK-STAT y de expresión de genes inducidos por IFN.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Cuantificar los cambios en la producción de HSV-1 tras el tratamiento con IFN- β en cultivos primarios de GT.
2. Cuantificar la expresión de genes estimulados por Interferon (ISG): Oas1a, Pkr y Rnasa L en cultivos infectados con HSV-1 y tratados con IFN- β .
3. Cuantificar la expresión de Socs-3 y la expresión de genes virales, en cultivos de ganglio trigeminal pre-tratados con IFN- β e infectados con HSV-1.
4. Evaluar la fosforilación de Jak-1 y Stat-1 en cultivos de GT murino tratados y no tratados con IFN- β , infectados y no infectados con HSV-1

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos primarios de ganglio trigeminal murino

Los cultivos primarios se obtuvieron a partir de ratones hembras ICR de 4 semanas de edad, sacrificadas por dislocación cervical. Según el protocolo adaptado por Castellanos y Hurtado (1999), se realizó la extracción de los GT en medio DMEM (*Dubelco's Modified Eagle Medium*) suplementado con suero fetal bovino inactivado (SFB) al 10% y penicilina 100 UI/estreptomicina 100 µg/ml de ahora en adelante denominado medio completo. Se realizó disociación enzimática de los ganglios, en medio completo con colagenasa (2 mg/ml) y dispasa (5 mg/ml) durante 1 hora a 37°C, y con disociación mecánica con pipeta Pasteur cada media hora, hasta lograr una suspensión celular homogénea. Las células se resuspendieron en medio completo y se sembraron en cajas de 24 y 12 pozos, en gota de 50 µl o 100ul (respectivamente). Las cajas fueron pre-tratadas con poli-L-lisina (10 µg/ml). Para permitir la adhesión celular, se incubaron 1 hora a 37°C y a continuación se completó el volumen con 450 µl para cajas de 24 pozos (o 900ul para cajas de 12 pozos) de medio completo suplementado con hidrocloreto de citosina β-D-arabinofuranósido (AraC) a 10 µM (Sigma C6645). El cultivo se mantuvo durante 96h cambiando el medio suplementado con AraC cada 24h. Finalmente, se incubaron por 24h adicionales con medio completo sin AraC.

2. Tratamiento con IFN-β e Infección con HSV-1

Los cultivos fueron tratados con IFN-β recombinante murino (PBL 12400-1) diluido en medio de cultivo DMEM con SFB 10%. El tratamiento con IFN-β se realizó por diferentes tiempos, de acuerdo al objetivo del experimento: 6h de pre-tratamiento para los experimentos de viabilidad celular, plaqu coastos, inmunocitoquímica y PCR en tiempo real. Tratamiento post-infección durante 15 min para Western blot. Al cabo de estos tiempos, se retiró y lavó el IFN-β del cultivo.

La infección se realizó con virus HSV-1, obtenido a partir de un aislado clínico que fué cosechado y titulado en células Vero y posee un título de 1×10^7 UFP/ml. El virus se inoculó en medio completo con SFB 5% a MOI: 1, teniendo en cuenta un total de 11.000 células totales por cada GT, incluyendo células neuronales y no neuronales. Este estimado se obtuvo del conteo de células neuronales y no neuronales de un cultivo de 7 GT con AraC descrito en el numeral 5.

Al momento de la infección, las células se incubaron con el inóculo viral durante 1h a 37°C, posteriormente el inóculo se retiró y fue reemplazado con medio completo con SFB 10%. Finalmente las células se incubaron a 37°C durante diferentes tiempos.

3. Ensayo de viabilidad celular y determinación de la dosis de IFN-β

Para determinar la dosis de IFN-β que presenta el mayor efecto antiviral frente a HSV-1, se realizó un ensayo de viabilidad en cultivos de GT murino, sembrando las células de un GT por cada pozo en cajas de 24 pozos. Tras 96h de cultivo con AraC y 18h con medio completo sin AraC, el cultivo fue tratado 6h con medio completo ó con 1, 100 ó 1000 U/ml de IFN-β.

Pasado este tiempo, las células se incubaron con el inóculo viral a un MOI de 1 o con Mock (lisado de células vero) por 1h, tras lo cual se retiró el virus y se incubaron con medio completo por 28h adicionales. Posteriormente se retiraron los sobrenadantes y se almacenaron a -80°C hasta su titulación. Las células fueron incubadas con 300 μl/pozo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (Sigma M2128) a una concentración de 0,5 mg/ml en DMEM por 2h. Se descartaron los sobrenadantes y se adicionó dimetil sulfóxido con agitación horizontal por 15 minutos para disolver los cristales de formazán. Se colectaron 100 μl de cada pozo en caja de 96 pozos, y se cuantificó la absorbancia a 570 nm con un filtro diferencial de 630 nm. Se calculó el porcentaje de viabilidad teniendo en cuenta el promedio de la absorbancia de los pozos inoculados con mock y sin tratamiento, como equivalente al 100% de viabilidad.

4. Títulos Virales y Ensayo de Plaqueo

Para cuantificar los cambios en la producción de HSV-1, se colectaron sobrenadantes de los cultivos sometidos a ensayos de viabilidad y se titularon por ensayo de plaqueo en células Vero, para determinar el efecto del tratamiento con IFN-β sobre la producción de partículas virales.

Siguiendo el protocolo del ensayo de plaqueo desarrollado por Marín *et al.* (2007), se sembraron 100.000 células Vero por pozo en caja de 24 pozos con medio completo con SFB 1%. Se dejaron 1h en adhesión. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas (10^{-2} a 10^{-4}) de los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de ganglio sometidos a los ensayos de viabilidad en medio completo con SFB 1%, y se infectaron

pozos por triplicado con 50 μ l de cada dilución viral. Las células se incubaron por 4h a 37°C y a continuación se adicionaron 500 μ l de medio overlay (DMEM 2X 63%, SFB 6,2%, penicilina 100 UI/estreptomocina 100 μ g/ml, Anfotericina 2,5 μ g/ml, carboximetilcelulosa 3%, y Bicarbonato de sodio 7,5%). Tras 5 días de incubación se evidenció la formación de placas de lisis sobre la monocapa, por tinción de las células con cristal violeta por 20 minutos. El título viral se obtuvo por conteo del número de placas de lisis sobre la monocapa teniendo en cuenta la dilución correspondiente del inóculo viral.

5. Ensayo de inmunoperoxidasa para Neurofilamento:

Para caracterizar el cultivo de acuerdo a su composición en número de células neuronales y no neuronales se realizaron cultivos primarios de GT en caja de 24 pozos sobre laminilla. Al cabo de 96h de cultivo con AraC y 24h con medio sin AraC, las células fueron fijadas con paraformaldehído (4%) por 30 minutos, y gelatina (0.5%) incubando a 0°C durante 10 min.

Para realizar la detección de las células neuronales por inmunoperoxidasa, los cultivos fijados se permeabilizaron con Triton X-100 (0,1%) por 30 min. Se inactivó la peroxidasa endógena, con peróxido de hidrógeno (0,5%) en metanol (50%) por 45 min. Posteriormente, se realizó un bloqueo con SFB (10%) por 30 min, seguido de la incubación con el anticuerpo primario anti-neurofilamento monoclonal (Sigma A-5316) dilución 1:2000 en SFB 5% y PBS por 1h a temperatura ambiente. Luego, se incubó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón biotinilado (Vector BA-9200) dilución 1:200 por 30 minutos a temperatura ambiente seguido de la incubación con estreptavidina-peroxidasa (Vector SA-5001) a 1 μ g/ml en PBS por 30 min a temperatura ambiente. El revelado se realizó con las soluciones en proporción 1:1: peróxido de hidrógeno 0,01% (Carlo Erba 7722-84-1) en agua destilada y diaminobenzidina 0,1% (MP Biomedicals 980681) en Tris-HCl (Sigma T-1278) pH 7.2. Posteriormente, se evidenciaron los núcleos celulares incubando las células con Haemalum de Mayer (1:1 en agua destilada) durante 2 min. Se deshidrataron las células con etanol al 70%, 80%, 90%, 95% y 100% por 5 min; y con Xilol por 7 min. Finalmente se realizó el montaje con entellán. A continuación, se realizaron conteos en el microscopio de 40 campos por laminilla, de 4 laminillas por condición para obtener el número de células neuronales y no neuronales presentes en el cultivo. El cálculo del número de células presentes en cada GT, se realizó teniendo en cuenta el número de células totales en los conteos, el área de cada campo y el área total ocupada por la gota de células.

6. Ensayo de inmunoperoxidasa para HSV-1:

Para conocer el porcentaje de infección existente en el cultivo tras 28h de infección con HSV-1 y si este porcentaje disminuyó tras el tratamiento con IFN- β , se realizó un cultivo primario con las células de un GT por cada 3 pozos. Tras 96h de cultivo con AraC y 18h con medio completo sin AraC, el cultivo fue tratado 6h con medio completo ó con 1000 U/ml de IFN- β . Pasado este tiempo, las células se incubaron con el HSV-1 o con Mock por 1h, tras lo cual se retiró el incóculo y se incubaron con medio completo. A las 28h post-infección se fijaron las células.

A continuación, se realizó inmunoperoxidasa para la detección de antígenos de HSV-1 siguiendo el proceso mencionado anteriormente para la detección de neurofilamento, pero empleando el anticuerpo primario anti-HSV-1 (Dako B0114) dilución 1:40 en SFB 5% y PBS incubando por 16h a 4°C, y el anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado (Vector BA-1000) dilución 1:200, en SFB 5% y PBS por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, para cuantificar el efecto del IFN- β sobre el número de células infectadas, se realizaron conteos de células neuronales y no neuronales infectadas, contando 40 campos por laminilla, 3 laminillas por condición, identificando las células positivas para antígeno viral tanto células neuronales como no neuronales. Se realizaron conteos de 2 experimentos independientes.

7. Extracción de RNA, Retro-transcripción y PCR cuantitativa

Para cuantificar la expresión de genes virales (ICP0, *Timidina Kinasa*-TK y *Glicoproteína B-gB*) y la expresión de genes celulares (*Socs-3*, *Pkr*, *Oas-1a* y *RNasa L*) se realizó extracción de RNA total, retro-transcripción y PCR en tiempo real.

Los cultivos se realizaron en cajas de 12 pozos, sembrando las células de 2 GT por cada pozo con el mismo protocolo de cultivo usado para el ensayo de viabilidad. Posteriormente, se realizó un pre-tratamiento por 6h con IFN- β 1000 U/ml, y después de retirarlo, los cultivos se infectaron con HSV-1 MOI: 1 durante 6h y 12h a 37°C. Finalmente se realizó la extracción de RNA total con el reactivo Trizol (Invitrogen 15596-018) según recomendaciones del fabricante. El RNA se resuspendió en 30 μ l de agua tratada con DEPC 0,1% (D-5758 Sigma) y se almacenó a -80°C hasta su uso. Se realizó la cuantificación del RNA por espectrofotometría a 260nm y su calidad se verificó por la relación de absorbancia obtenida a 260/280 nm (equipo Nanodrop ND1000 Thermo Scientific).

A 500 ng de RNA total de cada muestra se realizó tratamiento con DNasa I (Sigma AMP-D1) y luego retro-transcripción con Random Primers a una concentración de 0,025 µg/µl (Promega C118A) y con transcriptasa reversa M-MLV (Promega M170A) a 10 U/µl siguiendo el protocolo del fabricante.

A partir del cDNA obtenido, se cuantificó la expresión de los genes virales (ICP0, TK y gB) y genes celulares (*Pkr*, *Oas-1a*, *RNasa L* y *Socs-3*) que fueron normalizados con la cuantificación del gen β-Actina. La cuantificación se realizó por PCR en tiempo real con el kit DyNAmo™ HS SYBR® Green qPCR (Finnzymes F-410L) en el equipo Chromo4™ System (Bio-Rad).

Se realizó el siguiente programa de amplificación: Desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg y alineamiento ampificacion a 60°C por 1 min. Adicionalmente se realizó una curva de melting de 60°C a 100°C.

Para la cuantificación relativa de los genes virales, se empleó la formula de Pffafli (2001):

$$\text{Expresión Relativa} = \frac{E_{\text{gen viral en el infectado}}^{(\text{Ct gen viral Mock}-\text{Ct gen viral en el infectado})}}{E_{\text{actina en el infectado}}^{(\text{Ct actina en el Mock}-\text{Ct actina en el infectado})}}$$

Esta fórmula tiene en cuenta las eficiencias de amplificación del gen de interés, en las muestras de interés (pozos infectados), sin tener en cuenta la eficiencia de amplificación en los pozos control (pozos Mock). Esto se realizó así, debido a que en los pozos correspondientes a los controles o pozos infectados con Mock, no hay amplificación de genes virales y el dato obtenido de eficiencia y Ct corresponde a la señal background del sistema; por lo tanto se asumió un Ct de 40 para los pozos Mock.

Para la cuantificación relativa de los genes celulares *Pkr*, *Oas-1a*, *RNasa L* y *Socs-3* se empleó la fórmula diseñada por Schefe *et al.* (2006):

$$\text{Expresión Relativa} = \frac{E_{\text{actina en el infectado}}^{(\text{Ct actina en el infectado})}}{E_{\text{gen celular en el infectado}}^{(\text{Ct gen celular en el infectado})}} * \frac{E_{\text{actina en el control}}^{-(\text{Ct actina en el control})}}{E_{\text{gen celular en el control}}^{-(\text{Ct gen celular en el control})}}$$

Esta fórmula tiene en cuenta la eficiencia de amplificación de cada pozo de manera independiente, ya que para los genes celulares se obtuvo amplificación tanto en cultivos con mock como en cultivos infectados.

Se realizaron 2 experimentos independientes por duplicado.

Los primers empleados fueron:

Gen	Primer Sentido	Primer Antisentido	Tamaño del Producto	Referencia
<i>Oas-1a</i>	ATGTTAATACTTCCAGCAAGC	GCAAAGACAGTGAGCAACTCT	247 pb	Marin <i>et al.</i> 2007
<i>Pkr</i>	GGTTAGGGTGACCCACAGACA	TGTGACTTCCCACACAGGAG	165 pb	Marin <i>et al.</i> 2007
<i>Rnasa L</i>	GAGTCGGGAAGGCATAAACA	CCTCCTGGCTATCCAAACAA	151 pb	Marin <i>et al.</i> 2007
<i>Socs-3</i>	ACCTTTGACAAGCGGACTCT	GGAGCCTGGCACCAGTATAG	327 pb	Marin <i>et al.</i> 2007
β - <i>Actina</i>	ATCCTCTTCCCTCCCTGGAGA	TGCCTGGGTACATGGTGGTA	233 pb	Marin <i>et al.</i> 2007
<i>ICP0</i>	GACCCTCCAGCCGCATACGA	TTCGGTCTCCGCCTCAGAGT	158 pb	Lynas <i>et al.</i> 1989.
<i>TK</i>	AAACCACCACCACGCAAC	ACACCCGCCAGTAAGTCATC	87 pb	Al-Khatib <i>et al.</i> 2002
<i>gB</i>	CGTTTCGCAGGTGTGGTTC	ATGTCGGTCTCGTGGTTCG	189 pb	Al-Khatib <i>et al.</i> 2002

8. Obtención de Lisados celulares totales

Para determinar la fosforilación de Jak-1 y Stat-1 los cultivos de GT se incubaron con HSV-1 a MOI:1 o mock, por 12h y 18h. Al cabo de este tiempo se eliminaron los sobrenadantes y los cultivos se trataron con IFN- β 1000 U/ml o con medio por 15 minutos. Finalmente se obtuvo un lisado celular de cada condición, a partir de 5 pozos de cultivo de una misma condición obtenidos en 120 μ l de buffer Laemmli 1x (0,0625M Tris-HCl pH:6.8, 10% Glicerol, 2% SDS, 5% B-Mercaptoetanol, 0,001% Azul de Bromofenol) con inhibidores de fosfatasa (1mM Ortovanadato de sodio y 2mM Fluoruro de sodio) que fueron llevados a ebullición por 5 min y finalmente almacenados a -20°C hasta su uso.

Al mismo tiempo, para tener un valor aproximado de la cantidad de proteína obtenida, se obtuvieron lisados de pozos bajo las mismas condiciones de cultivo, con buffer RIPA (1% Nonidet P-40, 0,5% deoxicolato de sodio, 0,1%, SDS en PBS 1X) con inhibidores de proteasas y fosfatasa (PMSF 2 mM, aprotinina 5 μ g/ml, leupeptina 10 μ M, ortovanadato de sodio 1mM y fluoruro de sodio 1 mM). Los lisados obtenidos se clarificaron por centrifugación a 15000Xg por 20 min a 4°C y los sobrenadantes se almacenaron a -20°C y se cuantificaron posteriormente con el método de ácido bicinonínico.

9. SDS-PAGE y transferencia

Con los lisados celulares totales obtenidos en buffer laemmli, se realizó electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida: gel concentrador (acrilamida-bisacrilamida 4%, Tris-HCl 0,025M pH 8.8; SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,025% y TEMED 0,025%) y un gel separador (acrilamida-bisacrilamida 6,5%, Tris-HCl 0,025 M pH 8.8, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,025% y TEMED 0,025%) en buffer tris-glicina pH 8.3 (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1%). Estos lisados fueron separados durante 1h y 15 minutos a 100V en el equipo Mini protean II (Bio Rad).

Posteriormente se realizó transferencia a una membrana de PVDF activada por 15 segundos en metanol y equilibrada por 15 minutos junto con el gel de poliacrilamida en buffer de transferencia pH 8.3 (Tris 0,025 M, Glicina 0,192M, Metanol 20%). La transferencia se realizó en buffer de transferencia a 30V por 16h a 4°C en el equipo Transblot III (Bio Rad). La transferencia se confirmó incubando la membrana por 5 minutos con rojo Ponceau S (Rojo Ponceau S 0,1% en ácido acético 5%) tras 2 lavados con agua destilada.

10. Western blot

La membrana se incubó en la solución de bloqueo correspondiente para cada anticuerpo primario por 1h a temperatura ambiente. A continuación se incubó el anticuerpo primario correspondiente, en el buffer de bloqueo indicado a continuación:

β -actina (Sigma A-5316) dilución 1:2500 en buffer de bloqueo con albúmina sérica bovina 1% y Tween 20 0,1% en TBS 1X pH: 8.0, incubación por 1h a T° Ambiente. Los demás anticuerpos fueron incubados 16h a 4°C. **P-Stat-1** (Millipore 07-307) dilución 1:600 y **Jak-1** (R&D Systems MAB42601) dilución 1:500 en buffer de bloqueo con albumina sérica bovina 1%, leche descremada 1% y Tween 20 0,1%, en TBS 1X pH: 8.0. **P-Jak-1** (Millipore AB3850) dilución 1:100 en buffer de bloqueo con Leche descremada 0,2%, Tween 0,05% en TBS 1x pH:8.0. **Stat-1** (Millipore 05-987) dilución 1:50 en buffer de bloqueo con Albúmina 0,5%, Tween 20 0,1% en TBS 1X pH: 8.0. Seguidamente se incubó el anticuerpo secundario anti-ratón-biotinilado (Vector BA-9200) o anti-conejo-biotinilado (Vector BA-1000) a una dilución de 1:200 por 30 minutos a temperatura ambiente en el mismo buffer de bloqueo empleado para el anticuerpo primario. Luego, se incubó con estreptavidina-peroxidasa (Vector SA-5004) a 1 μ g/ml en TBS 1X pH:8.0 por 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizó el revelado por quimioluminiscencia con el sustrato Super Signal West Pico

Chemiluminescent (Thermo Scientific 34077) y con exposición sobre placas de autoradiografía (CL-XPosure Thermo Scientific 34090). Finalmente las placas reveladas fueron escaneadas y analizadas por densitometría con el Software Image J 1.44. Los datos de densitometría de cada proteína fueron normalizados con los datos de β -actina del carril correspondiente. Adicionalmente se determinó la intensidad de la banda de la proteína para cada condición, relativa a la intensidad de los cultivos inoculados con mock sin tratamiento y sin infección de cada tiempo cuya intensidad es igual a 1. Se realizaron 2 experimentos independientes.

11. Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados con el software SPSS V14.0. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, y de acuerdo a ésta, los datos que se comportaron normalmente fueron analizados por ANOVA y un test post-hoc de Dunnet. Por otro lado los datos que no distribuyeron normal fueron analizados por Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Se consideraron estadísticamente significativos los datos con un valor $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

1. Caracterización de Cultivos de GT Murino

Los cultivos primarios de ganglio trigeminal murino, fueron mantenidos por 96h con AraC y 24h adicionales con medio de cultivo sin AraC. Se encontró que al cabo de este tiempo el cultivo posee un porcentaje de neuronas de $14,7 \pm 2,8\%$ y un porcentaje de células no neuronales de $85,3 \pm 2,8\%$. Adicionalmente se calculó un total de 11.000 células/GT. De esta manera, se obtuvo un modelo *In Vitro* de cultivo primario de GT enriquecido en células neuronales (Figura 1A y 1B)

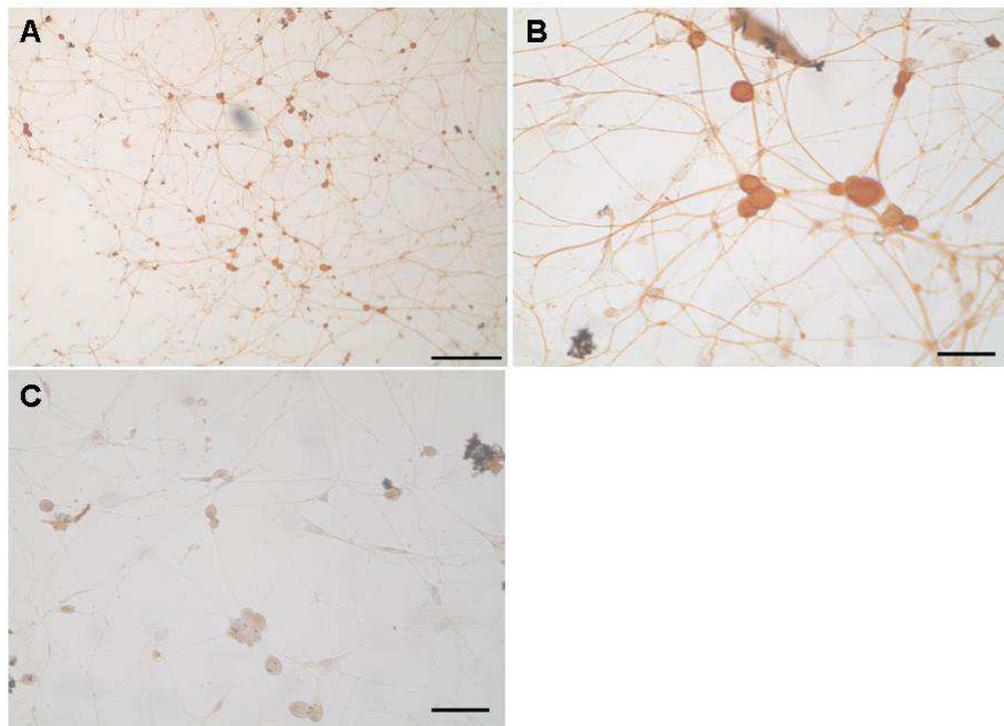


Figura 1. Fotografía de Inmunoperoxidasa para Neurofilamento en cultivos primarios de GT fijados después de 96h de AraC y 24h de cultivo sin AraC. **A.** Células positivas para Neurofilamento 10X. Barra corresponde a 200 μm . **B.** Células positivas para Neurofilamento 40X. **C.** Control sin anticuerpo primario. Barra corresponde a 40 μm .

2. El tratamiento con 1000 U/ml de IFN- β disminuye la producción de partículas virales y evita la muerte celular causada por la infección.

Para determinar la dosis de IFN- β recombinante que posee un efecto antiviral frente al HSV-1 se realizaron cultivos de GT que fueron pre-tratados con medio completo ó con IFN- β por 6h a concentraciones de 1, 100 y 1000 U/ml. Posteriormente se infectaron con HSV-1 a MOI: 1 por 28h, que fue el tiempo post-infección en el cual se observó efecto citopático. Este efecto se evidenció como la pérdida de forma y el redondeamiento de las células infectadas; en especial de las células no neuronales (Figura 2C). Al cabo de 28h de infección se recolectaron sobrenadantes para hacer ensayo de plaqueo y con la monocapa se realizaron pruebas de viabilidad por MTT.

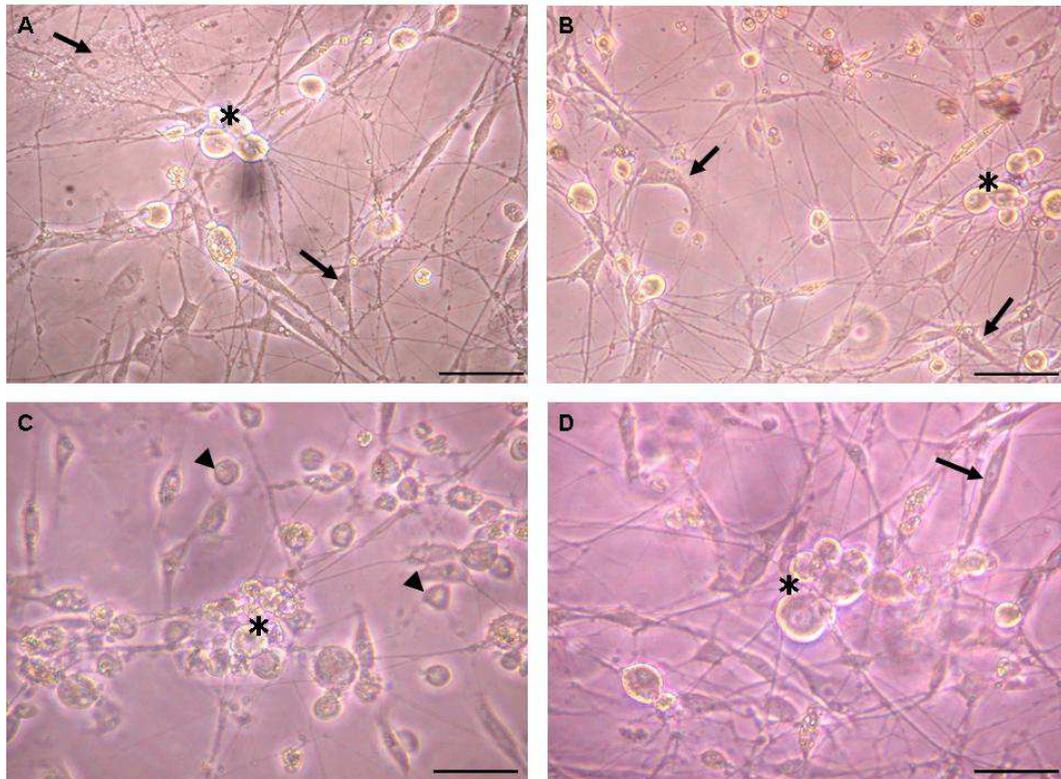


Figura 2. El tratamiento con IFN- β protege las células del efecto citopático causado por la infección con HSV-1 por 28h. Fotografías de microscopía de contraste de fase de cultivos de GT tratados con 1000 U/ml de IFN- β por 6h e infectados con HSV-1 MOI:1 por 28h. **A.** Cultivo de ganglio trigeminal murino sin tratamiento e inoculados con el mock. **B.** Cultivo de GT murino tratado con 1000 U/ml de IFN- β por 6h e inoculados con el mock. Barra representa 100 μ m **C.** Cultivo de GT murino sin tratamiento e infectado con HSV-1 MOI 1 por 28h. **D.** Cultivo de GT murino pre-tratado con 1000 U/ml de IFN- β por 6h e infectado con HSV-1 MOI 1 por 28h. Barra representa 80 μ m. Células neuronales (*), células no neuronales (flecha), células no neuronales con efecto citopático (cabeza de flecha).

Los resultados permiten evidenciar que las diferentes concentraciones de IFN- β usadas no afectan significativamente la viabilidad celular. (Figura 2B, Figura 3A). En los cultivos infectados se observó un efecto dosis respuesta frente al tratamiento con IFN- β . Encontrando que la infección con HSV-1 disminuye significativamente la supervivencia celular a un 45,4% evidenciado también morfológicamente por el efecto citopático tras 28h de infección (Figura 2C). El resultado fue similar para el tratamiento con 1 U/ml de IFN- β , que incrementó ligeramente la supervivencia a 48,3% (Figura 3A). Sin embargo, los tratamientos con 100 y 1000 U/ml incrementaron significativamente la viabilidad a 76,1% y 107% respectivamente, en comparación con el cultivo infectado (Figura 3A).

En cuanto a los títulos virales, los resultados fueron consistentes con los de viabilidad celular. El tratamiento con IFN- β disminuyó los títulos virales de forma proporcional a la concentración de IFN- β empleada (Figura 3B). Los títulos virales obtenidos sin tratamiento fueron de $6,89 \times 10^4$ UFP/ml (que corresponde al 100% de la producción viral), mientras que con 100 y 1000 U/ml de IFN- β , la producción viral disminuyó significativamente a $9,1 \times 10^3$ UFP/ml (16,5%) y $6,2 \times 10^3$ UFP/ml (10,3%), respectivamente (Figura 3B).

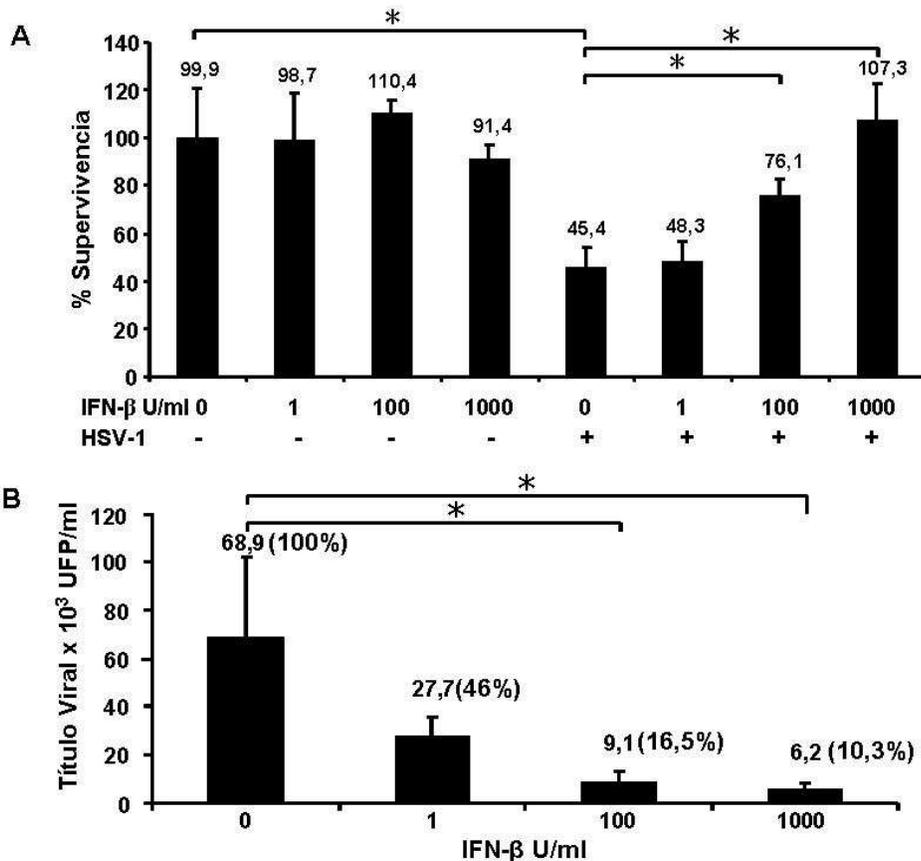


Figura 3. El IFN- β disminuye la muerte celular causada por la infección por HSV-1 y disminuye la producción viral en cultivos de GT murino. **A.** Porcentaje de supervivencia de cultivos de GT inoculados con Mock, e infectados con HSV-1 por 28h; tratados y no tratados con 1, 100 y 1000 U/ml de IFN- β . Los porcentajes de supervivencia fueron calculados con base en el promedio de las absorbancias de los pozos control (inoculados con Mock y sin tratamiento) que corresponde al 100% de supervivencia. Las barras representan la media \pm la desviación estándar de 2 experimentos independientes por duplicado. * Representa un valor $p < 0,05$ en la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. **B.** Títulos virales de sobrenadantes de cultivos de GT tratados con 0, 1, 100 y 1000U/ml de IFN- β por 6h e infectados con HSV-1 por 28h. Los sobrenadantes fueron titulados por ensayo de plaqueo en células Vero. Las barras representan la media \pm la desviación estándar de 2 experimentos independientes. Los números sobre las barras corresponden al título viral multiplicado por 10^3 Unidades Formadoras de Placa/ml. Los números en paréntesis representan los porcentajes de producción viral, teniendo en cuenta la producción viral de los cultivos infectados sin tratamiento como el 100%. El * Representa un valor $p < 0,05$ de prueba ANOVA Post-Hoc de Dunnet tomando como control la condición sin tratamiento.

Por lo tanto la concentración de IFN- β que presentó un mayor efecto antiviral fue la concentración de 1000 U/ml, ya que disminuyó la producción de partículas virales a 10,3% e incrementó la viabilidad celular a 106%. Por lo tanto, se determinó ésta concentración como la adecuada para tratar los cultivos en los demás experimentos. En conjunto, estos resultados demuestran que el pre-tratamiento con IFN- β tiene un efecto antiviral frente al HSV-1 que protege las células del efecto citopático causado por la infección, y al mismo tiempo disminuye la replicación viral; evidenciada en una menor producción de partículas virales.

3. El tratamiento con IFN- β protege las células de GT de la infección por HSV-1

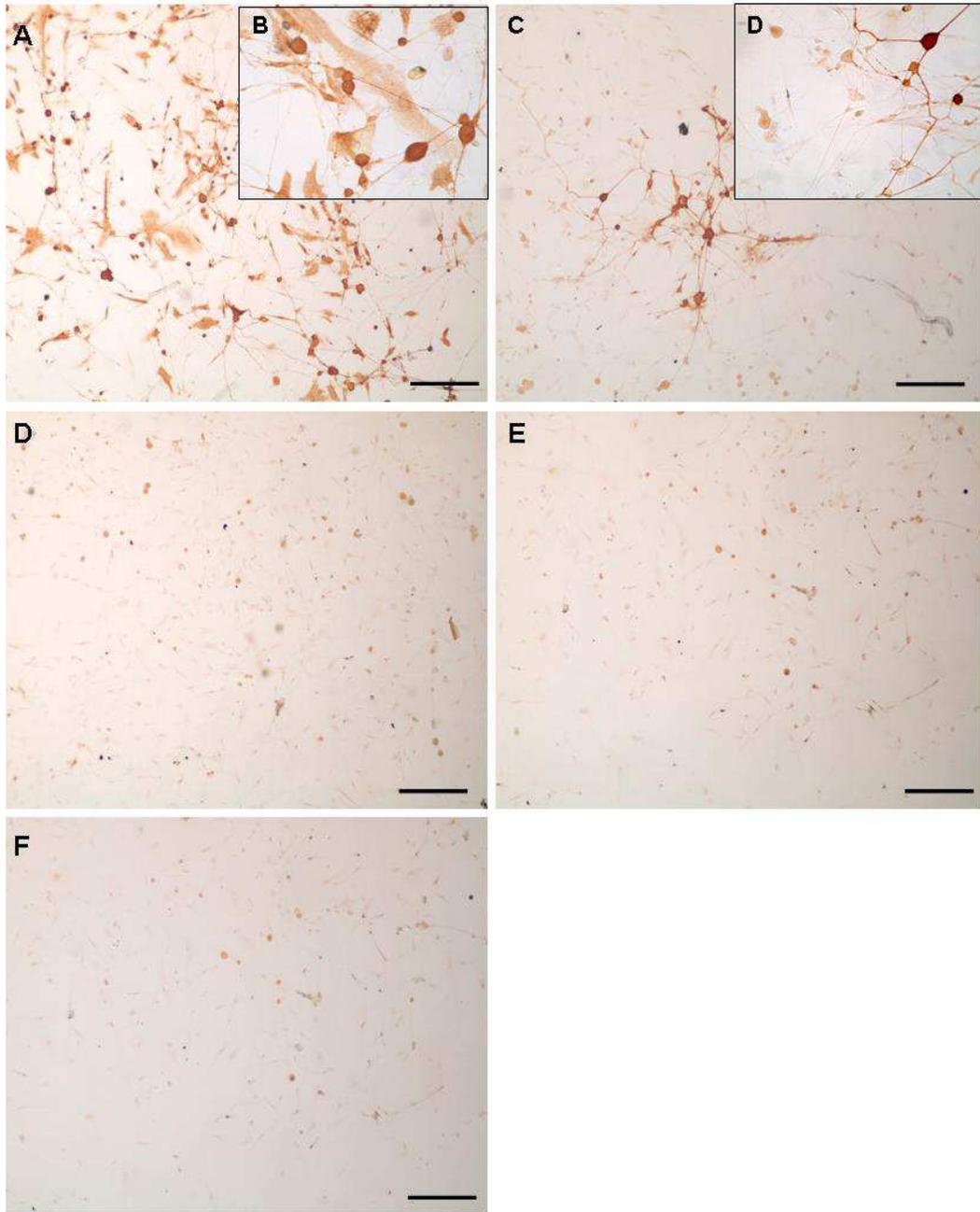


Figura 4. El IFN- β evita la diseminación de la infección en la monocapa disminuyendo el número de células de GT infectadas. Fotografía de microscopía de luz transmitida de inmunocitoquímica para la detección de antígenos virales por medio de un ensayo de inmunoperoxidasa para HSV-1 en cultivos de GT murino, pre-tratados con 1000 U/ml de IFN- β por 6h e infectados con HSV-1 MOI 1 por 28h. **A.** Cultivos infectados con HSV-1 MOI 1 por 28h. 4X **B.** 40X. **C.** Cultivos tratados con IFN 1000 U/ml por 6h e infectados con HSV-1 28h 4X. **C.** 40X **D.** Cultivos de GT inoculados con mock 4X. **E.** Cultivos de GT inoculados con mock, tratados con IFN- β . 4X **F.** Control sin anticuerpo primario. La barra corresponde a 200 μ m.

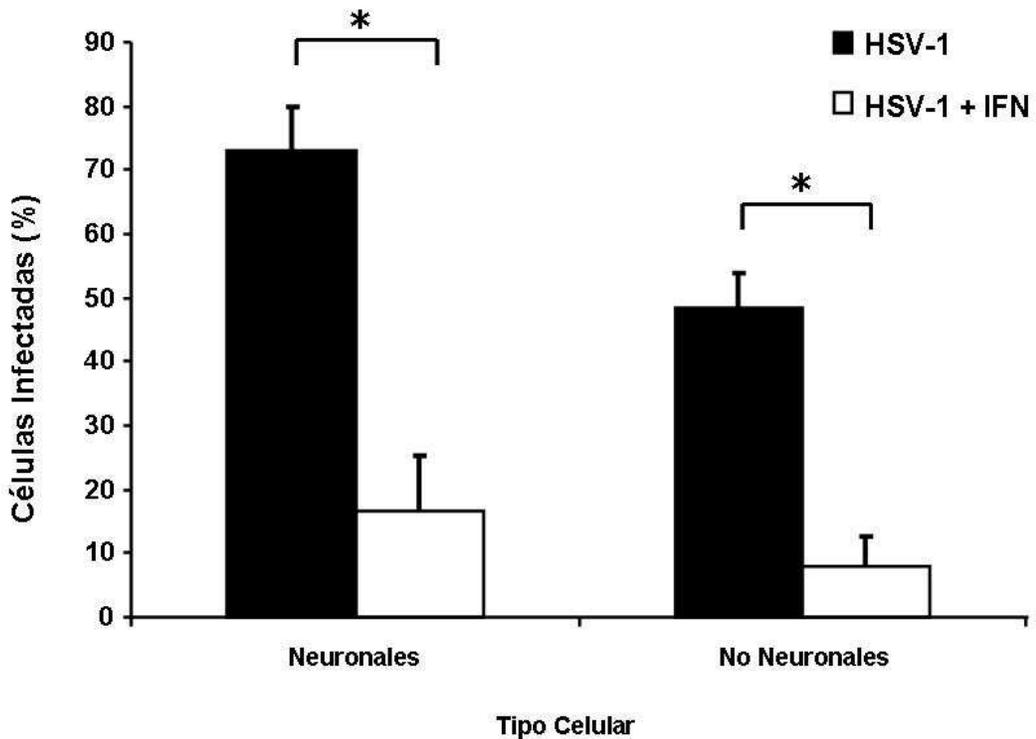


Figura 5. El tratamiento con IFN- β disminuye el porcentaje de células infectadas por HSV-1 en cultivos de GT murino. Las barras representan la media \pm la desviación estándar del porcentaje de células infectadas presentes en cultivos de GT murino infectados con HSV-1; tratados y no tratados con 1000 U/ml IFN- β . Se realizaron 2 experimentos independientes por triplicado. El * representa un valor $p < 0,05$ de la prueba de Mann-Whitney de los cultivos infectados, tratados con IFN- β , comparado con los infectados, no tratados.

Tras definir la dosis de IFN- β que presentó el mayor efecto antiviral, se determinó por inmunocitoquímica el porcentaje de células de GT infectadas y si este número disminuye tras el tratamiento con IFN- β .

Se evidenció que a las 28h, en los cultivos sin tratamiento, la infección está altamente diseminada en toda la monocapa; infectando tanto células neuronales como no neuronales (Figura 4 y 5), donde en estas últimas se evidencia un efecto citopático (Figura 2C). En la condición sin tratamiento, el 72,9% de las células neuronales y el 48,3% de las células no neuronales están infectadas (Figura 5). Sin embargo, el pretratamiento con IFN- β evitó la aparición de efecto citopático (Figura 2D), disminuyó significativamente la infección, a unos pocos grupos de células positivas para antígeno viral evitando la diseminación de la infección en toda la monocapa (Figura 4B). Así se observó que el tratamiento con IFN- β previo a la infección, disminuyó el porcentaje de

células neuronales infectadas a 16,7% y el de las células no neuronales disminuyó a 7,8% (Figura 5).

Estos resultados indican que el pre-tratamiento con IFN- β previo a la infección, disminuye el porcentaje de células infectadas. Evidenciando un efecto protector ejercido por el IFN- β , sobre las células de GT en cultivo, frente a la infección por HSV-1, evitando así la propagación de la infección en la monocapa.

4. La infección con HSV-1 induce la sobre-expresión de Rnasa L y levemente de Oas1a, pero disminuye la expresión constitutiva de Pkr.

Cultivos pre-tratados o no con IFN- β por 6h, fueron infectados con HSV por 12h. La expresión relativa fue normalizada con respecto a β -actina y calculada con respecto a los controles inoculados con mock y a los controles inoculados con mock y tratados con IFN- β . Para realizar el cálculo de la expresión relativa, los cultivos infectados sin tratamiento fueron comparados con la expresión de los cultivos inoculados con Mock sin tratamiento. Y la expresión relativa de los cultivos infectados y tratados con IFN- β fueron comparados con la expresión de los cultivos inoculados con Mock y tratados con IFN- β .

Se encontró que para el gen *Pkr*, el tratamiento con IFN- β causa una sobre-expresión de 4,3 veces en cultivos infectados. Pero la infección sin tratamiento generó una disminución significativa de 0,18 veces en el número de transcritos de este gen (Figura 6A).

Por otro lado, el gen *Oas1a* se encuentra ligeramente sobre-expresado: 2,8 veces en los cultivos infectados con HSV-1 no tratados, comparados con los cultivos inoculados con mock no tratados. Esta sobre-expresión de *Oas1a* se incrementa a 10 veces, en los cultivos infectados con HSV-1 tras el tratamiento con IFN- β , comparado con los cultivos inoculados con mock tratados con IFN- β , que tienen una expresión relativa de 1 (Figura 6B).

En contraste, el comportamiento del gen de RNasa L fué opuesto, no ocurrió un incremento en el número de transcritos (1,15 veces) tras 6h de tratamiento con IFN- β y 12h de infección, comparado con los cultivos inoculados con el mock y tratados con IFN- β . Pero la infección sin tratamiento, sí generó una sobre-expresión de 8,2 veces

en los transcritos de RNasa L, comparados con los cultivos inoculados con el mock sin tratamiento (Figura 6C).

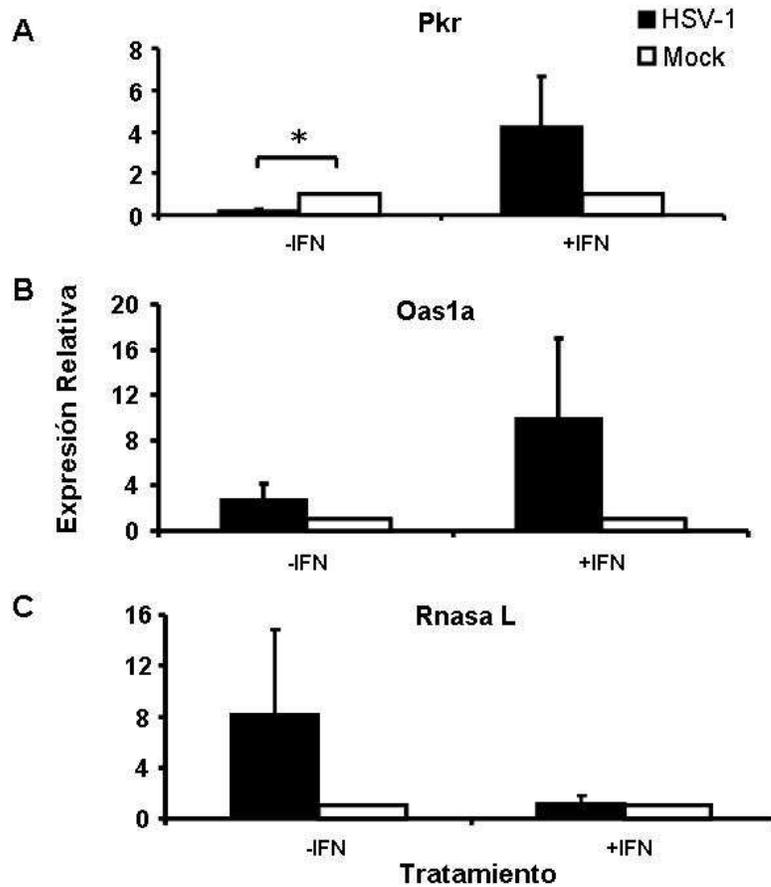


Figura 6. La infección con HSV-1 induce la expresión de Rnasa L y levemente de Oas1a, y disminuye la expresión constitutiva de Pkr. Expresión relativa de genes inducidos por IFN en cultivos de GT murino tratados con 1000 U/ml de IFN- β por 6h e infectados con HSV MOI 1 por 12h. La expresión relativa en los cultivos infectados con HSV-1 no tratados con IFN- β , fue establecida con respecto a los cultivos inoculados con mock sin tratamiento en los que la expresión relativa es de 1. En los cultivos tratados con IFN- β e infectados con HSV-1 la expresión relativa fue establecida con respecto a la expresión de los inoculados con mock y tratados con IFN- β , en los que la expresión relativa es de 1. La expresión relativa fue normalizada con respecto a β -actina. **A.** Expresión relativa de Pkr. **B.** Expresión relativa de Oas1a. **C.** Expresión relativa de Rnasa L. Las barras representan la media \pm el error estándar de la media para 2 experimentos independientes por duplicado. El * representa resultados significativos con un valor $p < 0,05$ para la prueba de Mann-Whitney.

5. El IFN- β disminuye la expresión de los tres tipos de genes virales α , β y γ .

Los cultivos fueron pre-tratados o no con IFN- β por 6h e infectados con HSV por 6 y 12h. Se encontró que en este modelo se expresan los 3 tipos de genes virales del ciclo lítico del virus (Figura 7).

El comportamiento de los tres genes evaluados fue muy similar, el gen α *ICP0*, el gen β *TK* y el gen γ , *gB* se expresaron en ambos tiempos evaluados, tanto a las 6h p.i. como a las 12h p.i., siendo la expresión más alta a las 6h (Figura 7). Pero se evidenció que el tratamiento previo con IFN- β disminuyó la cantidad de transcritos de los tres tipos de genes virales (Figura 7).

Esto indica que el IFN- β posee un efecto antiviral potente que causa una inhibición transcripcional de la infección viral en estos cultivos.

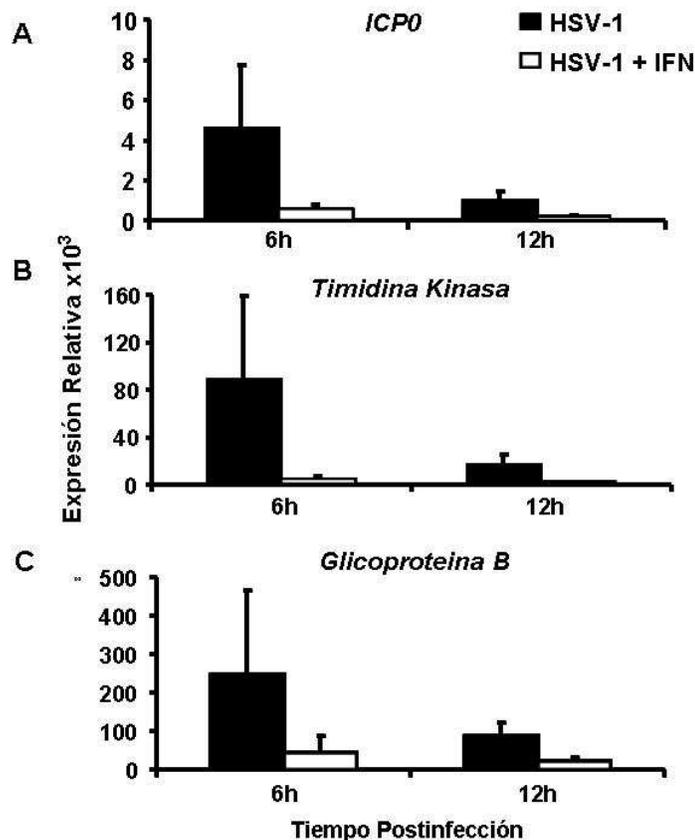


Figura 7. El tratamiento con IFN- β disminuye la expresión de los 3 tipos de genes virales α , β y γ . Expresión relativa de genes virales *ICP0*, *TK* y *gB* en cultivos de GT murino tratados con 1000U/ml de IFN- β por 6h e infectados con HSV MOI 1 por 6h y 12h. La expresión relativa fue establecida con respecto a β -actina usando como calibrador los cultivos infectados con mock en los que la expresión relativa es de 0 (E=1 y Ct=40). **A.** Expresión relativa del gen viral *ICP0*. **B.** Expresión relativa del gen viral *TK*. **C.** Expresión relativa del gen viral *gB*. Las barras representan la media de la expresión relativa multiplicada por 10³ \pm el error estándar de la media, para 2 experimentos independientes por duplicado.

6. La infección por HSV-1 induce la expresión del gen Socs-3

Se evaluó la expresión relativa de Socs-3 en cultivos primarios de GT murino pre-tratados 6h con IFN- β e infectados con HSV-1 por 6 y 12h. Se evidenció que a las 12h p.i. el HSV-1 induce una sobre-expresión de 4 veces el número de transcritos de Socs-3. Sin embargo, el tratamiento previo con IFN- β disminuyó la cantidad de transcritos, a pesar de la infección, a 1.5 veces. Indicando que el IFN- β evita la inducción de la expresión de Socs-3 causada por la infección por HSV-1 (Figura 8).

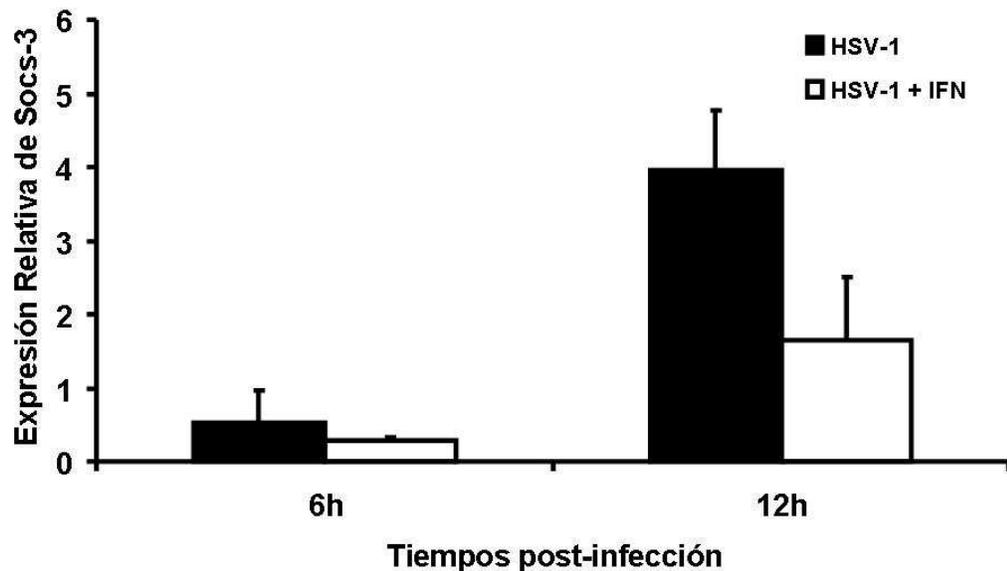


Figura 8. La infección induce la expresión del gen Socs-3 pero el tratamiento con IFN- β disminuye esta inducción. Expresión relativa del gen Socs-3 en cultivos de GT murino tratados con 1000 U/ml de IFN- β por 6h e infectados con HSV MOI 1 por 6h y 12h. La expresión relativa fue establecida con respecto a β -actina y teniendo como referencia los cultivos infectados con mock en los que la expresión relativa es de 1. Las barras representan la media \pm el error estándar de la media para 2 experimentos independientes por duplicado.

7. La infección por HSV-1 inhibe parcialmente la activación de la cascada de señalización de Jak-Stat inducida por IFN- β

Se evaluó la activación de Jak-1 y Stat-1 miembros de la cascada de señalización de IFN- β en cultivos infectados por 12h y 18h, y tratados posteriormente con 1000 U/ml de IFN- β por 15 min.

Se evidenció que el tratamiento con IFN- β activa la kinasa Jak-1 tanto en cultivos no infectados como en cultivos infectados con HSV-1 (Figura 9A). Pero al realizar el análisis densitométrico de intensidad relativa de las bandas con respecto a la intensidad de β -actina; se evidenció que en los cultivos infectados, Jak-1 se activa con una intensidad más baja en comparación con los cultivos inoculados con mock. Esto se observó en ambos tiempos evaluados, tanto a las 12h como a las 18h.p.i. (Figura 9B).

Por otro lado, se evidenció que el tratamiento con IFN- β activa la fosforilación de Stat-1 tanto en cultivos inoculados con el mock como en los infectados con HSV-1 (Figura 8C). Pero el análisis densitométrico de la intensidad relativa de las bandas de p-Stat-1, reveló que en los cultivos infectados con HSV-1, tras el tratamiento con IFN- β ocurre activación de Stat-1 pero con menor intensidad que en los cultivos con el mock (Figura 9D). Este efecto de la infección fue más evidente hacia las 18hpi. Estos resultados indican un posible efecto de evasión de la respuesta a interferón causado por el virus HSV-1 en cultivos primarios de GT murino. Como control, las formas no fosforiladas de las proteínas Jak-1 y Stat-1 están presentes en todas las condiciones evaluadas (Figura 9A y 9C).

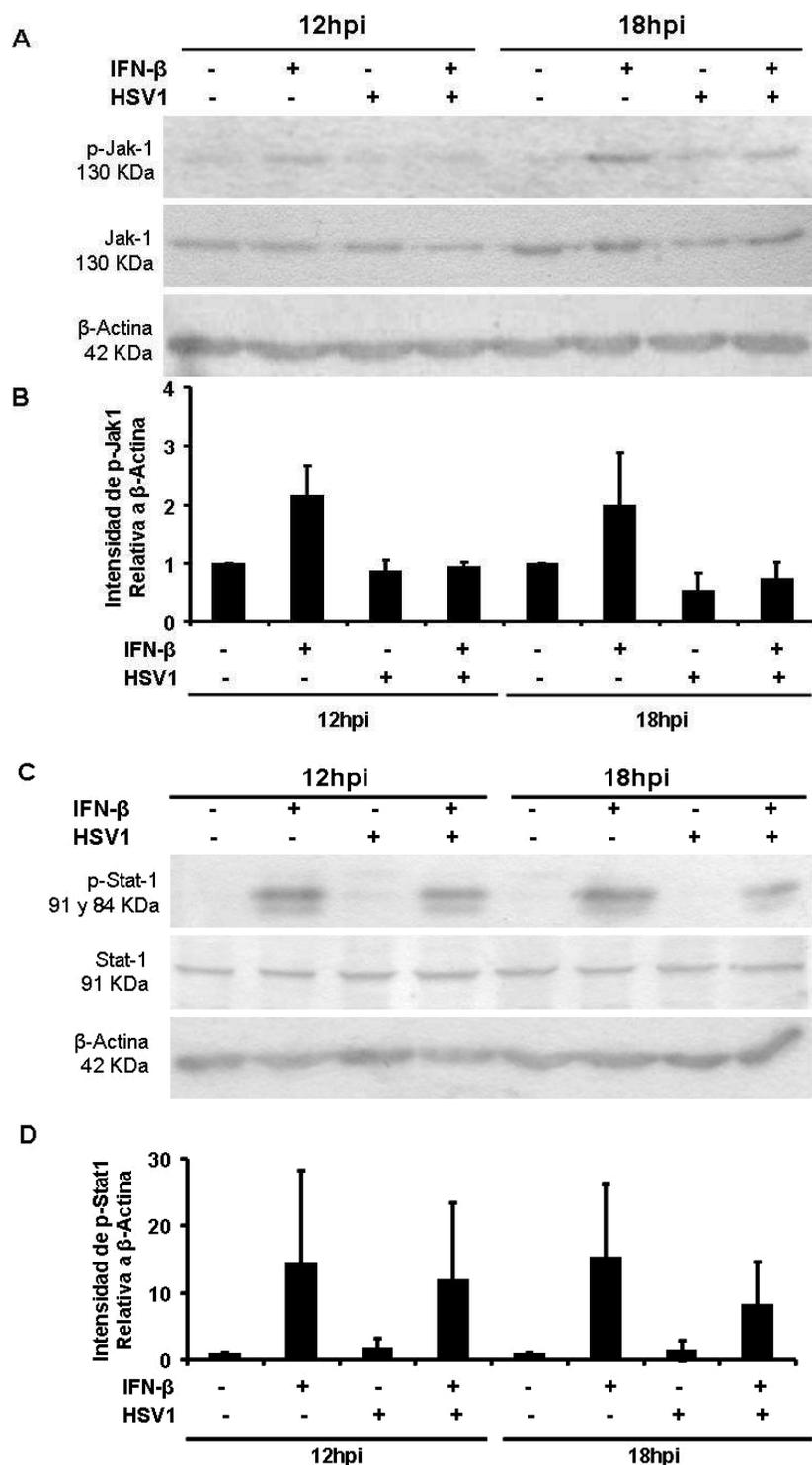


Figura 9. La infección por HSV-1 inhibe parcialmente la activación de la cascada de señalización Jak-Stat. **A.** Western blot para p-Jak-1, Jak-1 y β -actina. **B.** Análisis densitométrico para p-Jak-1. Las bandas corresponden a la intensidad relativa de p-Jak-1 obtenida por la relación de intensidad de la banda de p-Jak-1 con respecto a la banda de β -actina de la misma condición. **C.** Western blot para p-Stat-1, Stat-1 y β -actina. **D.** Análisis densitométrico para p-Stat-1. Las bandas corresponden a la intensidad relativa de p-Stat-1 obtenida por la relación de intensidad de la banda de p-Stat-1 respecto a la banda de β -actina de la misma condición. Donde la relación de intensidad de los controles mock sin tratamiento de cada tiempo tienen un valor de 1. Las barras representan la media de la intensidad relativa de cada banda \pm el error estándar de la media para 2 experimentos independientes.

V. DISCUSIÓN

El cultivo de GT murino enriquecido en neuronas puede ser una aproximación mejor para evidenciar la respuesta de las neuronas del GT frente al HSV-1

El HSV-1 es un virus neurotrópico que ha sido ampliamente estudiado tanto *in vivo* como *in vitro*. Uno de los modelos recientemente empleados para su estudio ha sido el modelo de cultivo de GT. Uno de estos cultivos descritos en la literatura (Carr *et al.* 2003), posee un porcentaje muy bajo de neuronas (1,5%) y el porcentaje restante son fibroblastos principalmente. En ese modelo, el bajo porcentaje de neuronas dificulta la interpretación de la respuesta evidenciada, ya que *in vivo*, las neuronas son las principales células del GT que se infectan y son las responsables del establecimiento de infecciones latentes y reactivaciones, y no los fibroblastos (Roizman *et al.* 2007). Por lo cual, los modelos con porcentajes muy bajos de neuronas, probablemente no son los más apropiados para evidenciar la contribución de las células del GT, en especial de las neuronas, a la respuesta ante la infección y al IFN.

No obstante, el modelo *in vitro* de cultivos de GT murino descrito en este trabajo, es un cultivo enriquecido en células neuronales que forman el 15% del total de células presentes; es decir 10 veces más neuronas que otros modelos descritos (como el de Carr *et al.* 2003); lo que significa que nuestro modelo incrementa la probabilidad de interacción entre el HSV-1 y las neuronas, y al mismo tiempo entre el IFN y las neuronas. Esta característica de este cultivo celular, permite evaluar mejor la respuesta de las mismas a la infección y al IFN- β . Esta interacción entre el HSV-1 y las neuronas fue evidente, ya que a pesar de que el virus entra en contacto con todas las células presentes en el cultivo (Figura 4A) y que las neuronas son minoría; estas células se infectan en una mayor proporción (70%). Este resultado es consistente con el neurotropismo del virus, e indica que en ese modelo el virus interactúa, con mayor probabilidad, con las neuronas del cultivo; comparado con otros cultivos. Siendo una aproximación más cercana a lo que podría estar ocurriendo *in vivo*, en comparación con modelos de cultivos con un bajo contenido de neuronas.

El IFN- β disminuye la producción de partículas virales de HSV-1, evita la muerte celular y la diseminación del virus en la monocapa de células

El IFN- β ejerció un efecto antiviral ante la infección por HSV-1 en cultivos primarios de GT murino. Esta actividad antiviral fue evidenciada por una disminución de la replicación viral reflejada en una menor producción de partículas virales. Adicionalmente, el IFN- β evitó la aparición de efecto citopático y la muerte celular causada por la infección. Al mismo tiempo evitó la diseminación de la infección en la monocapa celular, disminuyendo la expresión de antígeno viral tanto en neuronas como en células no neuronales.

Esta inhibición de la replicación viral del HSV-1, mediada por IFN- β , también ha sido evidenciada previamente *in vitro* en cultivo de GT murinos, donde el tratamiento con IFN- β disminuyó los títulos virales obtenidos a partir de sobrenadantes (Carr *et al.* 2003). En cultivos primarios de ganglios de raíz dorsal de rata tratados con IFN- α y - β se evidenció este mismo efecto (Svennerholm *et al.* 1989). Además el tratamiento con IFN- α de cultivos de GT porcino infectados con HSV-1, también evitó la aparición de efecto citopático y disminuyó la expresión de antígeno viral (DeRegge, 2010).

Por otro lado, este efecto también ha sido evidenciado en modelos *in vivo* de infección ocular por HSV-1, en los que ratones transducidos con un vector adenoviral o tratados con un plásmido, que expresa el gen de IFN- β murino, tuvieron un efecto protector que disminuyó los títulos virales en la córnea y en el GT durante la etapa de infección aguda, incrementando la supervivencia de los ratones infectados (Cui *et al.* 2000; Al-khatib *et al.* 2004; Al-khatib *et al.* 2005; Austin *et al.* 2005). Esto indica que la inducción de la expresión de IFN- β o el tratamiento directo con la proteína IFN- β tanto *in vitro* como *in vivo*, ejerce un efecto antiviral importante que controla la infección aguda por HSV-1 en el GT. Esto se confirma porque la replicación viral del HSV-1 se incrementa en el GT de ratones en ausencia del gen del receptor de IFN-I y al realizar un bloqueo del IFN- α/β con un anticuerpo (Halford *et al.* 1997; Leib *et al.* 1999). Lo anterior indica que la señalización inducida por IFN- β tiene un papel importante *in vivo* en el GT, para controlar la infección por HSV-1. Además existe evidencia de que *in vivo* la infección por HSV-1, induce la producción de IFN- α y - β en el GT de ratones con infección aguda, hacia los 4 y 6 días post-infección (Peng *et al.* 2005). Esta evidencia, sumada a los resultados encontrados en el presente trabajo, sugiere que IFN- β durante la etapa

de infección aguda por HSV-1, ejerce una actividad antiviral importante y necesaria, para controlar la infección en el GT.

Igualmente, el efecto antiviral del IFN- β disminuyó significativamente el número de neuronas infectadas por HSV-1, ya que a pesar de ser las células que más se infectan, son también las que presentaron la mayor disminución de la infección tras el tratamiento con IFN, siendo la reducción del 70% al 16% (Figura 5). Esto indica que las neuronas del GT tienen la capacidad de responder al IFN- β exógeno generando un estado antiviral que les permite controlar la infección por HSV-1. Esta capacidad de las neuronas de responder a IFN-I ha sido reportado en otras ocasiones, como por ejemplo, en neuronas primarias corticales de ratón se ha visto que ocurre expresión de genes antivirales como *Pkr*, tras el tratamiento con IFN- α (Wang y Campbell; 2005). De igual forma, en neuronas primarias de cerebelo de ratón, tras el tratamiento con IFN- β se incrementa la expresión de *Oas* (Massa *et al.* 1999). Esta evidencia, sumada al resultado de este trabajo que muestra que el tratamiento con IFN- β causa una disminución significativa en el número de neuronas infectadas, es indicio de que las células del GT -incluyendo las neuronas- son capaces de responder al IFN- β exógeno estableciendo un estado antiviral que les permite controlar la infección por HSV-1.

El IFN- β causa una inhibición transcripcional de los genes virales que podría controlar la infección aguda en el GT

El HSV-1 en cultivos de GT murino, sufre un ciclo de replicación lítico evidenciado por la producción de partículas virales infecciosas, la aparición de efecto citopático y la muerte celular evidenciada en los cultivos infectados sin tratamiento. Así mismo, esto es soportado por el hecho de que en este modelo ocurre la expresión de los 3 grupos de genes virales α , β , y γ , que conforman el ciclo lítico viral. En nuestro trabajo se evidenció que el tratamiento con IFN- β presentó una tendencia a disminuir la expresión de los tres genes evaluados *ICP0*, *Tk* y *gB* que pertenecen uno a cada grupo de genes del ciclo lítico. Aunque esta inhibición no fue estadísticamente significativa, sí permite evidenciar la tendencia general de estos transcritos virales ante el tratamiento con IFN- β . Esto es soportado por datos obtenidos en reportes adicionales en los que se han evaluado genes diferentes, y se ha determinado que IFN- β es el único tipo de IFN-I que disminuye significativamente la expresión los 3 tipos de genes virales en cultivos de GT (Carr *et al.* 2003). Esta inhibición

transcripcional también ocurre en fibroblastos murinos L929 a los que se les introdujo el gen de IFN- β , y está relacionado, con una disminución en la expresión de proteínas virales (Al-khatib *et al.* 2002; Härle, *et al.* 2002b). La inhibición de la expresión de proteínas virales también se evidenció de manera indirecta en nuestro modelo, por la disminución de la presencia de antígeno viral en las células de GT, evaluado por inmunocitoquímica (Figura 4).

Por otro lado estos resultados se relacionan con modelos de infección ocular *in vivo* en ratones, en los que la aplicación de un plásmido o un vector adenoviral que expresa IFN- β , reduce la expresión de los tres tipos de genes virales en el GT (Cui *et al.* 2000; Al-khatib *et al.* 2005). La inhibición transcripcional de genes virales, puede estar relacionada con el efecto inhibitor *in vitro* del IFN sobre el factor de transcripción viral VP16 (LaMarco y McKnight, 1989), que es el responsable de la activación transcripcional de genes α , de la cual, a su vez, depende la expresión de genes β y γ (Roizman *et al.* 2007). Otra explicación para esta inhibición, es que la sobre-expresión de Oas inducida por el tratamiento con IFN, incrementa la cantidad de 2'-5'oligoadenilatos que activan RNasa L, la cual finalmente degrada el RNA mensajero viral, en cultivos de GT descritos en este trabajo. Por consiguiente, los resultados de la disminución en la expresión de genes virales, son consistentes con la literatura, y sugieren que IFN- β *in vitro* e *in vivo*, causa una reducción de los transcritos de los tres tipos de genes virales del HSV-1 durante la etapa de infección aguda en el GT por una disminución en la iniciación de la transcripción o por la degradación del RNA dependiente de RNasa L. Esto podría explicar la menor replicación y la menor presencia de antígeno viral evidenciado en nuestros cultivos tras el tratamiento con IFN- β .

En conjunto, nuestros resultados y los resultados de los estudios mencionados anteriormente, reflejan un papel importante de la respuesta antiviral inducida por IFN- β , en el control de la infección aguda por HSV-1 en el GT. De esta forma, el IFN- β podría contribuir a disminuir la replicación viral y controlar la diseminación de la infección en el GT, incrementando la supervivencia de las neuronas a la infección.

La infección incrementó los transcritos de *Rnasa L* e incrementó ligeramente los de *Oas1a* en cultivos de GT

Por otro lado, en nuestro modelo se evidenció tras 12h de infección con HSV-1 una tendencia al incremento en la expresión de *Rnasa L* y una ligera sobre-expresión de *Oas1a* (2,8 veces) (Figura 6By 6C). Estudios *in vivo* han reportado que en el GT de ratones infectados con HSV-1 después del inicio de la replicación de HSV-1 en el GT durante la fase aguda de infección, aparece una actividad dependiente de OAS que se mantiene varios días post-infección, y esto coincide con la aparición de IFN en el GT (Sokawa *et al.* 1980). Estos estudios concluyen que durante la etapa de infección aguda por HSV-1 *in vivo* en ratones ocurre producción de IFN, y éste a su vez induce la expresión de *Oas*. En otro estudio *in vivo* más reciente, también se evidenció que la etapa de infección aguda por HSV-1 induce la expresión de IFN- α e IFN- β en el GT a los 6 días post-infección (Peng *et al.* 2005). Por lo anterior, de acuerdo con los estudios en GT *in vivo*, la tendencia al incremento en la expresión de estos ISGs observada en estos cultivos de GT, puede ser explicado por una posible activación de la producción de IFN-I en las células de GT, como respuesta a la infección con HSV-1 y esta producción de IFN a su vez podría inducir la expresión de ISGs evidenciada en este trabajo. Dado que no existen estudios *in vitro* en cultivos de GT donde evalúen la expresión de ISGs tras la infección con HSV-1, nuestros resultados, podrían representar el primer indicio de que en cultivos de GT la infección con HSV-1 activa la expresión de los ISGs que podría indicar que la infección induce producción de IFN-I en estas células *in vitro*. Sin embargo, esto no se puede afirmar con certeza, ya que en este modelo de cultivos de GT no se cuantificó la expresión ni la producción de IFN tras la infección, lo cual es necesario evaluar en un futuro, para confirmar si esta inducción de *Oas* y *Rnasa L* tras la infección con HSV-1 es mediada por la producción de IFN-I.

La infección con HSV-1 disminuye significativamente los niveles constitutivos de *Pkr*

En células de GT no tratadas con IFN- β se evidenció que la infección con HSV-1 por 12h disminuye significativamente la expresión constitutiva de *Pkr*. Esto también ha sido reportado en células L929 infectadas con HSV-1 tanto transfectadas, como no transfectadas con el gen de IFN- β . En esta línea celular a las 10 h.p.i, la expresión de

Pkr se reduce temporalmente de manera significativa (Al-Khatib *et al.* 2002). Esto, sumado a nuestros resultados, podría representar que el HSV-1 posee un mecanismo de evasión que disminuye específicamente los niveles de mRNA del gen de *Pkr*. Esto sería un mecanismo de evasión, novedoso y adicional al descrito previamente, que consiste en que la proteína viral $\gamma 1$ 34.5 inactiva a PKR causando su desfosforilación e inhibiendo su actividad antiviral (Chou *et al.* 1995). Esta disminución de la expresión de *Pkr* podría, no sólo contrarrestar la inhibición de la síntesis de proteínas causada por PKR, sino que podría llegar a disminuir la apoptosis mediada por esta proteína, ya que se ha descrito que ésta también participa en apoptosis (García *et al.* 2007). Entonces la disminución de la expresión de *Pkr* causada por la infección viral podría contribuir a modular la respuesta antiviral innata dependiente de la proteína PKR y al mismo tiempo podría incrementar la supervivencia de las células del GT a la infección evitando la apoptosis. Esta disminución de la apoptosis, podría contribuir a prolongar la fase de infección aguda en las células de GT, permitiendo la diseminación de la infección viral que eventualmente podría finalmente concluir en el establecimiento de la latencia.

El IFN- β induce la expresión de Pkr y Oas en cultivos de GT

La inducción de un estado antiviral por IFN- β , frente a la infección por HSV-1, se relacionó con una tendencia a la sobre-expresión de los genes inducidos por IFN: *Pkr* y *Oas1a*. Esto sugiere que ambas moléculas pueden estar involucradas en el efecto antiviral del IFN- β en estos cultivos. Estos resultados coinciden con lo reportado previamente en otros modelos de cultivos de GT, donde el tratamiento con IFN- β o la transducción del gen, inducen una sobre-expresión de *Oas* y *Pkr* (Carr *et al.* 2003; Al-khatib *et al.* 2003). También en un modelo de infección ocular *in vivo*, tras inducir la expresión de IFN- β , se induce un incremento en los transcritos de *Oas* en el GT (Al-khatib *et al.* 2004), indicando que el IFN- β posiblemente ejerce su efecto antiviral en el GT *in vivo* e *in vitro*, a través de la sobre-expresión de *Pkr* y *Oas*. Además, reportes previos han evidenciado un rol crítico de las vías PKR y OAS/RNasa L en el efecto antiviral del IFN- β en cultivos de GT, ya que el efecto antiviral de IFN- β se pierde en ausencia de los genes *Oas* y *Pkr* (Al-khatib *et al.* 2003). *In vivo* en un modelo de infección ocular en ausencia de los genes *Oas* o *Pkr*, los ratones fueron más susceptibles a la infección con HSV-1 y el efecto antiviral del IFN- β disminuyó (Al-khatib *et al.* 2004; Austin, *et al.* 2005). Estos resultados, junto a los nuestros, pueden

indicar que el efecto antiviral del IFN- β en el GT está mediado de forma importante por PKR, Oas y su efector corriente abajo, RNasa L.

El IFN- β no incrementó los transcritos de RNasa L en el GT in vitro

En cultivos de GT, 6h de tratamiento con IFN- β y 12h posteriores de infección no condujeron a una sobre-expresión de los transcritos de *RNasa L*, cuantificado por PCR en tiempo real. El hecho de no encontrar sobre-expresión de este gen en cultivos infectados tras el tratamiento, estaría en desacuerdo con la literatura, dado que la expresión de *Rnasa L* puede ser inducida por el tratamiento con IFN (Liang *et al.* 2006), como es el caso de fibroblastos murinos L929 tratados con IFN- α y - β , en los que se induce un incremento en los mensajeros para *Rnasa L* hasta llegar a un nivel máximo a las 14h post-tratamiento (Zhou *et al.* 1993). Por lo anterior, se esperaría que el tratamiento con IFN- β por 6h causara una sobre-expresión de este gen en cultivos de GT. Sin embargo, otro reporte evidencia que el incremento en la expresión de RNasa L por el tratamiento con IFN- β es leve (menor a 2 veces) en fibroblastos humanos (Rusch *et al.* 2000), lo que podría ser indicio de que el tiempo en el cual se realizó la cuantificación de transcritos de *Rnasa L* (18h post-tratamiento con IFN- β), es un tiempo tardío para detectar los incrementos leves en la expresión de este gen causados por el tratamiento con IFN- β en cultivos de GT, razón por la cual no se evidenció incremento en los transcritos de *Rnasa L* tras el tratamiento con IFN.

Además, como este gen tiene expresión constitutiva prácticamente en todos los tejidos de mamíferos (Bisbal y Silverman, 2007), existe la posibilidad de que los niveles constitutivos de expresión de *Rnasa L* sean suficientes para ejercer su actividad. Esto ha sido evidenciado por Rusch y colaboradores, en una línea celular humana, en la que el tratamiento con IFN no incrementó significativamente los niveles de *Rnasa L*, pero sí incrementó la actividad dependiente de esta enzima (Rusch *et al.* 2000). Con respecto a esto, en el modelo de cultivo de GT descrito en este trabajo, el tratamiento con IFN- β sí indujo una sobre-expresión del gen *Oas1a* (proteína corriente arriba de RNasa L), lo que podría incrementar la cantidad de proteínas OAS y así la cantidad de Oligómeros de Adenosina disponibles capaces de activar la enzima RNasa L presente constitutivamente en las células. Y así, esto podría conducir a una mayor actividad enzimática dependiente de RNasa L ejerciendo el efecto antiviral evidenciado en estos cultivos, frente al HSV-1. Por otro lado, el hecho de no evidenciar una sobre-expresión

de *Rnasa L* no implica que este gen no sea importante para la actividad del IFN- β en estos cultivos, ya que se ha descrito que en ausencia del gen *Rnasa L* se atenúa el efecto antiviral de IFN- β frente al HSV-1 en modelos *in vivo* e *in vitro* de cultivos de GT de ratones (Carr *et al.* 2003; Al-khatib *et al.* 2003; Al-khatib *et al.* 2004).

La infección de cultivos de GT con HSV-1 induce la expresión de Socs-3, pero el tratamiento con IFN- β inhibe esta expresión

En este modelo de cultivo primario de GT enriquecido en neuronas, a las 12 h.p.i con HSV-1 se evidenció que la expresión de Socs-3 es inducida por la infección. Sin embargo, esta sobre-expresión de Socs-3 no ocurre en los cultivos tratados previamente con IFN- β . Esta inducción de la expresión de Socs-3 tras la infección por HSV-1 ha sido reportada previamente en la línea FL de células amnióticas (Yokota *et al.* 2004, Yokota *et al.* 2005). Pero a diferencia de esta línea, en nuestro modelo ocurre en una etapa de infección más tardía (12h p.i.), cuando ya ha ocurrido la expresión de los tres tipos de genes virales α , β , y γ . La inducción tardía de estas moléculas Socs, también ha sido descrita en una línea celular de queratinocitos tras 12h de infección con HSV-1 (Frey *et al.* 2009). Esto probablemente es indicio de que el HSV-1 en estas células de GT requiere de la replicación viral y presencia de productos génicos virales para inducir la expresión de Socs-3. Por lo tanto, la disminución de la expresión de Socs-3 evidenciada tras el tratamiento con IFN- β es probablemente consecuencia del efecto antiviral de IFN que disminuye la replicación, transcripción viral y la presencia de antígeno viral en células de GT. Lo cual a su vez podría disminuir las proteínas virales involucradas en la inducción transcripcional de Socs-3. Sin embargo, para confirmar esto, sería necesario emplear virus incapaces de realizar el proceso replicativo, y evidenciar si en éstos se inhibe la inducción de la expresión de Socs-3.

Por otro lado, se ha descrito que Socs-1 y Socs-3 poseen la capacidad de inhibir la expresión de ISGs como *Oas* y *Mx* inducida por IFN- α (Vlotides *et al.* 2004). En nuestro trabajo, se evidenció que la infección a las 12h inhibe la expresión de *Pkr*, y esto coincide con una sobre-expresión de Socs-3, por lo cual es posible que un mecanismo mediado por Socs-3 esté involucrado específicamente en la desregulación de *Pkr* observada en los cultivos de GT infectados. Al mismo tiempo, en este trabajo, no se evidenció una disminución de *Oas1a* y *Rnasa L* en los cultivos infectados, lo cual lleva a pensar que es posible que la expresión de Socs-3 inducida por la infección

no sea suficiente para afectar la transcripción de *Oas* y *Rnasa L*; o que otros mecanismos virales o celulares diferentes a *Socs-3*, estén involucrados en la disminución de *Pkr*.

La Infección con HSV-1 causa una inhibición parcial de la activación de la cascada de señalización Jak-Stat inducida por IFN- β

En nuestro modelo se evidenció que el tratamiento con IFN- β induce la fosforilación de moléculas de la cascada de señalización Jak-Stat, en células de GT. Esto también ha sido descrito en un modelo de infección ocular en ratones, donde la transfección con el gen IFN- β incrementa los niveles de fosforilación de la proteína Stat-1 (Austin *et al.* 2005). Estos resultados junto con los evidenciados en nuestro trabajo, indican que IFN- β induce su actividad antiviral a través de la activación de la cascada de señalización Jak-Stat en las células de GT y que estas células responden de manera eficiente a esta señal, evidenciado como un efecto antiviral frente a la infección.

Adicionalmente, en este trabajo se evidenció que después de 12h de infección por HSV-1 se inhibe de forma incompleta la fosforilación de Jak-1 y Stat-1, lo cual fue más evidente hacia las 18h p.i. Esta inhibición parcial de la fosforilación de Jak-1 y Stat-1 coincide con una sobre-expresión de *Socs-3* en los cultivos infectados, lo cual ha sido descrito previamente (Song *et al.* 1998; Yokota *et al.* 2004), indicando que *Socs-3* podría ser responsable de la inhibición parcial de la fosforilación de Jak-1 y Stat-1 evidenciada en nuestro trabajo.

Aunque la inhibición de la cascada de señalización no fue completa, sí se observó una tendencia a una mayor inhibición al incrementar el tiempo de infección. Indicando que posiblemente a mayor tiempo de infección hay más cantidad de transcritos y/o de proteínas virales que pueden ejercer una mayor inhibición de la cascada de señalización. Una posible explicación de porque se evidenció esta inhibición parcial de la activación de la cascada Jak-Stat, es que aquellos modelos en los que se ha descrito una inhibición completa de la vía Jak Stat tras la infección, emplean MOIs significativamente más altos (MOI 5 y MOI 20) (Yokota *et al.* 2001; Yokota *et al.* 2004; Johnson *et al.* 2008; Johnson y Knipe, 2010). Así, el infectar las células con una mayor cantidad de partículas virales, produce una concentración intracelular más alta de

proteínas virales, que podrían ejercer un efecto inhibitor más completo de la cascada de señalización Jak-Stat.

Por otro lado, la inhibición de la cascada de señalización Jak-Stat causada por la infección por HSV-1, ha sido descrita previamente en líneas de células amnióticas, fibroblastos y células epiteliales (Yokota *et al* 2001, Yokota *et al.* 2004, Jhonson *et al.* 2008; Jhonson y Knipe, 2010; Frey *et al.* 2009); pero nunca ha sido descrita su ocurrencia en células de GT ni en cultivos primarios de células, por lo cual, estos resultados representan la primera descripción de un posible mecanismo de inhibición de la señalización de IFN- β tras la infección con HSV-1 en el GT. Dado que *in vivo* la infección por HSV-1 induce la producción de IFN- α y - β en el GT (Peng *et al.* 2005) y el estímulo de reactivación puede inducir la expresión de IFN- α y - β en neuronas del GT (Tal-Singer *et al.* 1998), es posible especular que la inhibición parcial de la cascada Jak-Stat causada por el HSV-1 y mediada -posiblemente- por Socs-3, puede disminuir parcial o temporalmente la actividad antiviral del IFN- β en el GT. Lo anterior indicaría que el virus posee mecanismos para contrarrestar la respuesta mediada por IFN- β , facilitando el establecimiento de infecciones agudas, incrementando la replicación viral y la diseminación de la infección en el GT. Al mismo tiempo en la reactivación, esto podría incrementar la producción de partículas virales, que por transporte anterógrado pueden ser llevadas hacia el sitio periférico causando infecciones recurrentes más eficientemente.

VI. CONCLUSIONES

En este modelo de cultivos de GT enriquecidos en neuronas, ocurre una replicación viral lítica evidenciada por la obtención de partículas virales infecciosas, la expresión de genes del ciclo lítico, la disminución de la viabilidad celular y aparición de efecto citopático.

El IFN- β ejerce un efecto antiviral frente al HSV-1 en cultivos de GT murino, disminuyendo la producción de partículas virales, protegiendo las células de la muerte celular y disminuyendo el número de células infectadas.

El tratamiento con IFN- β protege las neuronas de la infección, a pesar de que son las células que más se infectan, sugiriendo que estas células poseen la capacidad de establecer un estado antiviral como respuesta al IFN- β .

El IFN- β causa una inhibición transcripcional de la infección por HSV-1, disminuyendo la expresión de los tres tipos de genes virales que conforman el ciclo lítico de infección. Indicando un posible papel de este IFN, en el control de la infección aguda y la diseminación del HSV-1 en el GT.

El IFN- β ejerce un efecto antiviral que se relacionó con una tendencia a la sobre-expresión de genes con actividad antiviral *Oas1a* y *Pkr*.

La infección con HSV-1, disminuye la expresión constitutiva de *Pkr*, lo cual puede representar un nuevo mecanismo de evasión viral de la respuesta a IFN en el GT.

La infección por HSV-1 en etapas tardías, induce la sobre-expresión de *Socs-3*, que se disminuye con el efecto antiviral del IFN- β .

La infección por HSV-1 inhibe parcialmente la activación de la vía de señalización Jak-Stat inducida por IFN- β en cultivos primarios de GT, lo que podría disminuir la actividad antiviral del IFN- β en el GT, siendo una ventaja para el virus en términos de mayor replicación durante la infección aguda en el GT.

VII. PERSPECTIVAS

Evaluar si en cultivos primarios de GT murino ocurre producción de IFN- β como respuesta a la infección por HSV-1 y si esto ocurre en etapas tempranas o tardías de la infección.

Si hay producción de IFN- β como respuesta a la infección por HSV-1, identificar el tipo de célula presente en el cultivo de GT responsable de su producción.

Dado que el IFN- β causó una sobre-expresión de los genes con actividad antiviral *Oas1a* y *Pkr*, identificar el tipo de célula dentro del cultivo, responsable de esta sobre-expresión.

Cuantificar la expresión de la proteína PKR en diferentes etapas del ciclo viral, buscando evidenciar si la desregulación de la expresión constitutiva del este gen causa una disminución significativa de los niveles de la proteína PKR.

Evidenciar la inducción de Socs-3 tras la infección por HSV-1, a través de la cuantificación e identificación del tipo de célula positiva para esta proteína y evidenciar si tras el tratamiento con IFN- β esta inducción de la proteína Socs-3 disminuye.

Evaluar si la inhibición parcial de la activación de la cascada de señalización Jak-Stat evidenciada tras la infección por HSV-1, también se evidencia en una menor translocación al núcleo del complejo ISGF3 responsable de la activación de genes de respuesta a IFN.

VIII. REFERENCIAS

Ahmed M, Lock M, Miller CG, Fraser NW. 2002. Regions of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript that protect cells from apoptosis in vitro and protect neuronal cells in vivo. *J Virol.* 76: 717-729.

Alexander WS. 2002. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2: 410-416.

Al-Khatib K, Williams BR, Silverman RH, Halford WP, Carr DJ. 2002. Absence of PKR attenuates the anti-HSV-1 activity of an adenoviral vector expressing murine IFN-beta. *J Interferon Cytokine Res.* 22: 861-871.

Al-khatib K, Williams BR, Silverman RH, Halford W, Carr DJ. 2003. 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.* 313: 126-135.

Al-Khatib K, Williams BR, Silverman RH, Halford W, Carr DJ. 2004. Distinctive roles for 2',5'-oligoadenylate synthetases and double-stranded RNA-dependent protein kinase R in the in vivo antiviral effect of an adenoviral vector expressing murine IFN-beta. *J Immunol.* 172: 5638-5647.

Al-Khatib K, Williams BR, Silverman RH, Halford W, Carr DJ. 2005. Dichotomy between survival and lytic gene expression in RNase L- and PKR-deficient mice transduced with an adenoviral vector expressing murine IFN-beta following ocular HSV-1 infection. *Exp Eye Res.* 80:167-173.

Amelio AL, Giordani NV, Kubat NJ, O'neil JE, Bloom DC. 2006. Deacetylation of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer and a decrease in LAT abundance precede an increase in ICP0 transcriptional permissiveness at early times postexplant. *J Virol.* 80: 2063-2068.

Arduino PG, Porter SR. 2008. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med.* 37:107-121.

Austin BA, James C, Silverman RH, Carr DJ. 2005. Critical role for the oligoadenylate synthetase/RNase L pathway in response to IFN-beta during acute ocular herpes simplex virus type 1 infection. *J Immunol.* 175: 1100-1106.

Baker CV, Bronner-Fraser M. 2001. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev Biol.* 232: 1-61.

Bartel DP. 2009. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136: 215-233

Bisbal C, Silverman RH. 2007. Diverse functions of RNase L and implications in pathology. *Biochimie.* 89: 789-798.

Bohmer P.E. y Lehman I.R. 1997. Herpes Simplex Virus DNA Replication. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 347-384.

Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG. 2009. Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *Immunol Lett.* 122,1-11.

Carpenter D, Hsiang C, Brown DJ, Jin L, Osorio N, BenMohamed L, Jones C, Wechsler SL. 2007. Stable cell lines expressing high levels of the herpes simplex virus type 1 LAT are refractory to caspase 3 activation and DNA laddering following cold shock induced apoptosis. *Virology.* 369:12-18.

Carr DJ, Al-khatib K, James CM, Silverman R. 2003. Interferon-beta suppresses herpes simplex virus type 1 replication in trigeminal ganglion cells through an RNase L-dependent pathway. *J Neuroimmunol.* 141: 40-46.

Castellanos J, Hurtado H. 1999. Viral Infection Studied in adult sensory neurons. The Neuron in tissue culture. *International Brain Research Organization Handbook Series: Methods in the Neurosciences.* 18: 289-293.

Chee AV, Roizman B. 2004. Herpes simplex virus 1 gene products occlude the interferon signaling pathway at multiple sites. *J Virol.* 78: 4185-4196.

Chen SH, Kramer MF, Schaffer PA, Coen DM. 1997. A viral function represses accumulation of transcripts from productive-cycle genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol.* 71: 5878-5884.

Chou J, Chen JJ, Gross M, Roizman B. 1995. Association of a M(r) 90,000 phosphoprotein with protein kinase PKR in cells exhibiting enhanced phosphorylation of translation initiation factor eIF-2 alpha and premature shutoff of protein synthesis after infection with gamma 134.5- mutants of herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 10516-10520.

Coen DM, Kosz-Vnenchak M, Jacobson JG, Leib DA, Bogard CL, Schaffer PA, Tyler KL, Knipe DM. 1989. Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 4736-4740.

Crocker BA, Kiu H, Nicholson SE. 2008. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol.* 19: 414-422.

Cui B, Carr DJ. 2000. A plasmid construct encoding murine interferon beta antagonizes the replication of herpes simplex virus type I in vitro and in vivo. *J Neuroimmunol.* 108: 92-102.

Cunningham AL, Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Bosnjak L, Kim M, Jones C, Douglas MW. 2006. The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis.* 194: S11-S18.

Decman V, Kinchington PR, Harvey SA, Hendricks RL. 2005. Gamma interferon can block herpes simplex virus type 1 reactivation from latency, even in the presence of late gene expression. *J Virol.* 79:10339- 10347.

De Regge N, Van Opendenbosch N, Nauwynck HJ, Efsthathiou S, Favoreel HW. 2010. Interferon alpha induces establishment of alphaherpesvirus latency in sensory neurons in vitro. *PLoS One.* 5: pii: e13076.

Divito S, Cherpes TL, Hendricks RL. 2006. A triple entente: virus, neurons, and CD8+ T cells maintain HSV-1 latency. *Immunol Res.* 36: 119-126.

Efstathiou S, Preston CM. 2005. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Res.* 111: 108-119.

Fatahzadeh M, Schwartz RA. 2007. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol.* 57: 737-763.

Frey KG, Ahmed CM, Dabelic R, Jager LD, Noon-Song EN, Haider SM, Johnson HM, Bigley NJ. 2009. HSV-1-induced SOCS-1 expression in keratinocytes: use of a SOCS-1 antagonist to block a novel mechanism of viral immune evasion. *J Immunol.* 183: 1253-1262.

Garber DA, Schaffer PA, Knipe DM. 1997. A LAT-associated function reduces productive-cycle gene expression during acute infection of murine sensory neurons with herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 71: 5885-5893.

García MA, Meurs EF, Esteban M. 2007. The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control. *Biochimie* 89: 799-811

Garner JA. 2003. Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 55:1497-1513.

Hagglund R, Roizman B. 2004. Role of ICP0 in the strategy of conquest of the host cell by herpes simplex virus 1. *J Virol.* 78: 2169-2178.

Halford W P, Gebhardt BM, Carr DJJ. 1996. Mechanisms of herpes simplex virus type 1 reactivation. *J Virol.* 70: 5051–5060.

Halford WP, Veress LA, Gebhardt BM, Carr DJJ. 1997. Innate and acquired immunity to herpes simplex virus type 1. *Virology.* 236: 328–337.

Halford WP, Schaffer PA. 2001. ICP0 is required for efficient reactivation of herpes simplex virus type 1 from neuronal latency. *J. Virol.* 75: 3240–3249.

Haller O, Kochs G, Weber F. 2006. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology.* 344: 119-130.

Härle P, Cull V, Agbaga MP, Silverman R, Williams BR, James C, Carr DJ. 2002b. Differential effect of murine alpha/beta interferon transgenes on antagonization of herpes simplex virus type 1 replication. *J Virol.* 76: 6558-67.

He B, Chou J, Brandimarti R, Mohr I, Gluzman Y, Roizman B. 1997. Suppression of the phenotype of gamma 1 34.5-herpes simplex virus 1: failure of activated RNA-dependent protein kinase to shut off protein synthesis is associated with a deletion in the domain of the alpha47 gene. *J Virol.* 71: 6049–6054.

Henderson G, Peng W, Jin L, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL, Jones C. 2002. Regulation of caspase 8- and caspase 9-induced apoptosis by the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript. *J Neurovirol.* 8: 103-111.

Honess RW, Roizman B. 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol.* 14: 8-19.

Hubber MA. 2003. Herpes Simplex Virus type 1 infection. *Quintessence International.* 34, 453-467.

Inman M, Perng GC, Henderson G. *et al.* 2001. Region of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript sufficient for wild-type spontaneous reactivation promotes cell survival in tissue culture. *J Virol.* 75: 3636–3646.

Jin L, Peng W, Perng GC, et al., 2003. Identification of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript sequences that both inhibit apoptosis and enhance the spontaneous reactivation phenotype. *J Virol.* 77: 6556–6561.

Johnson K, Song B, Knipe DM. 2008. Role for herpes simplex virus 1 ICP27 in the inhibition of type I interferon signaling. *Virology.* 374: 487–494.

Johnson KE, Knipe DM. 2010. Herpes simplex virus-1 infection causes the secretion of a type I interferon-antagonizing protein and inhibits signaling at or before Jak-1 activation. *Virology*. 396: 21-29.

Katze MG, He Y, Gale M Jr. 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol*. 2: 675-687.

Kaye S, Choudhary A. 2006. Herpes simplex keratitis. *Prog Retin Eye Res*. 25: 355-380.

Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL, Diefenbach RJ. 2009. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Res*. 145: 173-186.

Khanna KM, Bonneau RH, Kinchington PR, Hendricks RL. 2003. Herpes Simplex Virus Specific memory CD8+ T cells are selectively activated and retained in latently infected sensory ganglia. *Immunity*. 18: 593-603.

Khanna KM, Lepisto AJ, Decman V, Hendricks RL. 2004. Immune control of herpes simplex virus during latency. *Curr Opin Immunol*. 16: 463-469.

Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. 285: 1-24.

Kramer MF, Chen SH, Knipe DM, Coen DM. 1998. Accumulation of viral transcripts and DNA during establishment of latency by herpes simplex virus. *J Virol*. 72: 1177-1185.

Kristie TM, Pomerantz JL, Twomey TC, Parent SA, Sharp PA. 1995. The cellular C1 factor of the herpes simplex virus enhancer complex is a family of polypeptides. *J Biol Chem*. 270: 4387-4394.

Kristie TM, Vogel JL, Sears AE. 1999. Nuclear localization of the C1 factor (host cell factor) in sensory neurons correlates with reactivation of herpes simplex virus from latency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 1229-1233.

LaMarco K, McKnight S. 1989. Purification of a set of cellular polypeptides that bind to the purine-rich cis-regulatory element of herpes simplex virus immediate early genes. *Genes Dev.* 3:1372–1383.

Lehman IR, Boehmer PE. 1999. Replication of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem.* 274: 28059-28062.

Leib DA, Coen DM, Bogard CL, Hicks KA, Yager DR, Knipe DM, Tyler KL, Schaffer PA. 1989. Immediate-early regulatory gene mutants define different stages in the establishment and reactivation of herpes simplex virus latency. *J. Virol.* 63: 759–768.

Leib DA, Harrison TE, Laslo KM, Machalek MA, Moorman NJ, Virgin HW. 1999. Interferons regulate the phenotype of wild-type and mutant herpes simplex viruses in vivo. *J Exp Med.* 189: 663-672.

Liang SL, Quirk D, Zhou A. RNase L: its biological roles and regulation. 2006. *IUBMB Life.* 58: 508-514.

Lynas C, Laycock KA, Cook SD, Hill TJ, Blyth WA, Maitland NJ. 1989. Detection of herpes simplex virus type 1 gene expression in latently and productively infected mouse ganglia using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol.* 70: 2345-2355.

Lu R, Misra V. 2000. Zhangfei: a second cellular protein interacts with herpes simplex virus accessory factor HCF in a manner similar to Luman and VP16. *Nucleic Acids Res.* 28: 2446-2454.

Mador N, Goldenberg D, Cohen O, Panet A, Steiner I. 1998. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts suppress viral replication and reduce immediate-early gene mRNA levels in a neuronal cell line. *J Virol.* 72: 5067-5075.

Marin LM, Prada-Arismendy J, Castellanos JE. 2007. Changes in oligoadenylate synthetase, protein kinase R and RNaseL mRNA in trigeminal ganglia cultures infected by herpes simplex. *Brazilian oral research* 21, 348.

Massa PT, Whitney LW, Wu C, Ropka SL, Jarosinski KW. 1999. A mechanism for selective induction of 2'-5' oligoadenylate synthetase, anti-viral state, but not MHC class I genes by interferon-beta in neurons. *J Neurovirol.* 5: 161-171.

McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE, Taylor P. 1988. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol.* 69: 1531-1574.

Melroe GT, DeLuca NA, Knipe DM. 2004. Herpes simplex virus 1 has multiple mechanisms for blocking virus-induced interferon production. *J Virol.* 78: 8411-8420.

Melroe GT, Silva L, Schaffer PA, Knipe DM. 2007. Recruitment of activated IRF-3 and CBP/p300 to herpes simplex virus ICP0 nuclear foci: Potential role in blocking IFN-beta induction. *Virology.* 360: 305-321.

Mossman KL, Smiley JR. 2002. Herpes simplex virus ICP0 and ICP34.5 counteract distinct interferon-induced barriers to virus replication. *J Virol.* 76: 1995-1998.

Nicola AV, Hou J, Major EO, Straus SE. 2005. Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *J Virol.* 79: 7609-7616.

Pellett PE, Roizman B. 2007. The Family *Herpesviridae*: A Brief Introduction. En *Fields Virology*, Editors: Knipe DM, Howley PM. pp.2480-2450. Lippincott, Williams, and Wilkins. Philadelphia. USA.

Peng W, Henderson G, Inman M, BenMohamed L, Perng GC, Wechsler SL, Jones C. 2005. The locus encompassing the latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1 interferes with and delays interferon expression in productively infected neuroblastoma cells and trigeminal Ganglia of acutely infected mice. *J Virol.* 79: 6162-6171.

Perng GC, Jones C, Ciacci-Zanella J. *et al.* 2000. Virus induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science.* 287: 1500-1503.

Perng GC, Jones C. 2010. Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2010:262415.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.

Platanias LC. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* 5: 375-386.

Rey FA. 2006. Molecular gymnastics at the herpesvirus surface. *EMBO Rep.* 7: 1000-1005.

Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ. 2007. Herpes simplex viruses. En: *Fields Virology* Editors: Knipe DM, Howley PM pp. 2501–2602. Lippincott, Williams, and Wilkins. Philadelphia. USA.

Rusch L, Zhou A, Silverman RH. 2000. Caspase-dependent apoptosis by 2',5'-oligoadenylate activation of RNase L is enhanced by IFN-beta. *J Interferon Cytokine Res.* 20: 1091-1100.

Sacks WR, Schaffer PA. 1987. Deletion mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 exhibit impaired growth in cell culture. *J Virol.* 61: 829-839.

Sadler AJ, Williams BR. 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol.* 8: 559-568.

Samuel CE. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.* 14: 778-809.

Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med (Berl).* 84: 901-910.

Shen W, Sa e Silva M, Jaber T, Vitvitskaia O, Li S, Henderson G, Jones C. 2009. Two small RNAs encoded within the first 1.5 kilobases of the herpes simplex virus type 1

latency-associated transcript can inhibit productive infection and cooperate to inhibit apoptosis. *J Virol.* 83: 9131-9139.

Simpson SA, Manchak MD, Hager EJ, Krummenacher C, Whitbeck JC, Levin MJ, Freed CR, Wilcox CL, Cohen GH, Eisenberg RJ, Pizer LI. 2005. Nectin-1/HveC Mediates herpes simplex virus type 1 entry into primary human sensory neurons and fibroblasts. *J Neurovirol.* 11: 208-218.

Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A. 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol.* 136: 1007-1021.

Sokawa Y, Ando T, Ishihara Y. 1980. Induction of 2',5'-oligoadenylate synthetase and interferon in mouse trigeminal ganglia infected with herpes simplex virus. *Infect Immun.* 28: 719-723.

Song MM, Shuai K. 1998. The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem.* 273: 35056-35062.

Steiner I, Spivack JG, Lirette RP, Brown SM, MacLean AR, Subak-Sharpe JH, Fraser NW. 1989. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts are evidently not essential for latent infection. *EMBO J.* 8: 505-511.

Steiner I, Kennedy PG, Pachner AR. 2007. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurol.* 6: 1015-1028.

Svennerholm B, Ziegler R, Lycke E. 1989. Herpes simplex virus infection of the rat sensory neuron. Effects of interferon on cultured cells. *Arch Virol.* 104: 153-156.

Tal-Singer R, Podrzucki W, Lasner TM, Skokotas A, Leary JJ, Fraser NW, Berger SL. 1998. Use of differential display reverse transcription-PCR to reveal cellular changes during stimuli that result in herpes simplex virus type 1 reactivation from latency: upregulation of immediate-early cellular response genes TIS7, interferon, and interferon regulatory factor-1. *J Virol.* 72: 1252-12561.

Taylor TJ, Brockman MA, McNamee EE, Knipe DM. 2002. Herpes simplex virus. *Front Biosci.* 7:d752-d764.

Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. 2008. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature*. 454: 780-783.

Vlotides G, Sørensen AS, Kopp F, Zitzmann K, Cengic N, Brand S, Zachoval R, Auernhammer CJ. 2004. SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IFN-alpha-induced expression of the antiviral proteins 2,5-OAS and MxA. *Biochem Biophys Res Commun*. 320: 1007-1014.

Wang J, Campbell IL. 2005. Innate STAT1-dependent genomic response of neurons to the antiviral cytokine alpha interferon. *J Virol*. 79: 8295-8302.

Weir JP. 2001. Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene*. 271: 117-130.

Whitley RJ, Roizman B. 2001. Herpes simplex virus infections. *Lancet*. 357: 1513-1518

Yamada M, Arao Y, Hatano A, Uno F, Nii S. 1988. Effect of recombinant mouse interferon-beta on acute and latent herpes simplex infection in mice. *Arch Virol*. 99: 101-109.

Yang WC, Devi-Rao GV, Ghazal P, Wagner EK, Triezenberg SJ. 2002. General and specific alterations in programming of global viral gene expression during infection by VP16 activation-deficient mutants of herpes simplex virus type 1. *J Virol*. 76: 12758-12774.

Yokota S, Yokosawa N, Kubota T, Suzutani T, Yoshida I, Miura S, Jimbow K, Fujii N. 2001. Herpes simplex virus type 1 suppresses the interferon signaling pathway by inhibiting phosphorylation of STATs and janus kinases during an early infection stage. *Virology*. 286: 119-124.

Yokota S, Yokosawa N, Okabayashi T, Suzutani T, Miura S, Jimbow K, Fujii N. 2004. Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 contributes to inhibition of the interferon signaling pathway. *J Virol*. 78: 6282-6286.

Yokota S, Yokosawa N, Okabayashi T, Suzutani T, Fujii N. 2005. Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 confers efficient viral replication. *Virology*. 338: 173-181.

Yoshimura A, Naka T, Kubo M. 2007. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol*. 7: 454-465.

Zhou A, Hassel BA, Silverman RH. 1993. Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell*. 72: 753-765.