



R: 48.324

T.1

BID. T 3517

PROTEINAS P35 Y P60 DIFERENCIADORAS DE
VIRUS HERPES SIMPLEX TIPOS 1 Y 2:
IDENTIFICACION POR ANTICUERPOS MONOCLONALES

Memoria presentada por Doña
Concepción Gimeno Cardona para
optar al Grado de Doctor en Me
dicina.

Valencia, Enero de 1987

UMI Number: U602923

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U602923

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

D. JUAN GARCIA DE LOMAS BARRIONUEVO, Catedrático de -
Microbiología de la Universitat de Valencia,

CERTIFICA,

Que la Tesis doctoral titulada PROTEINAS P35 Y P60 DIFERENCIADORAS DE VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 1 Y 2: IDENTIFICACION CON ANTICUERPOS MONOCLONALES, presentada por Doña CONCEPCION GIMENO CARDONA, para optar al Grado de Doctor en Medicina ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Microbiología (Facultad de Medicina) de esta Universidad y reúne los méritos científicos para su presentación y defensa.

Y para que así conste, firmo el presente en Valencia a veintisiete de febrero de mil novecientos -- ochenta y siete.



Edo: Prof. J. Garcia de Lomas

Para la realización de esta
Tesis doctoral Doña Concepción --
Gimeno Cardona ha disfrutado de una
Beca concedida por la Caja de Aho--
rros de Valencia (Diciembre 1983 -
a Marzo de 1986).

A la realización de esta -
Tesis ha contribuido la ayuda econó-
mica procedente del Fondo de Investi-
gación Sanitarias de los proyectos -
nº 84/846 y nº 85/1230 titulados --
"Obtención de anticuerpos monoclonal-
es frente a Herpesviridae"

Mi afecto y gratitud al Prof. D. Juan Garcia de Lomas con y por quien inicié mi formación en el campo de la Microbiología. El, ha hecho posible el desarrollo de este trabajo.

A David Navarro por su inestimable amistad e incondicional apoyo ante las dificultades -- diarias.

A Javier Buesa, Juan José Vilata, Vicente -- Catalán y M^a Luisa Dolz por su colaboración.

A Chelo Reyes y M^a José Requena por su dedicación en la confección de este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio de -- Microbiología. Mi más sincero agradecimiento.

I N D I C E

I N D I C E

	Página
1.- INTRODUCCION _____	1
1.1.- Virus Herpes simplex _____	2
1.1.1.- Estructura del virus Herpes simplex _____	4
1.1.2.- Características viricas _____	7
1.1.3.- Genoma vírico _____	7
1.1.4.- Ciclo replicativo _____	9
1.1.5.- Glicoproteínas de membrana _____	13
1.1.5.1.- Estructura general y síntesis	13
1.1.5.2.- Función _____	17
1.1.5.3.- Codificación genética _____	19
1.1.5.4.- Características _____	19
1.1.5.4.1.- Complejo glicoproteico A/B	20
1.1.5.4.2.- Glicoproteína C _____	22
1.1.5.4.3.- Glicoproteína D _____	24
1.1.5.4.4.- Glicoproteína E _____	27
1.1.5.4.5.- Otras glicoproteínas _____	30
1.1.5.5.- Transporte intracelular de las glicoproteínas _____	34
1.1.6.- Proteínas no-glicosiladas de VHS	36

	página
1.1.7.- Respuesta inmunitaria frente a infecciones por VHS _____	43
1.1.7.1.- Infección primaria _____	43
1.1.7.2.- Infección recurrente _____	47
1.1.7.3.- Latencia vírica _____	49
1.1.7.4.- Anticuerpos frente a polipéptidos específicos tras la infección primaria y recurrente _____	50
1.2.- Anticuerpos monoclonales _____	52
1.3.- Estudios de virus Herpes simplex 1 y 2 con anticuerpos monoclonales _____	57
1.3.1.- Diagnóstico y tipado de los ais-- lamientos _____	57
1.3.2.- Análisis de las glicoproteínas ____	61
1.3.2.1.- Glicoproteína gC1 y gC2 _____	62
1.3.2.2.- Glicoproteína gD _____	65
1.3.3.- Variación antigénica entre cepas	69
1.3.4.- Propiedades electroforéticas e - inmunológicas de las glicoprotei- nas _____	72
1.3.5.- Protección frente a enfermedades	73

	página
2.- HIPOTESIS DE TRABAJO _____	80
3.- MATERIAL Y METODOS _____	82
3.1.- Antígenos utilizados (Herpes simplex tipos 1 y 2) _____	83
3.1.1.- Cepas utilizadas _____	83
3.1.2.- Propagación del virus en cultivos celulares _____	83
3.1.2.1.- Preparación de la monocapa de celulas Vero para la inocula- ción vírica _____	83
3.1.2.2.- Inoculación del virus en la - monocapa celular _____	86
3.1.3.- Titulación vírica. Determinación de la dosis infectante cincuenta (TCID50) _____	88
3.2.- Animales utilizados _____	91
3.2.1.- Características y procedencia ____	91
3.2.2.- Mantenimiento y ubicación _____	91
3.3.- Células de mieloma _____	93
3.3.1.- Línea celular utilizada. Caracte- rísticas _____	93
3.3.2.- Mantenimiento _____	95
3.3.3.- Preparación de las células pre- fusión _____	99
3.4.- Inmunización de animales _____	100
3.4.1.- Antígeno inmunizante _____	100
3.4.2.- Pauta de inmunización _____	100

	página
3.5.- Fusión celular _____	100
3.5.1.- Obtención linfocitos de bazo de animal inmunizado _____	100
3.5.2.- Células de mieloma P3x63 Ag.8.653	104
3.5.3.- Preparación de suspensiones celulares para la fusión _____	
3.5.4.- Adición del polietilenglicol (PEG)	105
3.5.5.- Obtención de macrófagos peritoneales _____	106
3.5.6.- Distribución de las células fusionadas en placas _____	107
3.6.- Selección de los híbridos _____	109
3.6.1.- Selección con medio HAT _____	109
3.6.2.- Incorporación del medio HT _____	109
3.7.- Selección de los clones productores de anticuerpos específicos _____	110
3.7.1.- Condiciones de detección de producción de anticuerpo monoclonal_	110
3.7.2.- Inmunofluorescencia indirecta ____	112
3.7.3.- Enzimoimmunoanálisis (ELISA) _____	115
3.7.3.1.- ELISA para detección de anticuerpos específicos _____	115
3.7.3.1.1.- Preparación del antígeno	115
3.7.3.1.2.- Normalización del antígeno	116
3.7.3.1.3.- Realización _____	116
3.7.3.2.- Enzimoimmunoanálisis para detectar producción de inmunoglobulinas _____	118

	página
3.8.- Clonado por dilución límite _____	120
3.9.- Conservación de los clones _____	121
3.9.1.- Congelación _____	121
3.9.2.- Descongelación _____	122
3.10.- Estudio de la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos. _____	122
3.10.1.- Preparación del extracto antigénico de proteínas de VHS _____	123
3.10.2.- Preparación de gel de poliacrilamida con SDS (SDS/PAGE) _____	125
3.10.3.- Tinción de PAS (Periodic-Acid-Schiff) de geles de poliacrilamida _____	129
3.10.4.- Transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa _____	130
3.10.5.- Enzimoimmunoanálisis sobre membrana de nitrocelulosa _____	132
3.10.6.- Cálculo de pesos moleculares _____	133
3.11.- Producción de anticuerpo monoclonal específico _____	133
3.11.1.- Cultivos de hibridomas en rotación _____	134
3.11.2.- Producción de ascitis en ratón Balb/c _____	134

	página
3.12.- Purificación y marcado del anticuerpo monoclonal específico _____	135
3.12.1.- Precipitación con sulfato amónico _____	138
3.12.2.- Cromatografía _____	139
3.12.2.1.- Cromatografía de filtración en gel _____	140
3.12.2.2.- Cromatografía de afinidad con Sepharosa unida a proteína A _____	142
3.12.3.- Marcado fluorescente _____	142
3.12.4.- Liofilización _____	143
3.13.- Caracterización de los anticuerpos monoclonales _____	144
3.13.1.- Especificidad _____	144
3.13.2.- Título _____	146
3.13.3.- Actividad específica _____	147
3.13.4.- Conservación y estabilidad _____	150
3.13.5.- Determinación de clase/subclase _____	151
3.13.5.1.- Inmunofluorescencia indirecta sobre las células del -- clon _____	151
3.13.5.2.- Inmunodifusión radial _____	152
3.13.6.- Monoclonalidad _____	156
3.13.7.- Capacidad neutralizante _____	157
3.13.8.- Aparición de las proteínas detectadas en células infectadas _____	158

	Página
4.- RESULTADOS _____	159
4.1.- Inmunización de animales _____	160
4.1.1.- Antígeno inmunizante _____	161
4.1.2.- Procedimientos de inoculación _____	164
4.2.- Agentes promotores de fusión _____	165
4.3.- Distribución de células postfusión en placas _____	168
4.4.- Detección de la producción de anti- cuerpos monoclonales específicos _____	170
4.4.1.- Enzimoinmunoanálisis (ELISA) _____	170
4.4.2.- Inmunofluorescencia indirecta (IFI) _____	172
4.5.- Propagación de los clones productores de anticuerpos específicos -- frente a VHS-1 y VHS-2 _____	176
4.6.- Caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos _____	177
4.6.1.- Especificidad de virus _____	177
4.6.2.- Título _____	178
4.6.3.- Actividad específica _____	178
4.6.4.- Estabilidad _____	178
4.6.5.- Clase y Subclase _____	179
4.6.6.- Especificidad de proteína _____	179
4.7.- Identificación de las proteínas de - 35.000 y 60.000 daltons en cepas - aisladas de pacientes al enfrentar-- las con sus sueros _____	181

	página
4.8.- Caracterización química de las proteínas de 35.000 y 60.000 daltons _____	182
4.9.- Aparición postinoculación de las proteínas identificadas _____	183
4.10.- Tipado de aislamientos víricos _____	184
4.11.- Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales 23G10 y 32D9 sobre frotis procedentes de lesiones herpéticas _____	188
4.12.- Capacidad neutralizante de los anticuerpos monoclonales (23G10 y 32D9) _____	190
4.13.- Estudio de la monoclonalidad de los anticuerpos 23G10 y 32D9 _____	190
4.14.- Purificación de los sobrenadantes y líquido ascítico de ratón Balb/c _____	191
4.15.- Tipado de los aislamientos víricos con los anticuerpos monoclonales obtenidos marcados con FITC _____	192
5.- DISCUSION _____	193
5.1.- Inmunización de los animales _____	194
5.2.- Fusión celular _____	197
5.3.- Distribución de las células postfusión	198
5.4.- Detección de la producción de anticuerpos monoclonales específicos _____	199
5.5.- Identificación inmunoquímica de las proteínas p35 y gp60 detectadas por los anticuerpos monoclonales 23G10 y 32D9 _____	200
5.6.- Diagnóstico y tipado de aislamientos de VHS (VHS-1 y VHS-2) con los anticuerpos monoclonales 23G10 y 32D9 _____	206

página

6.- CONCLUSIONES	_____	208
7.- BIBLIOGRAFIA	_____	212

Nota aclaratoria:

Los valores n exponentes de 10^{-n} aparecen en el texto como $10.n$

Los subíndices de CO_2 y $TCID_{50}$ aparecen en el texto al mismo nivel (CO_2 y $TCID_{50}$)

1.- INTRODUCCION

1.1.- Virus Herpes simplex

El virus Herpes simplex es un miembro de la familia Herpesviridae con características comunes con otros virus de la misma familia.

La familia Herpesviridae está constituida - por desoxirribovirus de simetría icosaédrica con una membrana de envoltura y de un tamaño que oscila entre 120 y 200 nanómetros de diámetro.

Estructuralmente pueden distinguirse en -- ellos del interior al exterior un centro ó nucleoide central compuesto de ADN lineal bicatenario y proteínas, una cápside icosaédrica con 162 capsómeros y una doble envoltura de naturaleza lipoproteica derivada - de la membrana nuclear de la célula huésped (lámina - interna).

Los Herpesvirus infectan a las células eucarióticas, afectando tanto a los vertebrados de sangre fría como caliente, y en general poseen una reducida especificidad de huésped.

El ciclo de replicación se inicia con la - adsorción de la membrana de envoltura a los recepto-- res de la membrana citoplásmica de la célula huésped, penetrando las nucleoproteínas que son transportadas al núcleo de la célula donde tiene lugar la replica-- ción del ADN y el ensamblado de las nucleocápsides.

Se han descrito más de 90 Herpesvirus con - características morfológicas y bioquímicas similares a las descritas. De ellos, cincuenta y ocho se clasifican en tres grupos ó subfamilias, no estando clasificados todavía los restantes (MATTHEWS, 1982) y sólo cinco producen patología humana.

La clasificación de los Herpesvirus(ROIZMAN, 1982) está basada en los siguientes parámetros:

- . Células huésped in vitro, en las que pueden repli-- carse.
- . Tipo de multiplicación.
- . Capacidad de producir un ciclo lítico en las célu-- las huéspedes.
- . Comportamiento in vivo

Se reconocen tres grupos ó subfamilias de Herpesviridae y dentro de cada una de ellas se incluyen distintos virus, de los que reseñaremos aquellos que interesan desde el punto de vista humano.

Subfamilia Alphaherpesvirinae

- . Virus Herpes simplex tipo 1 (VSH-1)
- . Virus Herpes simplex tipo 2 (VSH-2)

Estos Herpesviridae pueden replicarse en una variedad amplia de cultivos celulares dando lugar a viriones infectantes. Tienen predilección por los tejidos ectodérmicos in vitro, e in vivo dan lugar a latencia ganglionar.

- . Virus Varicella-zoster (VVZ)

Se multiplican más lentamente y en muy pocas líneas celulares, como los fibroblastos o las células de riñón de mono verde africano. También dan lugar al fenómeno de latencia y poseen neurotropismo.

Subfamilia Betaherpesvirinae

- . Citomegalovirus (CMV)

Virus con una replicación muy lenta, y con capacidad restringida para multiplicarse in vitro en los cultivos celulares de células fibroblásticas, siendo linfotrópicos in vivo.

Subfamilia Gammaherpesvirinae

- . Virus de Epstein - Barr (VEB)

Virus linfotrópico y con capacidad de inmortalizar las células, causando enfermedades linfoproliferativas en huéspedes naturales.

1.1.1.- Estructura del virus Herpes simplex

La partícula vírica completa mide aproximadamente entre 180 y 200 nanómetros de diámetro y está integrada por:

- Una estructura cilíndrica central, denominada centro ó nucleoide central (core) compuesta por ADN lineal bicatenario.
- Una cápside icosaédrica de aproximadamente 85 a 100 nanómetros de diámetro, que está formada por 162 capsómeros, siendo 12 de ellos de morfología pentagonal y 150 de morfología hexagonal. Estos capsómeros miden entre 9.5 y 12.5 nanómetros, presentando un orificio central de aproximadamente 4 nanómetros de diámetro (REICHMAN, 1985).
- Una zona granular ó tegumento que rodea la cápside, de textura irregular compuesta de proteínas globulares.
- Una membrana envolvente, derivada de la lámina interna de la membrana nuclear de la célula huésped (BEN-PORAT y KAPLAN, 1972). Es una membrana que en microscopía electrónica aparece como una estructura trilaminar análoga estructuralmente a la existente en las membranas celulares.
- Espículas proyectadas fuera de la membrana, de 8 a 10 nanómetros de longitud y que pueden observarse por tinción negativa. Aparecen cada 5 nanómetros y corresponden a las glicoproteínas víricas específicas (SPRING et al. 1968).

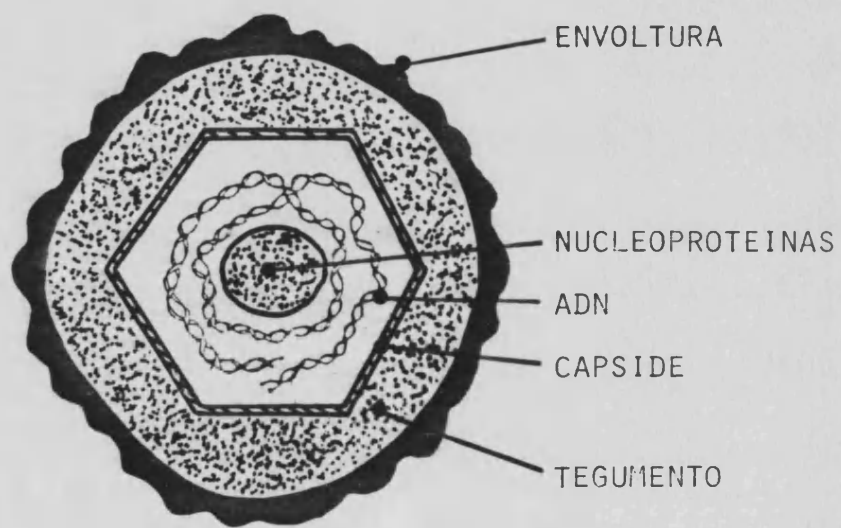


Fig. 2.- Virus Herpes simplex. Esquema señalando las estructuras del mismo.

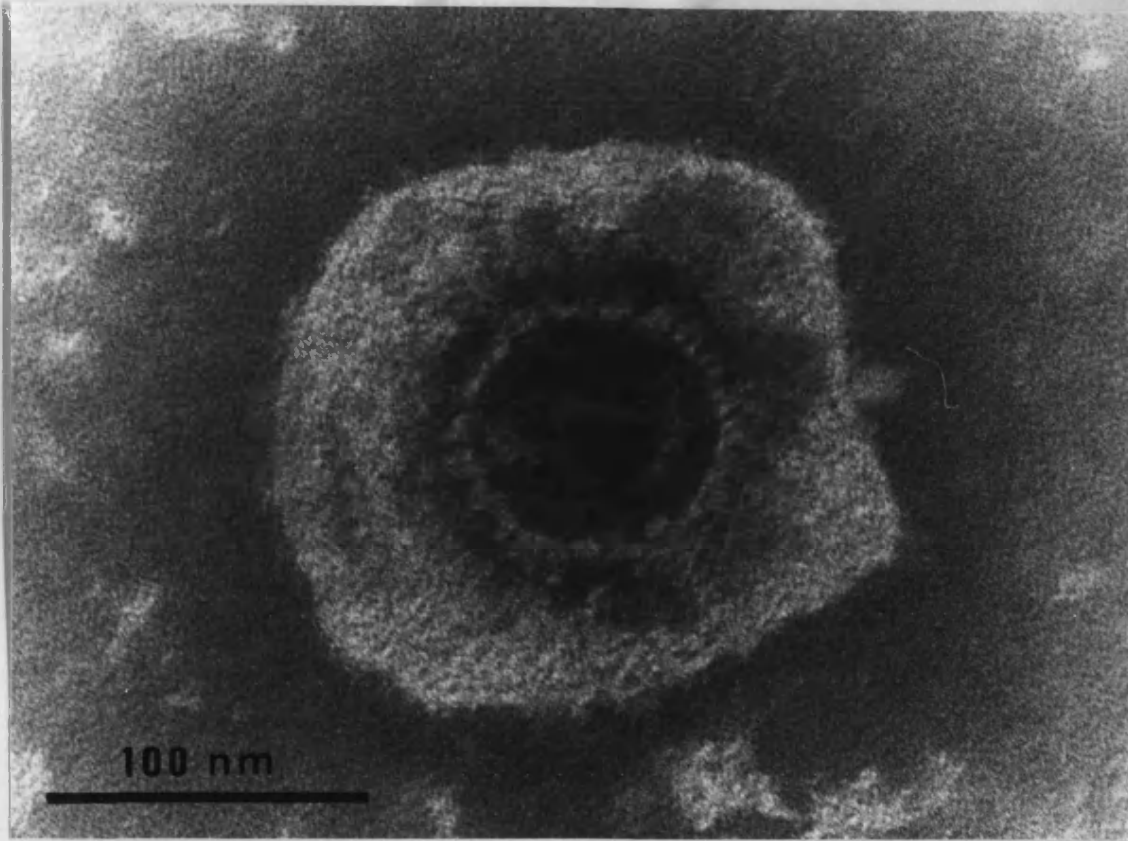


Fig. 1.- Virus Herpes simplex observado al microscopio electrónico (ME).

1.1.2.- Características víricas

Como todos los virus con envoltura, los Herpesvirus son muy sensibles a la acción de los detergentes externos, inactivándose rápidamente a temperatura ambiente y por la acción del calor, radiaciones ultravioletas, éter, cloroformo, alcohol y antisépticos (DREW y RAWLS, 1985). En cambio estos virus son moderadamente resistentes a la desecación. Para preservar su infectividad deben conservarse a -70°C .

La fragilidad del virus en el medio ambiente explica que la transmisión se realice por mecanismos directos, aunque experimentalmente se haya demostrado la posibilidad de su transmisión por objetos contaminados, aun no probado en condiciones naturales (FIFE y COREY, 1984).

1.1.3.- Genoma vírico

El ADN vírico es lineal bicatenario con un cociente G+C muy elevado (68 a 70%), comparado con los Betaherpesvirinae (50 a 60%), ó con los Gammapherpesvirinae (33 a 59%) (WILDY, 1985).

Posee un peso molecular de 96×10.6 daltons y unos 154.000 pares de bases (ROIZMAN, 1979).

Los ácidos nucleicos de los virus Herpes simplex tipo 1 y Herpes simplex tipo 2 presentan aproximadamente un 50% de analogías en sus bases (secuencias homólogas).

Las características del ADN del virus Herpes simplex tipo 1 y tipo 2 son según RAPP (1984) las siguientes:

Características	VSH-1	VSH-2
Peso molecular	99×10.6	99×10.6
Densidad en ClCs (g/cm.3)	1.726	1.728
Porcentaje guanina + citosina (%)	67	69
Homología (%)	47 a 50	47 a 50

La molécula de ADN está integrada por dos componentes, uno largo (L) y otro corto (S) que comprenden respectivamente el 82% y el 18% del genoma vírico.

Cada uno de los componentes contiene secuencias víricas de nucleóticos denominados UL (única grande) y US (única pequeña), que están delimitadas por regiones pequeñas invertidas y repetitivas.

Las secuencias que delimitan el componente L se designan como ab y b'a y las que delimitan el componente S como a'c' y ca. La secuencia a es siempre terminal (REICHMAN, 1985).

Las regiones UL y US pueden invertir relativamente el orden, dando lugar a cuatro posibles poblaciones genómicas que difieren sólo en la orientación de esas regiones (SHELDRIK y BERTHELOT, 1973).

Ha sido demostrado que el ADN extraído de las cepas salvajes está formado por concentraciones equimolares de los cuatro tipos (ROIZMAN, 1979).

El uso de mutantes víricas sensibles a la temperatura ha permitido conocer algunos de los genes víricos y los productos codificados por ellos.

Los genes de mayor importancia son aquellos que codifican la ADN-polimerasa, la enzima timidina-kinasa, las glicoproteínas mayores de la envoltura y posiblemente aquellas que condicionen la transformación vírica (oncogenes).

La mayoría de estos genes han sido identificados mediante endonucleasas de restricción y el clonado posterior del ADN (DREW y RAWLS, 1985).

1.1.4.- Ciclo replicativo

El ciclo replicativo ha sido muy estudiado en cultivos celulares habiéndose constatado las siguientes fases:

- . Fijación
- . Pinocitosis/Fusión de vesícula
- . Transcripción nuclear (ARNp-ADNd celular)
- . Translación
 - . Péptidos precoces inmediatos _ Alfa
 - . Péptidos precoces _____ Beta

ADNp/Timidina kinasa/ADNasa

- . Síntesis de ADN
- . Transcripción tardía
- . Translación
 - . Péptidos tardíos _____ Gamma
- . Ensamblado nuclear
- . Gemación por membrana nuclear
- . Salida de la célula

La penetración de los viriones en las células susceptibles tiene lugar cuando la envoltura vírica se une con la membrana plasmática de las células, penetrando la cápside en el citoplasma, aunque a veces el virion íntegro puede penetrar directamente en el citoplasma. Una vez dentro del citoplasma ocurre la decapsidación y el ADN vírico penetra en el núcleo, teniendo lugar la transcripción del genoma del VHS que ocurre en 3 fases (ROIZMAN, 1974):

En la fase 1 ocurre una transcripción, que está mediada por las proteínas de la célula huésped, aisladamente ó quizás en asociación con las proteínas víricas.

En la fase 2 ocurre una transcripción mediada por proteínas que han sido sintetizadas después de la infección de la síntesis de ADN.

En la fase 3 ocurre una transcripción de acople a la iniciación de la síntesis de ADN.

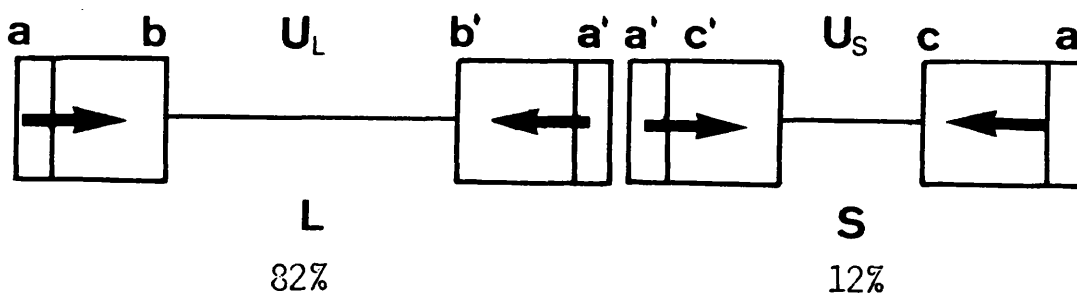


Fig. 3.- Genoma de virus Herpes simplex.

Estas 3 fases de la transcripción tienen como resultado la producción de ARN-mensajero que da lugar a la síntesis de 3 grupos de polipéptidos alfa, gamma y beta. La síntesis de proteínas víricas ocurre en el citoplasma y los tres grupos de proteínas aparecen secuencialmente. Las proteínas alfa y beta son proteínas no estructurales y las gamma son proteínas estructurales.

El proceso de síntesis de las proteínas está estrechamente regulado, denominándose regulación en cascada como un modelo de expresión genómica (HONNESS, 1974). Esta regulación depende de la comunicación molecular entre el núcleo y el citoplasma de la célula infectada.

El ARN-mensajero para las proteínas alfa es transcrito muy pronto tras la infección, dando lugar a la producción de proteínas-alfa en el citoplasma. Los alfa polipéptidos son sintetizados entre las 2 y 4 horas postinoculación, son fosforilados y transportados al núcleo. La presencia de proteínas-alfa parece ser el promotor para la transcripción del ARN-mensajero de las proteínas-beta, que inhibe la transcripción del ARN-mensajero alfa y comienza la síntesis de ADN vírico. Las proteínas beta alcanzan su síntesis máxima a las 5 ó 7 horas tras la infección y son la timidina-kinasa vírica y la ADN-polimerasa, que participan en la síntesis del ADN.

Trás la iniciación de la síntesis del ADN vírico, comienza la producción de proteínas-gamma y a su vez esta producción de proteínas-gamma inhibe la síntesis de proteínas beta. Los gamma-polipéptidos se sintetizan entre las 12 y 15 horas postinoculación, y representan los componentes estructurales de la partícula vírica.

El ensamblado de las proteínas para formar el core tiene lugar en el núcleo, saliendo posteriormente el virion del mismo, arrastrando parte de la membrana nuclear, y formándose así la envoltura vírica.

El virus puede permanecer en la célula durante algún periodo, pero es más frecuente que salga de la célula en forma de vacuola ó sea liberado en el proceso de la lisis celular.

El ciclo replicativo vírico completo dura aproximadamente 15 horas y da lugar a la producción de una partícula infecciosa por cada 100 o 1000 partículas que se producen.

Entre las proteínas no-estructurales codificada por el ADN del VHS está la ADN-polimerasa y la timidina-kinasa. La inhibición de la función de estas enzimas es un método eficaz de quimioterapia antivírica.

1.1.5.- Glicoproteínas de membranas

1.1.5.1.- Estructura general y síntesis

Herpes simplex presenta glicoproteínas como componentes estructurales. Estas glicoproteínas han sido caracterizadas en los viriones purificados, habiéndose estudiado su biosíntesis en las células infectadas e inferidas sus funciones a partir de mutantes, estudios con antimetabolitos (PIZER et al. 1980) o estudios con anticuerpos monoclonales.

Se describieron inicialmente cuatro glicoproteínas con un rango de peso molecular entre 50.000 y 130.000 daltons (50.000, 60.000, 110.000 y 130.000). SPEAR en 1976 designó a las tres glicoproteínas con un peso molecular próximo a 130.000 como gA, gB y gC y a la glicoproteína de 60.000 daltons como gD.

Esta terminología fué aceptada provisionalmente en la Reunión sobre virus Herpes que tuvo lugar en Cold Spring Harbor (PIZER et al. 1980).

Posteriormente se describió la existencia de otra glicoproteína de 80.000 daltons de peso molecular, denominada gE, identificándose como el receptor para la fracción Fc de las inmunoglobulinas que aparecen en las células infectadas por Herpes (BAUCKE y SPEAR, 1976).

Las glicoproteínas mayores presentes en el virión fueron designadas como proteínas víricas VP7, VP8, VP.8.5, VP19E, correspondiéndose con proteínas glicosiladas procedentes de un lisado de células infectadas y denominadas B2, C2, A, D2 (SPEAR, 1976). Estas glicoproteínas víricas han sido designadas como B, C, A y D respectivamente (RUYECHAN et al. 1979).

Las células al ser infectadas por el VHS adquieren una nueva antigenicidad específica, que viene dada por la expresión a nivel de su membrana plasmática de estas glicoproteínas víricas.

Los estudios con anticuerpos citolíticos han demostrado que los viriones y las células infectadas muestran antígenos comunes. Las glicoproteínas del VHS están presentes, no sólo en los viriones, sino también en las células infectadas, tanto en su forma final como en forma de sus precursores (SPEAR, 1976; HONESS y ROIZMAN, 1975). Además, las glicoproteínas de la membrana plasmática no pueden diferenciarse con respecto al número y movilidad electrofóretica de las presentes en el virión (SPEAR y ROIZMAN, 1972; SPEAR, 1976). Específicamente, existe una correlación excelente entre el título de anticuerpos neutralizantes y citolíticos en el suero humano de convalecientes y en el suero de conejo hiperinmune (ROIZMAN y SPRING, 1967).

La unión de un suero inmune con viriones parcialmente purificados da lugar a la adsorción de los anticuerpos con actividad citolítica, mientras que la unión de suero inmune con membranas purificadas de células infectadas disminuye la capacidad neutralizante del suero (ROANE y ROIZMAN, 1964).

Otra serie de experiencias demostraron la incorporación de glicoproteínas víricas en la membrana celular durante el ciclo replicativo vírico (HEINE et al. 1972).

CAMPADELLI-FIUME et al. (1982) describieron la existencia en las células infectadas por VHS, tanto de formas glicosiladas de las glicoproteínas (gA/B, gC, gD, gE) como de sus precursores parcialmente glicosilados (pgB, pgC, pgD y pgE).

Las glicoproteínas se componen de residuos amino (péptidos) y cadenas laterales de carbohidratos (oligosacaridos) unidas por dos tipos de enlaces principales:

- enlace N-glicosídico
- enlace O-glicosídico

Las uniones del tipo N-glicosídico tienen lugar entre la N-acetilglucosamina y la asparragina. El carbono anomérico de la N-acetilglucosamina se une glicosídicamente (unión beta) al grupo amino de la asparragina.

Durante la síntesis de las glicoproteínas a través de los enlaces N los oligosacáridos con elevado contenido en manosa son sintetizados sobre el - dolicol, comenzando por la N-acetilglucosamina y entonces son transferidos en bloque al polipéptido naciente (HUBBARD e IVATT, -1981).

Los enlaces O-glicosídicos son uniones covalentes de N-acetilgalactosamina a la serina o la - treonina. En este tipo de enlace, el carbono anomérico de la N-acetilgalactosamina se une glicosídicamente por una unión alfa al grupo hidróxilo de la serina o de la treonina.

En contraste con la unión N-glicosídica, - la síntesis de estas glicoproteínas con enlaces -- O-glicosídicos acontece por la adición secuencial de los carbohidratos al polipéptido naciente (WENSKE y - COURTNEY, 1983).

Las cadenas oligosacarídicas presentes en las glicoproteínas del VHS son de dos clases:

- Cadenas neutras ricas en manosa y con N-acetilglucosamina.
- Cadenas tipo ácido complejo con una parte central de oligomanosilo y una periférica de ácido - siálico-galactosa-acetilglucosamina (EISENBERG et al. 1979; COHEN et al. 1980; PIZER et al. 1980).

Los oligosacáridos neutros están presentes en los precursores de las glicoproteínas, mientras - que las cadenas de tipo ácido predominan en las formas maduras de las glicoproteínas (PERSSON et al. -- 1982).

Se tienen conocimientos escasos sobre las glicosiltransferasas implicadas en la glicosilación de las glicoproteínas de VHS.

Todavía no está del todo aclarado si las - enzimas que participan en las glicosilación son codificadas por las células ó al menos en parte por el - propio virus.

Utilizando células mutantes, con glicosiltransferasas defectivas, ha podido investigarse sobre este punto, ya que si las glicoproteínas víricas son glicosiladas por enzimas codificadas por las células infectadas, cualquier defecto ó alteración en tales enzimas, sería reflejado en dichas glicoproteínas.

CAMPADELLI-FIUME et al. (1982) han demostrado de esta forma que la glicosiltransferasa F celular participa en la biosíntesis de las cadenas oligosacarídicas de las glicoproteínas del virus Herpes simplex.

No ha podido confirmarse todavía si las otras glicosiltransferasas existentes en la célula infectada por VHS son de origen vírico ó celular. Sin embargo, se han observado alteraciones en las propiedades cinéticas y en la especificidad del aceptor, entre la galactosil y sialiltransferasas de las células infectadas y no-infectadas (OLOFSSON et al. 1980).

La adición de oligosacáridos con enlace O a los polipéptidos con residuos serina o treonina se realiza en presencia de tunicamicina (HOLMES et al. 1981). La tunicamicina es un antibiótico que inhibe la producción de N-acetil-glucosamina-pirofosfordicol (HEIFETZ et al. 1979; NORRILD y PEDERSON, 1982) que corresponde al primer paso en la síntesis del enlace lípido-oligosacárido.

Dicho antibiótico puede usarse para inhibir específicamente la síntesis de los enlaces N-oligosacáridos sin inhibir la adición de enlaces O-oligosacáridos a las glicoproteínas (HOLMES et al. 1981), demostrándose de ese modo que las glicoproteínas gA, gB y gC presentan el enlace N-oligosacárido (CAMPADELLI-FIUME et al. 1982).

El procesamiento de las glicoproteínas puede estudiarse utilizando la monesina. La monesina es un polieter capaz de equilibrar los niveles de Na^+/K^+ , mostrando selectividad por el Na^+ .

Inhibe el transporte de las glicoproteínas desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática, definiendo un defecto en el procesamiento de las glicoproteínas, de unas a otras (UCHIDA et al. 1979).

Se ha descrito que la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular es completamente procesada en presencia de monesina, sin embargo, no es transportada a la membrana plasmática. En contraste, la síntesis de la glicoproteína E2 fué inhibida junto con la migración a la membrana plasmática (JOHNSON y SCHESINGER, 1980).

WENSKE et al. (1982) han descrito un acúmulo de precursores de glicoproteínas de Herpes simplex ricas en manosa como la pgC (105.000 daltons) y la gA en las células tratadas con monesina, así como una disminución concomitante de las glicoproteínas gB y gC, interfiriendo pues en el fraccionamiento biosintético de dichas glicoproteínas, que según JOHNSON y SPEAR (1982) no es esencial para la infectividad del virus Herpes simplex.

La 2-deoxiglucosa y la glucosamina inhiben la fusión celular provocada por un mutante sincitial del virus Herpes simplex e inhiben también la glicosilación de las glicoproteínas víricas en las células infectadas. La correlación entre la fusión y la glicosilación en presencia de 2-deoxiglucosa, glucosamina y manosa sugieren que la fusión celular no tiene lugar si las glicoproteínas poseen un contenido reducido en carbohidratos (KNOWLES et al. 1976).

1.1.5.2.- Función

Las glicoproteínas víricas representan los antígenos diana para las reacciones inmunitarias frente al virus como la neutralización vírica (EBERLE y COURTNEY, 1980), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (NORRILD et al. 1979) y la citotoxicidad celular mediada por células T (EBERLE y COURTNEY, 1980).

Las glicoproteínas de la envoltura vírica juegan un papel importante en la adsorción y en la penetración del virión en las células huéspedes. Cuando estas glicoproteínas se encuentran en la membrana de la célula infectada modulan la interacción entre las células en cultivo.

El descubrimiento de cepas VHS carentes en determinadas glicoproteínas ha permitido intuir su función. Es conocido que la mayoría de las cepas de VHS aisladas forman agregados de células redondeadas infectadas. Sin embargo también han sido aisladas cepas de VHS que fusionan las células infectadas, dando lugar a policariocitos ó sincitios (HOGGAN y ROIZMAN, 1959, citado por PEREIRA, 1984). Sin embargo, la cepa de VHS-1 (MP), deficitaria en glicoproteína C, también da lugar a la fusión de las células infectadas, lo que ha permitido conocer que dicha glicoproteína no es necesaria para provocar la infectividad del virus, debido a que estas mutantes son infecciosas (RUYECHAN et al. 1979).

La cepa mutante de VHS-1 ts B5 (temperatura sensible) no sintetiza glicoproteína gB a determinada temperatura, siendo capaz de adsorberse pero no de penetrar en la célula por lo que ello induce a pensar que tiene una función importante en dicho proceso (SARMIENTO et al. 1979).

MANSEVIRGI et al. (1977) con cepas recombinantes por un cruce genético entre una cepa mutante deficitaria en glicoproteína gC y una cepa sensible a temperatura para la glicoproteína gB realizaron estudios que indican que dichas glicoproteínas interactúan durante la infección.

Si la fusión sucede sólo con la cepa temperatura sensible cuando produce gB, este dato sugiere que dicha glicoproteína promueve la fusión celular, mientras que la glicoproteína gC inhibe dicha fusión.

BAUCKE y SPEAR (1976) identificaron una glicoproteína gE como el posible receptor de la fracción Fc de las inmunoglobulinas.

La función de la glicoproteína gD permanece desconocida. Sin embargo, esta glicoproteína se produce en grandes cantidades durante la infección y parece que es un poderoso inductor de anticuerpos neutralizantes (EISENBERG et al. 1982).

1.1.5.3.- Codificación genética

Los estudios de localización de los genes que codifican las glicoproteínas víricas, han demostrado que no ocupan zonas contiguas en el mapa físico del ADN del VHS (RUYECHAN et al. 1979).

Han sido utilizados dos métodos para realizar estos estudios. El primero está basado en la observación de que los lugares de clivaje con endonucleasas de restricción entre VHS-1 y VHS-2 son diferentes y que algunos polipéptidos y glicoproteínas de las células infectadas tienen propiedades electroforéticas diferentes (MORSE et al. 1978).

El análisis del ADN recombinante de VHS-1 y VHS-2 indica que los genes que codifican las glicoproteínas gA y gB se encuentra entre las unidades -- 0.30 y 0.42, mientras que los genes que codifican la glicoproteína gD se encuentran entre las unidades -- 0.90 y 0.95 (RUYECHAN et al. 1979).

Los genes que codifican la glicoproteína - gC no son colineales en el VHS-1 y VHS-2. En el VHS-1 están localizados entre las unidades 0.530 y 0.645, - mientras que en el VHS-2 están situados entre 0.645 y 0.690 (RUYENCHAN et al. 1979).

1.1.5.4.- Características

En 1978 en el Herpes Workshop celebrado en Cambridge (England)) se aceptó de forma provisional una nueva nomenclatura a propuesta de SPEAR (1976) - denominándose A, B, C y D a las glicoproteínas mayores y pA, pB, pC y pD a sus precursores.

Actualmente es admitido que el virus Herpes simplex tipos 1 y 2 presentan un mínimo de cinco glicoproteínas de codificación vírica designadas como gB/gA, gC, gD y gE.

Las glicoproteínas gB, gD y gE, poseen una movilidad electroforética idéntica tanto para VHS-1 - como para VHS-2 y las regiones génicas que las codifican son colineales en ambos tipos de virus (PARA et al. 1983).

A continuación haremos una descripción de cada una de estas glicoproteínas según los conocimientos que actualmente se dispone de ellas.

1.1.5.4.1.- Complejo glicoproteico gA/gB

La glicoproteína gB posee un peso molecular aparente de 126.000 daltons y es uno de los componentes glicoproteicos de VHS, tanto de tipo 1, como de tipo 2.

Sabemos que Herpes simplex induce la fusión celular como consecuencia de un complicado proceso - gobernado por productos víricos capaces de inducir la fusión de las membranas (HAFFEY y SPEAR, 1980).

Esta fusión no es más que la formación de - policariocitos, y es un tipo de efecto citopático - asociado frecuentemente con la infección por ciertas cepas de VHS. La capacidad de producir sincitios es - variable y así algunas cepas solo provocan un redon-- deamiento de las células infectadas (WATSON et al. -- 1966).

Los estudios con glicosilasas, lectinas y - antisueros dirigidos frente a la cubierta ó a las pro-- teínas de la cápside de VHS sugerían que el factor - responsable de la fusión de Herpesvirus es una glico-- proteína glicosilada que no sería un componente es-- tructural del virion (LEVITAN y BLOUGH, 1976).

Los estudios con una mutante temperatura - sensible (ts) denominada VHS-1 (HFEM) ts B5 y de vi-- rus recombinantes ts obtenidos de un cruzamiento en-- tre la cepa ts B5 de VHS-1 (HFEM) y la cepa sincitial no-temperatura sensible MP de VHS-1, muestran que la ausencia de formas maduras de gB a la temperatura res-- trictiva se correlaciona con una infectividad reduci-- da de los viriones y con su incapacidad para producir fusión celular respectivamente (SARMIENTO et al. -- 1979).

Además se han asociado otras alteraciones - fenotípicas con la mutación ts B5. Una de estas alte-- raciones es que los viriones producidos a la tempera-- tura permisiva presentan mayor termolabilidad y que - además son incapaces de acumular la forma dimérica - estable de gB que aparece como característica de las cepas salvajes de VHS-1 (HAFFEY y SPEAR, 1980).

HAFNEY y SPEAR (1980) demuestran que el acúmulo de viriones infectantes a distintas temperaturas, tanto cuando se replica en las células Vero, como cuando lo hace en Hep-2, está estrechamente relacionado con el acúmulo de la forma madura de gB y que la capacidad de una cepa vírica para ser infectante, no está asociada con la capacidad de acumular la forma dimérica de gB.

De estas experiencias se deduce que la proteína gB es uno de los productos requeridos en la cubierta vírica para la infectividad (LITTLE et al. 1981) y en la membrana de la célula infectada para la inducción de la fusión celular.

La glicoproteína A, de peso molecular aparente 119.000 daltons, aparece también en la envoltura vírica y en la membrana de las células infectadas y era denominada anteriormente VP8.

Utilizando una combinación de electroforesis en gel de poliacrilamida y de cromatografía en columna con dodecil sulfato de hidroxapatita, EBERLE y COURTNEY (1980), separaron y purificaron la gA de la gB a partir de células infectadas por VHS-1.

Con estos antígenos purificados obtuvieron un suero específico frente a cada una de las dos glicoproteínas. La inmunoprecipitación de los extractos celulares y de los antígenos purificados mostró que el suero anti-gA y el suero anti-gB reconocían ambas glicoproteínas.

El suero anti-gA poseía capacidad neutralizante a pesar de las cantidades mínimas de gA existente en los viriones.

Los estudios con pulsos de marcados muestran que las glicoproteínas gA y gB son sintetizadas a partir de un precursor polipeptídico común.

Estos datos demuestran que las glicoproteínas gA y gB del virus Herpes simplex tipo 1 son antigénicamente similares pero no idénticas y probablemente representan dos formas diferentes del mismo polipéptido que difieren en su grado de glicosilación (EBERLE y COURTNEY, 1980).

PEREIRA et al. (1982) informaron que las glicoproteínas gA y gB de VHS-1 y VHS-2 no pueden diferenciarse mediante anticuerpos monoclonales tipo-

específicos ó tipo comunes.

22.-

Comparando las glicoproteínas de VHS-1 y VHS-2, se ha comprobado que las glicoproteínas gA y gB de VHS-1 y VHS-2 presentan muchas propiedades inmunológicas y bioquímicas semejantes, siendo colinear la porción de genoma que las codifica.

Las glicoproteínas gA y gB de VHS-2 pueden encontrarse en una forma multimérica, al igual que la glicoproteína gC (EBERLE y COURTNEY, 1982).

La glicoproteína gB de VHS-1 extraída de viriones es una proteína dimérica (SARMIENTO et al. 1979), con 903 aminoácidos, con un dominio terminal proyectado extracelularmente conteniendo seis lugares potenciales para la N-glicosilación, afectando a las mutaciones ó la reactividad con anticuerpos monoclonales.

Esta glicoproteína presenta además un dominio hidrofóbico formado por tres segmentos y un dominio cargado positivamente proyectándose hacia el interior de la membrana (PELLET et al. 1985).

PELLET et al. (1985) demostraron que el virus de Epstein-Barr (VEB) codifica una proteína similar en estructura y función a la glicoproteína gB de VHS-1.

1.1.5.4.2.- Glicoproteína C

En los primeros estudios que se realizaron sobre la glicoproteína gC, era considerada un complejo de 126.000 a 130.000 daltons junto con las glicoproteínas gA y gB, ya que son proteínas de difícil resolución mediante electroforesis en geles de poli-acrilamida-dodecil sulfato sódico (SPEAR, 1976).

SPEAR (1976) resolvió en parte este problema absorbiendo un antisuero que reconocía el complejo de glicoproteínas de 130.000 daltons con un extracto de células infectadas con la cepa MP de VHS-1, mutante que no expresa glicoproteína gC. De esta forma obtuvo un antisuero capaz de detectar gC como una molécula de 110.000 daltons. Posteriormente fue demostrado que esta glicoproteína era el precursor (pgC) de la glicoproteína gC de 130.000 daltons (COHEN et al. 1980).

La pgC es una molécula glicoproteica básica y en el procesamiento hacia gC cambia su peso molecular y su carga, en parte por la adición de ácido siálico.

Las glicoproteínas gC de VHS-1 y VHS-2 son distintas tanto en sus propiedades bioquímicas como inmunológicas a pesar de que su peso molecular es semejante, estando codificadas además en regiones distintas del genoma vírico (RUYECHAN et al. 1979).

Por otra parte glicoproteína gC de VHS-2 en contraste con la gC de VHS-1, puede encontrarse en forma multimérica en la célula infectada (RUYECHAN et al. 1979; EBERLE y COURTNEY, 1982).

BALACHANDRAN et al. (1981) obtuvieron un anticuerpo monoclonal que reaccionaba con una glicoproteína de VHS-2 de 80.000 daltons de peso molecular, a la que denominaron gF y el genoma que lo codifica está localizado en una región colinear a la que codifica la glicoproteína gC del VHS-1.

PARA et al. (1983) obtuvieron otro anticuerpo monoclonal que reaccionaba con la misma glicoproteína.

ZEZULAK y SPEAR (1983) mostraron que la glicoproteína C de 130.000 daltons de peso molecular de VHS-1 y la glicoproteína gC de 75.000 daltons de VHS-2, denominada gF, son moléculas antígenicamente relacionadas y sus genes se encuentran localizados en regiones equivalentes.

ZWEIG et al. (1984) confirmaron posteriormente estos resultados demostrando que los anticuerpos frente a la secuencia de aminoácidos de gC, del 128 al 139, poseen reacciones cruzadas con la gF de VHS-2.

PARA et al. (1983) confirmaron que el genoma que codifica la glicoproteína gF de VHS-2 se encuentra localizado entre las regiones de 0.62 a 0.64 unidades mápicas.

SWAIN et al. (1985) caracterizaron el gen que codifica la glicoproteína gC de VHS-1 localizado en la región del genoma vírico que va de 0.62 a 0.64 unidades mápicas.

ZEZULAK y SPEAR (1983) basándose en la relación antigénica entre la colinealidad del genoma de la glicoproteína gC de VHS-1 y gF de VHS-2 propusieron que la gF de VHS-2 debía ser denominada como VHS-2 gC ó gC-2.

La proteína designada anteriormente como gC-2 (130K) y cuyos genes están localizados en la región corte del genoma de VHS-2 ha sido red denominada como gG-2 (ROIZMAN et al. 1984).

La gC-2 presenta un precursor de 60.000 daltons de peso molecular.

Las cinéticas de aparición de gC-1 y gC-2 en las células infectadas indican que estas proteínas pueden ser detectadas en las células marcadas entre las 3 y 5 horas postinfección.

1.1.5.4.3.- Glicoproteína gD

La glicoproteína gD de virus Herpes simplex (VHS) es un componente estructural tipo común de la membrana virica (COHEN et al. 1978; SPEAR, 1976).

La glicoproteína gD purificada de VHS-1 (gD-1) estimula la aparición de títulos elevados de anticuerpos neutralizantes tipo comunes (COHEN et al. 1978; COHEN et al. 1972), jugando pues un papel importante en los estudios iniciales de la infección virica.

Se ha sugerido que gD es un firme candidato para ser considerada como molécula de interacción con el receptor celular (SPEAR, 1976). Además gD es una proteína diana de la respuesta inmunitaria a la infección herpética, tanto humoral como celular (NORRILD, 1980).

Los primeros estudios que se relizaron sobre dicha glicoproteína, datan del año 1972 en que COHEN habla del aislamiento de una fracción antigénica que estimula la producción de anticuerpos neutralizantes.

Esta fracción antigénica se denominó como CP-1 (cellular protein-1) (COHEN et al. 1972), aislándose de extractos solubles de células KB ó BHK infectadas con VHS-1. Dicho antígeno presentaba la característica de ser una molécula glicoproteica (COHEN et

al. 1972).

25.-

Los antisueros producidos frente a CP-1 - neutralizaban la infectividad, tanto de VHS-1, como de VHS-2. Este antisuero reaccionaba frente a los extractos de células infectadas con VHS, así como frente a la membrana plasmática de las células infectadas y transformadas por VHS-1 (PONCE DE LEON et al. 1973; REED et al. 1975).

También CP-1 muestra propiedades inmunológicas semejantes con la banda II (antígeno estructural) (POWELL y WATSON, 1975).

COHEN et al. (1978) demostraron que la actividad CP-1 en los extractos de las células infectadas está asociada con una glicoproteína de 52.000 (52K) - daltons de peso molecular y que esta misma actividad antigénica corresponde a una glicoproteína de 59.000 daltons de peso molecular (59K) en la cubierta del virión.

COHEN et al. (1978) basándose en los experimentos de pulsos de marcado afirman que la gp52 es un precursor de gp59 de la envoltura de VHS siendo esta gp59 una de las glicoproteínas mayores de la envoltura del virión.

EISENBERG et al. (1979) evidenciaron que gp52 corresponde a gD y que el producto gp59 corresponde a D, adaptándose así a la nomenclatura de Cambridge y designando a las dos formas de CP-1 como pD y D.

El análisis estructural del precursor pD y de su producto D, muestra que pD contiene metionina y arginina, y que la glicoproteína D presenta el mismo perfil peptídico que pD, por lo que el procesamiento de pD a D no implica alteraciones en su estructura polipeptídica (EISENBERG et al. 1979).

Utilizando (2-3.H)-manosa como marcador de glicoproteínas, EISENBERG et al. (1979) identificaron a pD como una proteína básica con un punto isoelectrico 8 conteniendo una zona central ó core oligomanosídica de 1.800 daltons de peso molecular, que posteriormente es procesada mediante glicosilación y sialización a una molécula más ácida y heterogénea de 59K de peso molecular (D).

EISENBERG et al. (1980) establecieron una comparación estructural entre la gD de VHS-1 (gD-1) y la gD de VHS-2 (gD-2), mostrando que los perfiles peptídicos de gD-1 y de gD-2 son muy parecidos, pero no idénticos. Aunque la secuencia aminoácida es muy similar, sin embargo, cada proteína contiene péptidos -- tripticos tipo-específicos.

La similitud estructural entre estas dos glicoproteínas se correlaciona bien con su reactividad antigénica cruzada, ya que un anticuerpo inmunoprecipitante frente gD de VHS-1 también inmunoprecipita gD-2 y neutraliza la infectividad de ambos virus (EISENBERG et al. 1980).

EISENBERG et al. (1982) utilizaron un anticuerpo monoclonal, HD-1 (PEREIRA et al. 1980) que reconoce gD-1 y gD-2 para preparar un inmunoadsorbente uniendo el anticuerpo monoclonal HD-1 a Sepharosa y así purificar ambas glicoproteínas.

Ambas glicoproteínas fueron obtenidas en cantidad, pureza y actividad biológica suficiente como para usarse en los estudios bioquímicos e inmunológicos.

Cada glicoproteína induce títulos elevados de anticuerpos neutralizantes mono-específicos en el ratón.

Ha podido establecerse el contenido de aminoácidos de gD-1 y gD-2 siendo similares pero no idénticos en su composición. Ninguno de los aminoácidos está presente en cantidades anormalmente elevadas ni escasas en cada glicoproteína, comparando con otras glicoproteínas de membrana (BROWN et al. 1981).

El número total de aminoácidos ácidos y básicos es casi el mismo en ambas glicoproteínas. Las experiencias previas con isoelectroenfoque (COHEN et al. 1980) indicaron que pgD-1 tiene un punto isoelectrico (Pi) de 7.45 aproximadamente y el pI de pgD-2 es algo más ácido con respecto al de pgD-1 (EISENBERG et al. 1982).

La proporción de aminoácidos polares y el número de residuos cisteína y metionina es muy parecido en ambas glicoproteínas. Solamente existen muy escasas diferencias notables, como por ejemplo, gD-2 contiene más residuos serina y menos prolina que gD-1, mientras que gD-1 contiene más residuos arginina y

menos de lisina que gD-2.

27.-

Las diferencias en la composición aminoacídica de estas glicoproteínas sería la consecuencia de pequeños cambios en la secuencia nucleotídica.

COHEN et al. (1983) compararon el número de oligosacáridos N-asparagina presentes en cada glicoproteína gD. Observaron que el tratamiento de pgD-1 ó pgD-2 con endo-beta-N-acetilglucosaminidasa H genera tres polipéptidos que migran más rápidamente en los geles de poliacrilamida. Ambas glicoproteínas con tienen tres glicopéptidos tripticos denominados 1, 2 y 3. Los estudios con filtración en gel indican que los pesos moleculares de los 3 péptidos son aproximadamente de 10.000, 3.900 y 1.800 respectivamente para pgD-1 y pgD-2.

1.1.5.4.4.- Glicoproteína E

Las células infectadas por virus Herpes -- simplex (VHS-1 ó VHS-2) desarrollan receptores de membrana con afinidad para la región Fc de la inmunoglobulina G (IgG) (WATKINS, 1964; YASUDA y MILGROM, 1968; WESTMORELAND y WATKINS, 1974; NAKAMURA et al. 1978).

Estos receptores son inducidos en una amplia variedad de tipos celulares diferentes que normalmente no muestran características comunes. El incremento en el número de receptores es paralelo a la producción de proteínas de VHS y de hecho, es dependiente de la expresión del genoma vírico (WESTMORELAND y WATKINS, 1974; COSTA et al. 1978).

Otros virus de la familia Herpesviridae, -- como Citomegalovirus y virus Varicella-Zoster también inducen receptores capaces de unirse a la región Fc de IgG (KELLER et al. 1976; RAHMAN et al. 1976).

Las especulaciones sobre la(s) función(es) de este receptor celular inducido por Herpesvirus están basadas en que la unión de la IgG es importante para la replicación vírica y la patogénesis. Se ha sugerido que la unión de IgG a los receptores de la superficie de las células infectadas podrían interferir con la inmunocitolisis (COSTA y RABSON, 1975; -- LEHNER et al. 1975).

ADLER et al. (1978) demostraron que los agregados de IgG de conejo pueden inhibir la citolisis de las células infectadas in vitro.

Algunos autores (YASUDA y MILGROM, 1968; - LEHNER et al. 1975) sugirieron que la unión de IgG a los receptores puede influir en la expresión de los - productos de codificación vírica y quizás jueguen un papel en el establecimiento de la latencia ó en la - transformación maligna.

COSTA et al. (1977) observan que las concen - traciones elevadas de IgG de conejo no-inmunizados - reducen la cantidad de viriones liberados de las cé - lulas.

Sin embargo, no ha podido demostrarse si - este efecto está directamente relacionado con los re - ceptores de fracción Fc de IgG (BAUCKE y SPEAR, 1979).

BAUCKE y SPEAR (1979) purificaron mediante cromatografía de afinidad a la glicoproteína respon - sable de la unión del fragmento Fc de la IgG, eviden - ciando que se trata de una glicoproteína de membrana de las células infectadas.

Estos autores demostraron que esta glicopro - teína daba lugar a dos bandas electroforéticas dis - tintas, de 80.000 y 65.000 daltons de peso molecular y que era una glicoproteína distinta a las descritas hasta ahora.

Los estudios de los productos proteolíticos de digestión y cinética de aparición tras pulsos de - marcados sugieren que un polipéptido (65K) designado como pE es procesado a gE.

PARA et al. (1980) demostraron que los re - ceptores aparecen en la superficie de las células in - fectadas inmediatamente tras la exposición de la célu - la a los viriones purificados y en ausencia de expre - sión génica.

Su presencia se debe probablemente a los - resultados de la fusión entre la cubierta vírica y la membrana celular. Existe pues, la posibilidad de que esta glicoproteína gE esté presente en la superficie del virus y sea adquirida por la célula infectada por fusión de sus cubiertas.

PARA et al. (1982) prepararon un antisuero frente a la glicoproteína E del VHS-1 inmunizando un conejo con gE purificada por cromatografía de afinidad. Este antisuero precipita selectivamente la gE - mediante inmunoprecipitación detectaron varias formas de gE acumuladas en cantidades variables en las diferentes células infectadas con diferentes cepas, variando ligeramente en su movilidad electroforética, sugiriendo estos resultados que estas diferencias son debidas a las distintas cepas de VHS y a las variaciones en el procesamiento de la glicoproteína en la célula huésped.

Este antisuero anti-gE neutraliza la infectividad de VHS-1, sólo en presencia de complemento. - Además los fragmentos F(ab)2 de dicho anticuerpo - inhiben la actividad del receptor Fc.

Hasta 1982, todos los estudios llevados a cabo habían recaído sobre la glicoproteína E de VHS-1. PARA et al. (1982) trabajando con VHS-2 demostraron que este expresa una glicoproteína que es funcional y antigénicamente igual a la glicoproteína E de VHS-1.

La glicoproteína gE de VHS-2 purificada en columna de cromatografía de afinidad a partir de extractos de células Hep-2 infectadas con VHS-2, presenta una movilidad electroforética en geles de SDS-poliacrilamida menor que la gE de VHS-1.

Los experimentos realizados con el antisuero preparado frente a la gE de VHS-1, mostraron los siguientes hechos:

- . Los extractos de células Hep-2 presentan una glicoproteína relacionada antigénicamente con la gE de VHS-1.

- . La movilidad electroforética de la gE de VHS-2 es indistinguible de la del receptor para Fc de la IgG de VHS-2.

- . El antisuero frente a gE de VHS-1 reacciona tanto con la gE de VHS-1, como con la gE de VHS-2.

El análisis electroforético de gE precipitada de extractos de células Hep-2 infectadas con recombinantes víricos intertípicos (VHS-1 y VHS-2) sugieren que el gen que codifica la gE está localizado en la única porción S del genoma del virus Herpes simplex (0.85 a 0.97 unidades mápicas) (PARA et al. 1982; LEE et al. 1982).

1.1.5.4.5.- Otras glicoproteínas

La existencia de cuatro glicoproteínas de VHS designadas como gB, gC, gD y gE y la secuencia nucleotídica determinada por MARSDEN et al. (1978 y 1984) identificaron una glicoproteína de VHS-2 distinta de gD y gE, cuyo genoma se encuentra en la única región corta (US) del genoma de VHS-2. Probablemente corresponde con el polipéptido designado como gG2 por ROIZMAN et al. (1984).

SHOWALTER et al. (1981) describieron otra glicoproteína gH1, codificada en la única región larga (UL).

RICHMAN et al. (1986) identificaron una nueva glicoproteína del virus Herpes simplex tipo 1, mediante un anticuerpo monoclonal (LP10), con un peso molecular de 59.000 daltons.

Aunque esta glicoproteína es similar en tamaño a la glicoproteína D (gD), es menos abundante, tanto en los viriones como en las células infectadas, migrando más rápidamente su forma precursora, incorporando glucosamina, pero no manosa, y presentando un precursor más estable en las células tratadas con tunicamicina que el precursor de la gpD.

Se ha localizado la secuencia genética que la codifica en la región corta del genoma (US) entre la región 0.892 y 0.924, excluyendo la gD denominada Vs4.

Esta nueva glicoproteína producto de los genes Vs4 de VHS-1 es distinta de las identificadas previamente como gB, gC, gD y gH1.

Es probable que dicha glicoproteína en VHS-1 equivalga a la gG2 del VHS-2 que también es codificada en la región US del genoma de VHS-2 (MARSDEN et al. 1984).

El anticuerpo monoclonal obtenido LP10 es -
tipo-específico necesitándose la obtención de un an-
ticuerpo monoclonal con reactividad cruzada para po-
der establecer similitudes con otras glicoproteínas.

Glicoproteínas de membrana de virus Herpes simplex

Glicoproteína	Virus	Función	Peso molecular (D)
g A/B	VHS-1	Infectividad	126.000
	VHS-2	Fusión celular	119.000
gD	VHS-1	Receptor celular	60.000
	VHS-2	_____	_____
gE	VHS-1	Receptor para Fc	
	VHS-2	de IgG	80.000
gC-1	VHS-1	Inhibe fusión	
	VHS-2	celular	130.000
gC-2 (gF)	VHS-2	_____	75.000
gG-1	VHS-1	_____	59.000
gG-2	VHS-2	_____	130.000
gH	VHS-1	_____	110.000

- | | |
|--------|---------------------|
| ▲ GA/B | ▲ ICP ₀ |
| ■ GC | ☆ ICP ₄ |
| * GD | ★ ICP ₈ |
| ● GE | △ ICP ₂₂ |
| □ GG | ○ ICP ₂₇ |
| * GH | |

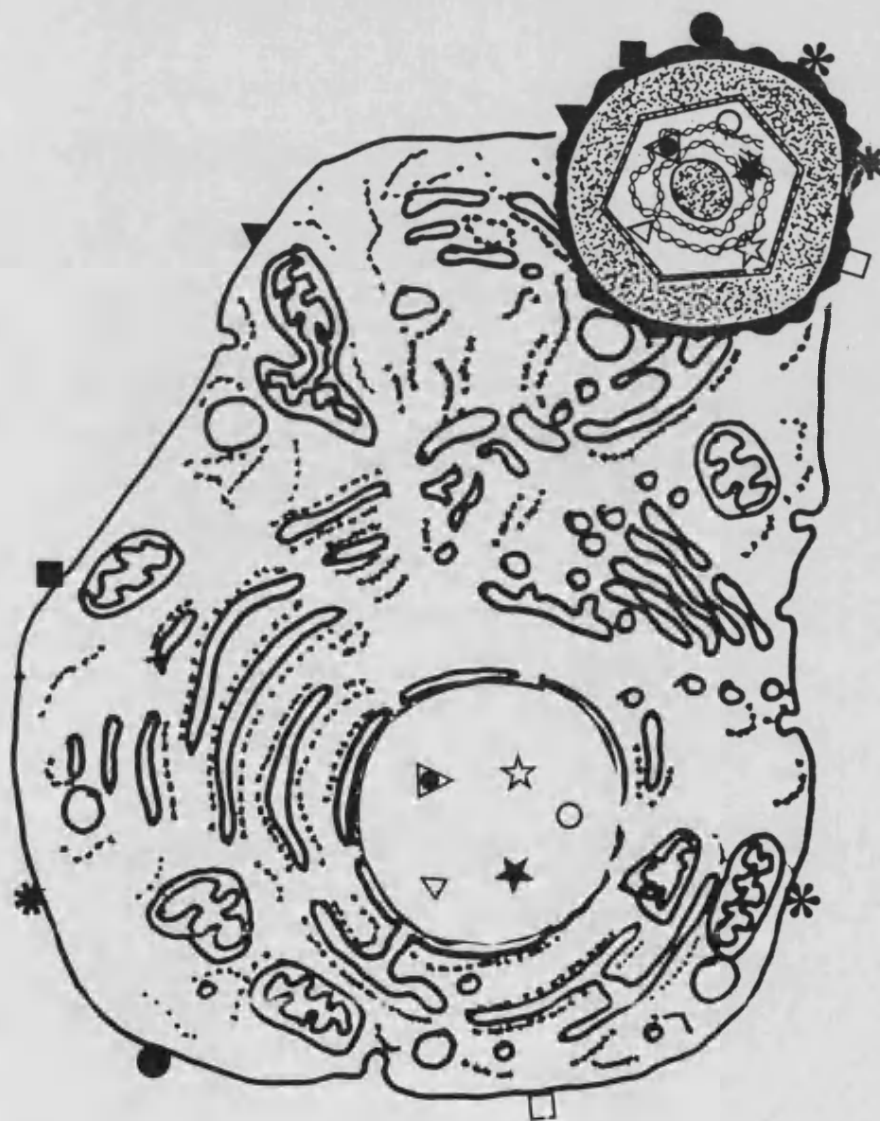


Fig. 4.- Célula y virus Herpes simplex. Esquema en el que aparecen representadas las proteínas víricas expresadas a nivel de la célula infectada y del virion.

1.1.5.5.- Transporte intracelular de las glicoproteínas

El virus Herpes simplex (VHS) incorpora a su envoltura las glicoproteínas de codificación vírica citadas y lípidos celulares, debido a que los viriones hacen protusión en el espacio perinuclear a través de la membrana nuclear (DARLINGTON et al. 1968).

Las glicoproteínas víricas son sintetizadas en los ribosomas adheridos al retículo endoplásmico y a la capa externa de la membrana nuclear.

Estos dos sistemas de membranas tienen composiciones químicas similares (GRAHAM y EB, 1973; FRANKE, 1974; HARRIS, 1978) y son contiguos. Las proteínas de VHS destinadas a la parte naciente de los viriones deben transportarse al interior del núcleo a través de la membrana nuclear, probablemente vía poro de la membrana nuclear.

Los viriones son transportados desde el espacio perinuclear al aparato de Golgi, donde las glicoproteínas de la membrana son posteriormente procesadas. Las glicoproteínas en el aparato de Golgi son procesadas de formas inmaduras a maduras. Estas dos formas poseen diferencias en su movilidad electroforética.

Del aparato de Golgi, los viriones son transportados a la superficie celular, donde son liberados al espacio extracelular ó permanecen en la superficie celular.

Cuando el transporte de la membrana es bloqueado, por ejemplo tras el tratamiento con monesina, los viriones conteniendo glicoproteínas parcialmente glicosiladas son acumulados en vacuolas intracitoplásmicas (JOHNSON y SPEAR, 1982).

Las glicoproteínas víricas también forman parte de la superficie celular y siguen probablemente un paso similar, aunque probablemente no pasen a través de la membrana nuclear interna (PARA et al. 1980).

El transporte intracelular de las glicoproteínas de VHS, es decir el transporte al aparato de Golgi, es más lento (3 a 4 horas tras la síntesis polipeptídica) que el prototipo de biogénesis de glicoproteínas de membrana, que es el de las proteínas G del virus de la estomatitis vesicular (KNIPE et al. - 1977; JOHNSON y SPEAR, 1982).

Este transporte intracelular lento de las glicoproteínas en las células infectadas puede reflejar el periodo de tiempo en el que las glicoproteínas se acumulan en la membrana celular.

También parece posible que las glicoproteínas sean transportadas específicamente a la membrana nuclear interna, donde participarían en el proceso de envoltura, y que este proceso enlentezca el movimiento de las glicoproteínas víricas al aparato de Golgi y a la superficie celular (JOHNSON y SMILEY, 1985).

JOHNSON y SMILEY (1985), para confirmar dichas hipótesis caracterizaron el transporte intracelular y el procesamiento de la glicoproteína D de VHS-2 en las células transformadas que expresan constitutivamente niveles elevados de esta glicoproteína.

En esta célula la gD es procesada rápidamente y transportada a la superficie celular, mientras que en las células infectadas con VHS-2 no-transformadas el proceso del transporte de gD-2 está retardado y la gD se acumula en la membrana celular.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que gD-2 se acumula en la membrana nuclear antes de ser transportada al aparato de Golgi y a la superficie celular.

El acumulo de gD en la envoltura nuclear está probablemente inducido por polipéptidos víricos estructurales sintetizados en las células infectadas, no dependiendo de las propiedades de la molécula de gD por sí misma.

Es decir que el retraso en el transporte con respecto a otros procesamientos de las glicoproteínas víricas es debido a un acúmulo en la envoltura nuclear y a su interacción en dicha localización con otros componentes víricos estructurales (JOHNSON y SMILEY, 1985).

1.1.6.- Proteínas no-glicosiladas de virus Herpes simplex

La síntesis proteica en las infecciones por virus Herpes simplex es un proceso complejo regulado que puede subdividirse en tres estadios al menos -- (HONESS y ROIZMAN, 1974):

- . Síntesis de proteínas alfa ó *immediate early* - (IE) seguido de,
- . Síntesis de proteínas beta o *delayed-early* y - posteriormente,
- . Síntesis de proteínas gamma o tardías denomi-- nadas late (MACKEM y ROIZMAN, 1980)

Los genes de las proteínas alfa (IE: *immediate early*) son aquellos que se transcriben al co-- mienzo de la infección, aún en presencia de ciclohexi-- mida que bloquea la síntesis de las nuevas proteínas víricas.

Se han identificado hasta ahora cinco genes alfa en VHS-1 que codifican unas proteínas denomina-- das ICP (*infected cell polypeptides*): ICPO, ICP4, - ICP22, ICP27 e ICP47 (ACKERMAN et al. 1984).

Los polipéptidos IE mejor caracterizados - son la proteína producto del gen IE-IV denominada - ICP4 y la proteína de 136K del gen IE-II, denominada ICP6 (MIDDLETON et al. 1982; MAY y MAY, 1980).

La proteína vírica 175 ó VP175 (COURTNEY y BENYESH-MELNICK, 1974) también denominada ICP4 (*infec-- ted cell protein 4*) (HONESS y ROIZMAN, 1974) es un - polipéptido no-estructural sintetizado de forma tem-- prana en la célula infectada por virus Herpes simplex tipo 1.

Este polipéptido tiene un peso molecular de 175.000 daltons y es considerado como una proteína - alfa (*immediate early*) entre las proteínas de VHS-1 - (HONESS y ROIZMAN, 1974), sufriendo posteriormente - una modificación postraslacional, con el consiguiente aumento de su peso molecular (COURTNEY y BENYESH- - MELNICK 1974), siendo además fosforilada (PEREIRA et al. 1976).

El uso de un antisuero monoespecífico frente a VP175 ha demostrado que se localiza de forma primaria en el núcleo de las células infectadas por VHS (COURTNEY y BENYESH-MELNICK, 1974). Estos autores han demostrado que VP175 se produce en cantidades elevadas en las células infectadas por ciertas mutantes víricas temperatura sensibles ó con virus con una elevada proporción de partículas víricas defectivas (FRENKEL et al., 1975; DIXON et al. 1980).

Para clarificar el papel de esta proteína en la replicación vírica, CABRAL et al. (1980) utilizaron una tinción de inmunoperoxidasa a nivel de microscopía óptica y electrónica en células Vero infectadas con VHS-1 ó con la mutante tsB2.

En las células infectadas con VHS-1 y en las infectadas con la cepa tsB2 a la temperatura permisiva (+34°C), la VP175 se encontró en el núcleo celular, detectándose a las 2 horas postinfección y a las 3 horas postinfección estaba distribuida marginalmente en la lámina interna de la membrana nuclear. A las 6 horas postinfección los acúmulos proteicos están dispersos en el núcleo y a las 9 horas se localizan dando un patrón marginal cerca de la membrana nuclear.

En las células infectadas por la cepa tsB2 en condiciones permisivas (+37°C) VP175 no está asociada a la nucleocápside ó a la partícula cubierta. En contraste, en la célula infectada con la cepa tsB2 a temperatura no permisiva (+39°C) y recogidas entre 6 y 9 horas postinfección, la proteína VP175 está acumulada no sólo dentro del núcleo, sino también en el interior del citoplasma, en forma de agregados globulares. Estos agregados son una matriz granular no unida por membranas. La función exacta de VP175 es desconocida, pero su localización nuclear y sus propiedades de proteína unida a ADN, hacen pensar en el antígeno nuclear del virus Epstein-Barr, en el antígeno T del Sv40 (Simian virus 40) y de Adenovirus, es decir en antígenos nucleares precoces, con funciones reguladoras por unión al ADN vírico (CARROLL et al. 1974; LUKA et al. 1977).

O'HARE y HAYWARD (1955) observaron que esta proteína ICP4 de VHS, tiene un papel en la transactivación de los promotores de la síntesis de proteínas Beta o delayed early.

Ya en 1983, SMILEY et al. habían comprobado que para la expresión del genoma que codifica la timidina Kinasa (TK) se requiere la síntesis previa y actividad continuada de la ICP4.

Estos autores sugieren que las proteínas - alfa (immediate early) ó sus productos metabólicos - activan la expresión de la timidina Kinasa actuando - en la región promotora incrementando la transcripción

PERSSON et al. (1985) también confirmaron - que la ICP4 es necesaria para la transcripción de los genes beta (delayed early) y gamma (late) controlando de forma positiva la transcripción. La ICP4 de VHS-2 migra más lentamente que la correspondiente proteína de VHS-1 (MORSE et al. 1978).

SHOWALTER et al. (1981) obtuvieron un anticuerpo monoclonal frente a la proteína precoz inmediata (immediate early) ICP4. Este anticuerpo monoclonal mostraba un patrón de fluorescencia nuclear en la inmunofluorescencia y no presentaba capacidad neutralizante.

ACKERMAN et al. (1984) obtuvieron un anticuerpo monoclonal 4G40 frente a la proteína ICP4 semejante a otro descrito previamente por BRAUN et al. - (1983).

La ICP0 tiene un peso molecular de 128.000 daltons cuando el gel de electroforesis lleva N-N'dialliltartradiamina (DATD) y de 108.000 daltons cuando lleva N-N'methylenbisacrylamida y comigra en los gels con DATD con la proteína Beta ICP8.

El anticuerpo monoclonal H1083 reacciona - con este polipéptido de 128.000 daltons de peso molecular de VHS-1 y no con un lisado de células infectadas con VHS-2 (ACKERMAN et al. 1984).

La ICP27 de VHS-1 aparece formando dos bandas con movilidad electroforética correspondientes a 56.500 daltons de peso molecular para la ICP27a y a 58.000 daltons para la ICP27b (MORSE et al. 1978) - siendo también una proteína fosforilada.

El anticuerpo monoclonal H1113 reacciona con un polipéptido de 56.500 daltons, correspondiente en movilidad a la ICP27a de VHS-1. También reacciona con dos polipéptidos de 58.000 y 59.000 daltons procedentes de un lisado de células infectadas por VHS-2 (ACKERMAN et al. 1984).

Otra de las proteínas alfa es una proteína de 110.000 daltons de peso molecular (codificada por el gen IE-I) que como otras proteínas no-glicosiladas alfa está fosforilada y localizada preferentemente en el núcleo de las células infectadas (WILCOX et al. 1980), conociéndose poco de la función de estos productos.

O'HARE y HAYWARD (1985) demostraron que están implicadas en la regulación de la transcripción de los genes de VHS.

La mayor proteína asociada al ADN (DBP:DNA binding protein) presente en las células infectadas por VHS-1 y VHS-2 es un polipéptido Beta (delayed early) denominado ICP8 (infected cell polypeptide 8) (HONESS y ROIZMAN, 1974).

La ICP8 es una proteína de 130.000 daltons con múltiples funciones e implicada en la replicación del ADN vírico y en la regulación negativa de su expresión (LEE y KNIPE, 1985). Posee algunas de las propiedades de las proteínas desestabilizadoras de hélice (HDPs), similar a las proteínas HDPs bien caracterizadas del bacteriofago T4 (proteína codificada por el gen 32) y la HDP de E. coli (ALBERTS et al. 1970).

Estas proteínas se unen de forma cooperativa a las cadenas escindidas de ADN mientras que su afinidad por el ADN de doble cadena es mucho menor.

LEE y KNIPE (1985) demostraron que la ICP8 se une a la doble cadena del ADN cinco veces más eficazmente que a la forma monocatenaria, llegando a la conclusión de que la ICP8 tiene al menos dos actividades de unión al ADN, una para la doble cadena y otra para el ADN monocatenario.

VAUGHN et al. (1984) utilizando columnas de cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales, demostraron que la ICP8 está asociada con algunas proteínas víricas específicas, incluyendo la ADN-polimerasa y una exonucleasa alcalina. Estos datos indican que la ICP8 puede formar parte de un complejo de replicación semejante al existente en el bacteriófago T4.

Los estudios realizados por RUYECHAN et al. (1986) indicaron que la ICP8 es capaz de estimular la actividad ADN-polimerasa vírica.

SHOWALTER et al. (1981) obtuvieron un anticuerpo monoclonal frente a ICP8 de VHS-1.

La síntesis de esta proteína basada en datos de pulsos de marcados se inicia a las dos horas postinfección presentando un pico a las 4 ó 5 horas postinfección declinando su síntesis a partir de este momento.

POWELL y PURIFOY (1977) intentaron identificar los polipéptidos asociados a la actividad enzimática ADN-polimerasa. Hasta entonces, sólo se conocía un polipéptido no-estructural de 44.000 daltons de peso molecular asociado con la actividad timidina Kinasa (SUMMERS et al. 1975).

POWELL y PURIFOY (1977) asociaron a la ADN-polimerasa con un polipéptido de información vírica de 150.000 daltons de peso molecular.

Las ADN-polimerasas de VHS-1 y VHS-2 han sido purificadas y asociadas además de con este polipéptido mayor de 150.000 daltons, con otros polipéptidos (DERSE et al. 1982). De estos, uno es un componente constante, denominado como ICSP 34,35 (POWELL y COURTNEY, 1975), que tiene un peso molecular de 54.000 daltons (VAUGHAN et al. 1985).

VAUGHAN et al. (1985) con anticuerpos monoclonales han demostrado que esta proteína presenta una localización en el mapa del genoma de VHS distinta de las de la ADN-polimerasa (polipéptido de 150.000 daltons), pero demostrando una asociación estrecha entre ambos polipéptidos.

Además de estos polipéptidos no-glicosilados y no-estructurales, existen unas proteínas no glicosiladas pero sí estructurales, como son la VP21 (p.m. 44.000 daltons) y la VP22a (p.m. 38.000 daltons).

Estos polipéptidos se encuentran en las nucleocápsides víricas, pero están ausentes en aquellas que no poseen ADN.

La VP21 es probablemente una proteína de la región central-core (GIBSON y ROIZMAN, 1972) y la VP22a no es un constituyente de la partícula vírica madura.

Se ha propuesto que al sufrir alguna modificación como el clivado ó fosforilización, se transforma en la proteína VP22, un polipéptido vírico de la nucleocápside (GIBSON y ROIZMAN, 1974).

ZWEIG et al. (1980) obtuvieron anticuerpos monoclonales frente a un polipéptido de la nucleocápside de 40.000 daltons de peso molecular al que denominaron p40 y que corresponde a la VP22.

La mutante vírica del VHS-1 denominada 17ts VP1201 presenta una alteración a nivel del polipéptido p40.

Es una mutante temperatura sensible. Cuando el proceso de replicación vírica se realiza a la temperatura permisiva, las partículas víricas que aparecen son normales. Sin embargo, cuando la replicación tiene lugar en condiciones restrictivas para este mutante, aparecen en el núcleo celular gran cantidad de nucleocápsides víricas, lo que hace pensar a PRESTON et al. (1983) que la p40 tenga un papel importante en el empaquetamiento del ADN en la nucleocápside vírica.

Proteínas no glicosiladas de virus Herpes simplex

. Proteínas precoces inmediatas o alfa

ICP₀ _____ 128.000 DICP₄ _____ 175.000 DICP₆ICP₂₂ICP_{27A} _____ 56.000 DICP₂₇ICP_{27B} _____ 58.500 DICP₄₇
. Proteínas precoces o beta

ICP₈ _____ 130.000 D
. Proteínas tardías o gamma

VP₂₁ _____ 44.000 DVP₂₂ P₄₀ _____ 38.000 D

1.1.7.- Respuesta inmunitaria frente a VHS

Los avances en el conocimiento del sistema inmunitario y de la biología del virus Herpes simplex, con ayuda de modelos animales y humanos, han permitido descifrar los hechos que ocurren tras la penetración virica en el organismo humano, distinguiendo tres fases:

- Fase precoz, inespecífica ó de contención.
- Fase efectora
- Fase de erradicación

Debido a la existencia de los fenómenos de latencia y recurrencia, la interacción dinámica entre virus Herpes simplex humano y el sistema inmunitario del huésped es un ejemplo de coexistencia y coevolución (KOHL, 1985).

Subdividiremos los conocimientos existentes en aquellos correspondientes a la infección primaria y los correspondientes a la infección recurrente.

1.1.7.1.- Infección primaria

Desarrollaremos cada una de las tres fases citadas anteriormente.

Fase precoz, inespecífica ó de contención

La primera barrera a la penetración virica está constituida por la piel normal y/o por las membranas mucosas.

Se conoce relativamente poco sobre los factores antiviricos de estas barreras. Sin embargo, nadie duda de su importancia a juzgar por la gravedad de las infecciones que aparecen en los sujetos con eczema, quemaduras, etc., es decir, con una alteración de estas barreras naturales.

En el huésped normal, hay una movilización rápida de todos los componentes que dan lugar a una respuesta inflamatoria, incluyendo los leucocitos polimorfonucleares y las células mononucleares. Estas últimas células, al principio no-B, no-T, y los fibroblastos infectados localmente sintetizan interferón alfa y beta y otros componentes antiviricos que todavía están siendo identificados (ZAWATZKY et al.1981).

Las células infectadas son más resistentes a la infección vírica debido a la producción de proteínas endógenas antivíricas.

El huésped debe tratar con dos formas distintas de desafío vírico. Una es el virus libre, que presumiblemente es afectado por las células fagocitarias. La barrera constituida por los macrófagos parece que previene el alcance de los órganos diana críticos (hígado, glándulas adrenales, parénquima pulmonar, cerebro) por la mayoría de las partículas víricas (ZISMAN et al. 1970).

Los macrófagos normales fagocitan el virus permitiendo por una parte los primeros estadios de la replicación vírica, pero sin embargo, previenen la producción final de partículas maduras, dando lugar al fenómeno que podemos denominar de resistencia intrínseca. Todas las mejoras en la función de los macrófagos incrementan la resistencia del huésped a la infección por VHS (MARTINEZ et al. 1980), mientras que la alteración de este sistema en los animales incrementa la susceptibilidad a la infección grave por VHS (ZISMAN et al. 1970).

La otra forma vírica frente a la que el huésped debe responder, son las células infectadas por el virus. Horas después de la infección las células expresan nuevos antígenos víricos sobre su superficie y transfieren las partículas víricas de célula a célula evitando así la acción de las células fagocitarias y de los componentes específicos antivíricos que rápidamente aparecen.

Los elementos clave en la fase de contención precoz sobre las células infectadas por virus son los macrófagos (resistencia extrínseca) y las células NK (natural Killer), que pueden destruir rápidamente las células infectadas por virus ó disminuir la producción vírica de esas células sin citolisis (KOHL, 1985).

Además, el interferón puede activar ó mejorar estos mecanismos efectores, ejerciendo un efecto protector sobre las células no-infectadas, al menos in vitro (KOHL, 1985).

El papel de esta primera fase precoz inespecífica de contención, es pues, prevenir la diseminación vírica o la producción vírica masiva local durante el tiempo necesario para que ocurra la sensibilización inmunitaria, proliferación clonal y la puesta en marcha de los mecanismos efectores.

Es probable que la intensidad de la infección vírica latente sea determinada durante este estadio.

- Fase de erradicación

En esta fase actúan dos sistemas clave durante la primera semana de la infección y hasta el final de la replicación vírica que ocurre normalmente unos 10 a 20 días a partir del comienzo de la infección. Son las células T ó las funciones efectoras mediada por ellas, y las células B ó las funciones efectoras mediadas por los anticuerpos (LOPEZ, 1983).

Las células T ejercen su protección de varias formas, incluyendo la citotoxicidad celular restringida por los antígenos de histocompatibilidad de clase I (H-2D, H2-K en el ratón ó HLA-A HLA-BY, HLA-C en el hombre (PIZENMASER et al. 1977; LAWMAN et al. - 1980; SETHI et al. 1980; JENNINGS et al. 1984), los fenómenos de hipersensibilidad (NASH et al. 1981), y las linfoquinas como el gamma-interferón (GREEN et al. 1981), interleukina-2 (IL-2) y probablemente otros agentes antivíricos (LEHMANN-GRUBE et al. 1985).

La defensa humoral frente al VHS es completamente dependiente de la función de las células T-colaboradoras en ratones (Lyt-1) (BURNS et al. 1985) y también probablemente en el hombre.

La producción de anticuerpos es muy heterogénea, reconociéndose diversos epitopos y generándose distintos tipos de anticuerpos. Así se ha demostrado que la ausencia de producción de un anticuerpo, por ejemplo frente a la proteína vírica p66, puede determinar la gravedad de la enfermedad y de las recurrencias.

Parece ser que los anticuerpos solos pueden agregar y neutralizar el virus libre. Sin embargo, en la eficacia sobre las células infectadas es crítica la concurrencia de otros componentes tales como el complemento y los leucocitos, que median el ataque celular junto con los anticuerpos, fenómeno de ADCC ó de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, que incluye a las células K, los monocito-macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares (KOHL, 1985).

Sin embargo, otros autores (KAPOOR et al. 1982; NASH y WILDY, 1983), postulan que la respuesta inmunitaria humoral no parece intervenir en el control del virus Herpes. Esta afirmación fué avalada usando el modelo de la infección experimental en la oreja del ratón, después de suprimir la función de las células B por la administración de anticuerpos desde el nacimiento para depleccionar las áreas B dependientes del bazo y de los ganglios linfáticos, de forma que no existiesen niveles de IgM y niveles bajos de IgG en el suero.

Trás la infección en la oreja y a pesar de no detectarse anticuerpos neutralizantes ni anticuerpos específicos totales en el suero, los animales se recuperaron normalmente de la infección (KAPOOR et al. 1982).

Sin embargo, la incidencia de latencia en los animales con deplección de las células B fué más elevada que en los controles, lo que parece confirmar que los anticuerpos impiden la diseminación del virus Herpes simplex al sistema nervioso (NASH y WILDY, 1983).

Los anticuerpos neutralizantes, tanto policlonales como monoclonales, inoculados tres días después de la infección, impiden recuperar virus o lo permiten en muy escaso número, a partir de los ganglios sensitivos dorsales once días después de la infección a pesar de que los títulos de virus aislados a partir de la oreja son comparables a los controles (KAPOOR et al. 1982). Los anticuerpos sin capacidad neutralizante frente a las mismas glicoproteínas son ineficaces en la prevención de la diseminación vírica al sistema nervioso.

Así pues, analizados estos datos se sugiere un papel importante de los anticuerpos en la restricción del paso del virus al sistema nervioso, probablemente por la neutralización del virus en las terminaciones de los nervios periféricos y sinapsis (NASH y WILDY, 1983).

En particular, los anticuerpos neutralizantes se consideran de importancia sólo si están presentes en el momento de la infección. Trás ocho horas postinfección, los mecanismos de protección dependen de la presencia del fragmento Fc de las inmunoglobulinas, lo que indica probablemente un papel para la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (OAKES y LAUSCH, 1981).

Parece pues, de relativa importancia inmunitaria, la aparición en las células infectadas de la glicoproteína E (gE) (WESTMORELAND et al. 1974).

De todas formas, el papel de esta glicoproteína gE como receptor para Fc in vivo, permanece desconocido (KOHL, 1985).

1.1.7.2.- Infección recurrente

Existen escasos conocimientos sobre la secuencia de la respuesta inmunitaria en la infección recurrente, ya que no existen modelos experimentales en animales que reproduzcan las recurrencias espontáneas sintomáticas de la infección herpética humana. Por ello, la mayor parte de la información existente proviene del estudio de las recurrencias en humanos, con el problema que ello conlleva, puesto que estos pueden tener alteraciones en la respuesta inmunitaria normal.

Los individuos con infección herpética recurrente no tienen predisposición aparente a presentar otras enfermedades infecciosas y han sido encontradas variaciones estadísticamente significativas en la respuesta inmunitaria de los individuos con recurrencias específicas frecuentes frente a los que no las presentan (KOHL, 1985).

Las diferencias observadas en los individuos con infecciones herpéticas recurrentes han sido señaladas en:

- Alteración en la motilidad de los leucocitos polimorfonucleares (RABSON et al. 1977)
- Alteración en las células NK (natural Killer) (THONG et al. 1975).
- Alteraciones en la capacidad de los linfocitos para responder in vitro con blastogénesis y producción de linfoquinas (COREY et al. 1978; RATTRAY et al. 1980).

SHERIDAN et al. (1985) han demostrado que los individuos con recurrencias frecuentes producen inhibidores de las células NK durante las recurrencias PLAEGER - MARSHALL y SMITH, (1978) informaron que el VHS inhibe la blastogénesis in vitro y WEINBERG et al. (1985) confirmaron la existencia de una inhibición por parte del virus Herpes simplex de la respuesta proliferativa en los pacientes con infecciones recurrentes, especialmente antes y durante la recrudescencia.

La interleukina-2 (TCGF ó T cell growing factor) es capaz de mediar esta inhibición, pero es menos activa sobre las células de los individuos con infecciones recurrentes (WEINBERG et al. 1985).

SHILLITOE et al. (1977) observaron que los individuos con recurrencias frecuentes tenían niveles reducidos ó ausencia de MIF (factor inhibidor de la migración de los macrófagos) producidos por los linfocitos en sangre circulante. Como la producción de MIF está correlacionada in vivo con la respuesta celular, estos datos impiden afirmar que dicha respuesta juegue un papel importante en la recurrencia, teniendo en cuenta además que éstas aparecen en individuos con niveles elevados de anticuerpos neutralizantes circulantes (NASH y WILDY, 1983).

1.1.7.3.- Latencia vírica

La primera pregunta que debemos hacernos - en relación con la latencia es la existencia o ausencia de un control inmunitaria real de las infecciones latentes.

El hallazgo de que el VHS puede aislarse - a partir de los ganglios nerviosos infectados en forma latente llevó a considerar la posibilidad de que existiesen factores inmunológicos que mantuvieran el estado latente (NASH y WILDY, 1983).

STEVENS y COOK (1974) propusieron que los mecanismos inmunitarios tenían importancia en el mantenimiento de la latencia, ya que cuando los ganglios nerviosos infectados en forma latente eran transplantados a otros ratones inmunizados frente a VHS o no - inmunizados, las reactivaciones víricas disminuían - solo en los animales inmunizados.

Además, observaron que la transferencia de IgG anti-Herpes era eficaz para reducir la reactivación vírica.

Recientemente el papel de los anticuerpos para mantener la latencia ha sido cuestionado (SEKIZAWA et al. 1980). En sus experiencias estos autores - efectuaron la infección inyectando dosis elevadas de virus a los ratones, seguido días después de la administración de anticuerpos de conejo anti-Herpes. Después de permitir descender los anticuerpos neutralizantes hasta niveles casi indetectables (< 1:8), cualquier elevación posterior en los niveles de anticuerpos neutralizantes sería de origen murino y probablemente en respuesta a una reactivación.

En los ratones sometidos a traumatismos para inducir una reactivación vírica, se observó una elevación en el título de los anticuerpos neutralizantes, mientras que sólo en un pequeño porcentaje de los ratones no sometidos a traumatismos se observó dicho incremento. Ello evidencia que los anticuerpos no son requeridos para mantener el estado de latencia. Sin embargo, también debemos tener en cuenta que este modelo no considera en ningún momento el papel de las células T, de los anticuerpos no-neutralizantes, de la citotoxicidad mediada por anticuerpos, ni de interferón.

Para estudiar la posible participación de las células T o sus productos en el mantenimiento de la latencia, KAPOOR et al. (1982) establecieron infecciones latentes en ratones atímicos mediante la transferencia de 2×10^7 células de ganglios linfáticos inmunes tres días después de la infección, eficaces en controlar la infección primaria. Tras catorce días los ganglios fueron extirpados y cocultivados para detectar la existencia de virus. En la mitad de los ratones en los que se aisló virus no se detectaron anticuerpos neutralizantes implicando la presencia de células T en el establecimiento de la latencia, en ausencia de anticuerpos específicos.

Cuando la dosis de células inmunitarias administradas a los tres días postinfección se incrementaba a 7×10^7 células/ratón receptor, en un 90% de los animales no pudo aislarse virus Herpes, cuatro semanas después.

Solamente en un 40% de los animales fueron detectados anticuerpos específicos. Por ello debe investigarse más profundamente la posibilidad de que dosis elevadas de células inmunes T puedan prevenir ó eliminar las infecciones latentes.

1.1.7.4.- Anticuerpos frente a polipéptidos específicos tras la infección primaria y recurrente

KAHLON et al. (1986) han estudiado cincuenta y cuatro sueros de dieciocho pacientes con infección por VHS mediante inmunotransferencia, microneutralización y ELISA para determinar la secuencia de aparición de los anticuerpos séricos frente a las glicoproteínas víricas.

En otros estudios se ha encontrado que los sueros de pacientes con infección primaria genital por VHS-1 muestran una aparición precoz de los anticuerpos frente a la glicoproteína gB (BERNSTEIN et al. 1984), seguidos de la aparición de anticuerpos frente a la proteína con un peso molecular entre 145.000 y 155.000. Estos anticuerpos parece que van dirigidos frente a las proteínas víricas de la nucleocápside VP5, VP6 y VP7 (GLORIOSO y SMITH, 1977).

Posteriormente en el tiempo, aparecen los anticuerpos frente a las glicoproteínas gC y gD y al complejo P35. Algunas muestras de suero poseen también anticuerpos frente a una proteína de 80.000 daltons de peso molecular, probablemente la gE.

En los sueros de los pacientes en los que se aisló VHS-1 de la cavidad oral (primoinfección) se encontró una elevación de los anticuerpos frente a la proteína precoz ICP4 (peso molecular 175.000 daltons) También frente la gB y la p35 persistiendo durante un mínimo de catorce meses tras la primoinfección.

Los pacientes con recurrencias por VHS-1 - mostraron un incremento en los anticuerpos frente a - ICP4, gB, gC y gD en particular, mientras que no se - encontró un incremento aparente en la respuesta frente a p35 (KAHLON et al 1986).

Los individuos con infección genital primaria por VHS-2 poseen anticuerpos frente a las glico--proteínas mayores, especialmente gB y gD, anticuerpos frente a las proteínas de peso molecular entre 75.000 y 90.000 daltons de peso molecular, incluyendo probablemente las gE y anticuerpos frente a la glicoproteína de 130.000 daltons (ROIZMAN et al. 1984).

Posteriormente en el tiempo se detectaron una gran cantidad de anticuerpos frente al complejo - p35 y a la ICP4.

Además en los sujetos con infecciones recurrentes por VHS-2 han sido encontradas diferencias en el patrón de anticuerpos según la frecuencia de las - recurrencias.

En el suero de los pacientes con más de - doce recurrencias por año han sido encontradas gran--des cantidades de anticuerpos frente a ICP4. En aque--llos con recurrencias (menos de tres por año) no se - han sido encontrados anticuerpos frente a ICP4 (KAH--LON et al. 1986).

1.2. - Anticuerpos monoclonales

Cuando una sustancia extraña penetra o es inyectada en un vertebrado, la respuesta inmunitaria consecuente puede traducirse en la secreción de anticuerpos por parte de las células plasmáticas.

Los anticuerpos son moléculas de inmunoglobulinas con lugares de combinación que reconocen los determinantes situados en la superficie de la sustancia extraña (antígeno) y puede unirse a ellos.

La combinación del anticuerpo con el antígeno desencadena ciertos procesos biológicos como es la capacidad de neutralizar y/o de eliminar la sustancia extraña.

La respuesta del anticuerpo a un antígeno es muy heterogénea. En el bazo hay hasta un millón de estirpes celulares distintas de células B, las células precursoras de las células plasmáticas.

Aunque todas ellas derivan de una célula común, cada estirpe celular adquiere la capacidad de fabricar un anticuerpo distinto que reconoce a un determinante antigénico diferente.

Cuando se inyecta un inmunógeno en un animal, este responde elaborando anticuerpos dirigidos frente a las diferentes moléculas antigénicas del material inyectado y frente a los distintos determinantes de un sólo antígeno, produciendo también anticuerpos que se acoplan a un mismo determinante.

Por estas razones es poco menos que imposible separar totalmente los distintos anticuerpos, elaborados dentro de un organismo por lo que los antiseros convencionales contienen mezclas de anticuerpos de distintas especificidades que difieren de un animal a otro, denominándose a este conjunto anticuerpos policlonales.

Según la teoría de la selección clonal (BURNET), cada clon productor de anticuerpos está comprometido en la producción de una única estructura de anticuerpos, y es seleccionada por el antígeno para su posterior proliferación.

La progenie o clon de esta célula es una fuente de anticuerpos idénticos frente a un único determinante antigénico, es decir correspondientes a anticuerpos monoclonales dentro de un organismo.

Sin embargo, estas células secretoras de anticuerpos no pueden mantenerse en cultivo *in vitro*.

Los tumores de células productoras de inmunoglobulinas producidos de forma espontánea e inducidos experimentalmente, poseen la capacidad de proliferación ilimitada secretando grandes cantidades de inmunoglobulinas anormales, denominada mielómicas.

Realmente el tumor equivale a un clon inmortal de células descendientes de una única célula progenitora. Las células de mieloma pueden cultivarse indefinidamente y todas las inmunoglobulinas que segreguen tendrán una estructura química idéntica.

Estas inmunoglobulinas son en efecto anticuerpos monoclonales, pero con una actividad de anticuerpo desconocida. Son pues una colección al azar de proteínas similares a los anticuerpos, pero no son el resultado de una estimulación antigénica.

Por esta razón interesaba conseguir unas células secretoras de anticuerpos monoclonales de especificidad predefinida y disponible en cantidades y duración ilimitadas.

En 1975, KÖHLER y MILSTEIN fusionaron células de mieloma de ratón con linfocitos de bazo de ratones inmunizados con un determinado antígeno.

Las células del mieloma híbrido resultante ó hibridoma, expresaban tanto la propiedad de la célula B de producir anticuerpos específicos, como el carácter inmortal de las células mielómicas.

Estas células híbridas podían manipularse mediante los métodos utilizados en los cultivos permanentes de células animales. Cada célula híbrida puede clonarse y cada clon produce grandes cantidades de un anticuerpo específico para un sólo determinante antigénico. Así pudieron obtenerse pues los anticuerpos monoclonales a partir de las células en cultivo permanente.

El interés que presentaba entonces el mantenimiento de las células productoras de anticuerpos específicos aparece recogido en el artículo publicado por KÖHLER y MILSTEIN que hace referencia a esta característica por lo que se titulaba *Continuous cultures of cells secreting antibody of predefined specificity*.

La tecnología de KÖHLER y MILSTEIN permitió disponer de líneas celulares plasmáticas creciendo de forma continua y que segregaban anticuerpos de una especificidad predefinida.

Las células híbridas producidas por la fusión de las células del bazo (células B) y las de mieloma expresan características de ambas células parentales, produciendo anticuerpos de una especificidad predefinida frente a unos antígenos con los que la célula B fue inmunizada y la capacidad de crecer de forma indefinida en cultivo (BAZIN, 1981).

La fusión celular puede tener lugar de forma espontánea. Sin embargo esta puede favorecerse usando virus inductores de fusión celular (virus Sendai) o agentes químicos como el polietilenglicol (LOVBORG, 1982).

La información de ambas células progenitoras se expresa codominantemente en las células fusionadas (MILSTEIN, 1980). Así cada célula del clon híbrido presenta cromosomas de la célula mielómica y de la célula de bazo (célula B) (KÖHLER y MILSTEIN, 1975).

Estos anticuerpos monoclonales presentan una serie de propiedades que los hace más ventajosos con respecto a los anticuerpos policlonales (WARNKE et al. 1983).

Las ventajas de los anticuerpos monoclonales pueden resumirse en:

- . Ser anticuerpos específicos de antígeno único
- . Poseer afinidad constante
- . Disponibilidad continua e idéntica
- . Posibilidad de producción in vitro
- . Posibilidad de marcado durante su biosíntesis
- . Obtención de un volumen ilimitado de anticuerpos con espacio y personal limitado.
- . Obtenerse anticuerpos monoclonales con su mezcla.

Los anticuerpos policlonales son producidos in vivo, requiriéndose inoculaciones repetidas del antígeno a los animales de experimentación y necesitando mantenerse estos.

Con la inmunización de animales se obtiene una mezcla de anticuerpos, como resultado de una respuesta heterogénea frente a los distintos determinantes antigénicos de una misma molécula.

Además existe una variación en las clases de anticuerpos y en su afinidad, tanto en el tiempo en un mismo animal, como entre los animales de la misma especie o entre los animales de diferentes especies.

La disponibilidad de los anticuerpos policlonales es limitada tanto en el tiempo como en su cuantía.

Los anticuerpos monoclonales evitan o subsanan bastantes de los inconvenientes de los antisueños clásicos, pero a su vez poseen desventajas o quizá mejor, peculiaridades, que es necesario tener presentes a la hora de su empleo. Entre las principales desventajas citaremos las siguientes:

- Inespecificidad (Reacciones cruzadas).

Los anticuerpos monoclonales al dirigirse contra los determinantes antigénicos específicos presentes en una molécula determinada, teóricamente podrían reaccionar con todas aquellas poblaciones celulares que posean moléculas idénticas en la superficie celular.

Esta podría ser la explicación a la reactividad del anticuerpo monoclonar OKT6 tanto con timocitos corticales como con las células de Langerhans (FITMIAN et al. 1981), o del anticuerpo de la leucemia linfoblástica común -35- con las células de epitelio renal (METZGARD et al. 1981).

Este tipo de hallazgos obliga lógicamente a realizar tipados numerosos con las diferentes extirpados celulares humanas antes de establecer la especificidad definitiva de un anticuerpo monoclonal.

Así, aunque el anticuerpo monoclonal OKT6 detecte células de Langerhans además de células timicas en estadio madurativo cortical, no invalida su utilidad en el diagnóstico y clasificación de las leu

cemias T, dada su negatividad en otros tipos de leucos_{is}.

No obstante, debe tenerse presente la importancia de utilizar paneles adecuados de anticuerpos monoclonales a la hora de establecer un fenotipo celular.

Por otro lado, la reactividad con dos ó más tipos celulares puede ser útil para ayudar a conocer la relación entre las manifestaciones de la enfermedad a nivel de diferentes tejidos, sin relación aparente entre sí, como el daño neurológico en la enfermedad de Chagas y la esclerosis múltiple, y la existencia de un anticuerpo monoclonal que detecte un determinante compartido tanto por *Trypanosoma cruzi* como por las neuronas (WOOD et al. 1982).

- Escasez de propiedades biológicas

Los anticuerpos monoclonales al reaccionar con un único determinante antigénico no facilitan que se forme la red compleja de la reacción antígeno-anticuerpo convencional.

El precipitado es una red tridimensional de antígenos y anticuerpos. Un anticuerpo monoclonal se enlaza a un sólo determinante antigénico de una molécula de antígeno por lo que no puede surgir una estructura reticular entre el anticuerpo y la mayoría de los antígenos, no dando pues reacciones de repetición.

Estos anticuerpos rara vez fijan el complemento, cuestionándose también su participación en los fenómenos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (SAN MIGUEL et al. 1984)

- Especificidad excesiva

La especificidad de los anticuerpos monoclonales puede llegar a ser tal, que por existir cambios mínimos en la estructura del determinante antigénico puede impedirse el reconocimiento del mismo por parte del anticuerpo monoclonal.

Así por ejemplo, la glicosilación de una molécula proteica hace que sean reconocidas como proteínas distintas (PARA et al. 1982). La desnaturalización con detergentes, calor, etc. de las proteínas es otro de los procesos que impide el reconocimiento de determinadas moléculas antigénicas.

1.3.- Estudios de virus Herpes simplex 1 y 2 con anticuerpos monoclonales

1.3.1.- Diagnóstico y tipado de los aislamientos

Los métodos disponibles para diagnosticar - las infecciones por virus Herpes simplex, incluyen el aislamiento en cultivos celulares, método considerado de referencia y relativamente rápido, pero reservado a muy pocos centros.

El examen citológico (NAHMIAS et al. 1967) es rápido, disponible, económico pero muy poco sensible y específico y la microscopía electrónica, cuyo - instrumental y especialización del personal requerido, la hace un método sólo utilizable en algunos centros.

La introducción de los anticuerpos monoclonales frente a virus Herpes simplex ha supuesto una revolución en el campo diagnóstico de las infecciones por dicho virus.

Además, la utilización de dichos anticuerpos monoclonales frente a las glicoproteínas específicas de virus Herpes simplex tipo 1 ó virus Herpes - simplex tipo 2 posibilita no sólo el diagnóstico rápido de las infecciones herpéticas, sino también el - tipado simultáneo de los virus implicados (VOLPI et - al. 1983).

El uso de los anticuerpos monoclonales ha permitido introducir en el diagnóstico rápido de VHS los llamados métodos inmunológicos, obviando los inconvenientes que presentan los anticuerpos policlonales (PEREIRA et al. 1982).

Es posible efectuar un diagnóstico rápido y específico a partir de las muestras tomadas de las - lesiones en las que existen células infectadas por el VHS que expresan antígenos codificados por dicho virus.

Así, la inmunofluorescencia directa, la - tinción de inmunoperoxidasa e incluso el enzimoanálisis (ELISA) (GOLDSTEIN et al. 1983) directamente a partir de las muestras con anticuerpos monoclonales son los métodos rápidos más utilizados actualmente, por su elevada sensibilidad y especificidad - que es comparable al aislamiento vírico en cultivos - celulares.

VOLPI et al. (1983) utilizaron la inmunofluorescencia directa para diagnosticar la infección por VHS a partir de muestras obtenidas directamente de las lesiones y compararon los resultados con el aislamiento en cultivos celulares. De catorce aislamientos víricos, once (78%) fueron identificados por inmunofluorescencia directa. Las tres muestras en las que la inmunofluorescencia no fué positiva, presentaban un número de células insuficiente para su identificación por dicho método. (menos de cincuenta/mililitro).

GOLDSTEIN et al. (1983) utilizando cuatro anticuerpos monoclonales uno de los cuales (3-G11) reaccionaba de forma específica frente a VHS-1 (gC) mientras que los otros tres lo hacían frente a VHS-2.

Para conocer su utilidad diagnóstica tomaron muestras clínicas procedentes de 59 casos de aislamientos con presunción de infección herpética y 43 con sospecha clínica, procesándolos mediante inmunofluorescencia a partir de la muestra directa y del aislamiento en cultivo.

La correlación entre el aislamiento en cultivo y la detección del antígeno en la muestra clínica fue excelente cuando fueron descartadas aquellas muestras con un número de células inferior a veinte células por círculo de portaobjetos de inmunofluorescencia.

Además, los anticuerpos monoclonales permiten un diagnóstico rápido, antes de aparecer el efecto citopático, a partir del cultivo celular inoculado mediante inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa y enzimoanálisis sobre la monocapa de células inoculadas.

NILHEDEN et al. (1983) desarrollaron un método que permite el diagnóstico rápido y tipado del virus Herpes simplex a partir de los cultivos celulares.

Las muestras clínicas fueron inoculadas sobre una monocapa de células GMK y tras un periodo de incubación de 8 a 10 horas, los anticuerpos monoclonales fueron añadidos al cultivo y la reacción revelada mediante inmunoglobulina de ratón marcada con peroxidasa. La sensibilidad y especificidad del método lo hacen utilizable.

Como ya hemos apuntado, los anticuerpos monoclonales han supuesto una ventaja no sólo en el diagnóstico rápido de las infecciones por virus Herpes simplex, sino también en su tipado.

Hasta su introducción, la diferenciación entre VHS-1 y VHS-2 era efectuada utilizando anticuerpos policlonales absorbidos, o mediante análisis del genoma vírico con endonucleasas de restricción (LONSDALE et al. 1979).

Ninguno de estos dos métodos es realizado de forma rutinaria, el primero por las dificultades existentes en la preparación de los anticuerpos absorbidos y el segundo por ser un método que necesitaba personal altamente cualificado (BUCKMASTER et al. 1984).

Así pues, los anticuerpos monoclonales obtenidos tanto frente a proteínas glicosiladas como no glicosiladas se utilizan en el serotipado de Herpes simplex (PEREIRA et al. 1980; BALACHANDRAN et al. 1981; SHOWALTER et al. 1981; McLEAN et al. 1982).

VOLPI et al. (1983) han usado el método de inmunofluorescencia para tipar sus aislamientos víricos a partir de los cultivos celulares.

GOLDSTEIN et al. (1983) realizaron un tipado de VHS de los aislamientos en cultivo por inmunofluorescencia utilizando cuatro anticuerpos monoclonales, de los que el 3G11 reacciona exclusivamente con las células infectadas por VHS-1, mientras que los anticuerpos monoclonales G-AG, G-E12 y G-H11 reaccionaban solo con células infectadas por VHS-2.

Ninguno de ellos interaccionaban con células no-infectadas ó infectadas por Citomegalovirus ó virus Varicella-Zoster.

El patrón de fluorescencia difería según el anticuerpo monoclonal utilizado, presentando cada uno de ellos un patrón específico.

Posteriormente comprobaron que existía una coincidencia total entre el serotipado con anticuerpos monoclonales y los resultados obtenidos mediante el análisis con endonucleasas de restricción.

PETERSON et al. (1983) a partir de 122 aislamientos realizaron un estudio comparativo entre los tres métodos:

- . Serotipado empleando sueros específicos de conejo ó comerciales (policlonales)
- . Anticuerpos monoclonales frente a VHS-1 y VHS-2 - (GOLDSTEIN et al. 1983).
- . Análisis del ADN con endonucleasas de restricción - según el método de LONDSDALE (LONDSDALE et al. - 1979).

Con los sueros comerciales un 34% de los - aislamientos no pudieron tiparse, mientras que utilizando los anticuerpos monoclonales un 63% de los aislamientos fueron tipados como VHS-1 y un 37% como -- VHS-2, resultados totalmente coincidentes con los obtenidos mediante el análisis de ADN con endonucleasas de restricción.

BUCKMASTER et al. (1984) han utilizado anticuerpos monoclonales específicos frente a VHS-1 y VHS-2 mediante hemaglutinación pasiva reversa y pruebas de neutralización para serotipar 100 aislamientos de virus Herpes simplex.

Todos los aislamientos fueron además tipados mediante la prueba de sensibilidad a la bromovinil-deoxiuridina.

Los resultados del tipado con anticuerpos - monoclonales y la sensibilidad a dicha droga mostraron una elevada concordancia. Sólo un aislamiento de VHS-1 no pudo tiparse con anticuerpos monoclonales. - Sin embargo, estudios posteriores realizados con endonucleasas de restricción mostraron que este aislamiento presentaba una variante intratípica de la glicoproteína gA/B.

Debido a la variabilidad de algunos epítopos dentro de cada serotipo, el tipado debe realizarse con un panel de anticuerpos monoclonales frente a las distintas glicoproteínas (PEREIRA et al. 1982).

ZIEGLER et al. (1985) tiparon 51 aislamientos de virus Herpes simplex mediante enzimoanálisis con anticuerpos monoclonales .

Dichos resultados fueron comprobados mediante hibridación de ADN y análisis del genoma vírico - con la endonucleasa de restricción Eco-RI. Veintiseis aislamientos fueron identificados como VHS-1 y 25 como VHS-2. Los resultados de estos métodos presentaron una total concordancia.

Los anticuerpos monoclonales frente a VHS - no sólo han supuesto un gran avance en el diagnóstico directo de las infecciones herpéticas, sino también - en el diagnóstico serológico ó indirecto, ya que mediante cromatografía de afinidad en columna con anticuerpos monoclonales frente a las glicoproteínas víricas deseadas ha sido posible purificar antígenos que permiten detectar anticuerpos tipo-específicos, tanto frente VHS-1 como a VHS-2 en el suero de los pacientes.

COLEMAN et al. (1983) determinaron anticuerpos tipospecíficos mediante enzimoimmunoanálisis (ELISA), usando como antígeno de VHS-1 la glicoproteína gC de VHS-1 purificada con anticuerpos monoclonales y antígeno de VHS-2, también purificado con anticuerpos monoclonales en columna de afinidad.

1.3.2.- Análisis de las glicoproteínas

La obtención de clones de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales que reaccionan con las proteínas de VHS ha permitido llevar a cabo estudios sobre la misma, permitiendo caracterizarlas y conocer la existencia de determinantes tipospecíficos ó tipocomunes y su purificación.

La purificación de las proteínas mediante columnas de Sepharosa unidas a anticuerpos monoclonales ha permitido estudiar su composición e incluso conocer las diferencias existentes entre VHS-1 y VHS-2.

Además los anticuerpos monoclonales están - permitiendo caracterizar las nuevas proteínas que migran en los geles de poliacrilamida con una movilidad electroforética semejante a otros péptidos, quedando hasta entonces solapadas.

1.3.2.1.- Glicoproteína gC-1 y gC-2

HOLLAND et al. (1983) obtuvieron 7 hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales frente a gC, uno frente a gB y otro frente a gD.

Todos los anticuerpos neutralizaron a VHS-1 pero no a VHS-2. Dos anticuerpos, uno específico frente a gB y otro frente a gC, fueron utilizados para seleccionar variantes víricas resistentes a la neutralización con anticuerpos monoclonales y complemento.

La selección se realizó a partir de dos lotes de virus, uno tratado con dos productos mutágenos, bromodeoxiuridina y nitrosoguanina y otro lote sin tratar.

Estos autores obtuvieron cuatro variantes resistentes a la neutralización por el anticuerpo específico frente a gC y cuatro frente a gB.

De las cuatro variantes de gC, dos de ellas no expresaban dicha glicoproteína, siendo una resistencia fenotípica.

Las otras dos variantes de gC y las cuatro de gB expresaban dichas glicoproteínas aunque alteradas antigénicamente, denominándolas mutantes mar (monoclonal antibody resistant).

Las dos mutantes mar C fueron estudiadas con un panel de 7 anticuerpos monoclonales para conocer su capacidad neutralizante. Sus resultados mostraron que la glicoproteína gC presenta al menos dos lugares antigénicos.

MARLIN et al. (1985) utilizaron también un panel de anticuerpos monoclonales para identificar los lugares antigénicos de las glicoproteínas víricas y caracterizar los epitopos que componen estos lugares antigénicos. Para ello enfrentaron un panel de 22 anticuerpos monoclonales frente a VHS-1 con 22 mutantes mar, identificando de esta forma un mínimo de 7 epitopos, tres de los cuales fueron asignados a un lugar antigénico (I) y en otro lugar (II) compuesto por tres sublugares (IIa, IIb y IIc).

Los dos lugares antigénicos residen en dominios físicamente distintos de la proteína. Estos autores sugieren que el lugar I está localizado en la porción C-terminal y que el lugar II reside en la porción N-terminal media de la glicoproteína gC.

PARA et al. (1983) obtuvieron dos anticuerpos monoclonales que precipitan glicoproteínas diferentes pero de peso molecular semejante (70.000 a 80.000 daltons) obtenida a partir de extractos de células infectadas por VHS-2.

Uno de estos anticuerpos monoclonales reacciona con un determinante tipoespecífico de la glicoproteína denominada gE (70K), otro reacciona con una glicoproteína codificada en una región genómica colinear con la zona que codifica la glicoproteína gC en VHS-1, denominada gF por BALACHANDRAN et al. (1981) y denominada posteriormente gC2 ó VHS-2gC por SWAIN et al. (1985).

Estos anticuerpos (III 188 y III 347) también precusores (74K) de dichas glicoproteínas, e incluso con productos catabólicos de las mismas (63K-III 188 y 58K-III347).

Estos anticuerpos monoclonales precipitan las mismas glicoproteínas que los obtenidos por BALACHANDRAN et al. (1982) 17 α A2 y 17 β C2, respectivamente.

HOMA et al. (1986) caracterizaron 100 mutantes de *Herpes simplex* tipo 1 resistente a la neutralización con una batería de anticuerpos monoclonales frente a la glicoproteína gC.

Estudiaron fundamentalmente seis mutantes y sobre todo la mutante gC44, en la que el peso molecular de la gC era igual que la del virus salvaje.

Sin embargo, la mutante gC44 presentaba una mutación en un punto, un cambio en el aminoácido 329 de la gC, serina por fenilalanina.

La gC-2 ha sido caracterizada bioquímicamente. BALACHANDRAN et al. (1982) identificaron tres polipéptidos de 60.000 (precursor), 66.000 y 79.000 daltons en células Vero infectadas con la cepa 333 de VHS-2.

ZEZULAK y SPEAR (1984) en células Hep-2 infectadas con la misma cepa observaron que el péptido presursor aparecía como un doblete de 67.000 y 69.000 daltons y que la forma madura poseía una movilidad electroforética correspondiente a 75.000 daltons.

Los péptidos no-glicosilados de gC-1 presentaban mayor peso molecular, 85.000, 110.000 y 130.000 daltons respectivamente (SPEAR et al. 1976).

Estudios llevados a cabo mediante tratamiento con endo- β -N-acetylglucosaminidasa H y N-acetilgalactosamina oligosacaridasa demostraron que gC-2 contiene en su forma madura oligosacáridos O-linked y N-linked (ZEZULAK y SPEAR, 1984).

También han sido descritas ambas formas de oligosacáridos en el caso de gC-1 (WENSKE et al. 1982; JOHNSON y SPEAR, 1983).

ROSS et al. (1985) desarrollaron un ensayo inmunológico (ELISA) para comprobar la existencia de anticuerpos en sueros humanos frente a los lugares antigénicos (glicoproteína C y D) de VHS-1 y 2, reconocidos ambos con anticuerpos monoclonales. Detectaron anticuerpos capaces de bloquear a los anticuerpos monoclonales en los sueros humanos, y esta inhibición estaba correlacionada con una historia de infecciones herpéticas en los sujetos.

La unión de los anticuerpos monoclonales (17 α C1) a la glicoproteína C de VHS-2 fue inhibida por los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes con herpes genital recurrente, y sin embargo la unión de los anticuerpos monoclonales a la gC de VHS-1 fue inhibida por el suero de los pacientes infectados con VHS-1 ó VHS-2.

Las aplicaciones posteriores de este ELISA competitivo permitirá definir el papel de los lugares antigénicos de VHS.

PEREIRA (1982) obtuvo un hibridoma productor de un monoclonal frente a la glicoproteína gC (HC1) tipoespecífico y con capacidad neutralizante apareciendo inmunofluorescencia con VHS-1 y no con VHS-2, ni con la mutante VHS-1 (MP) que no expresa la gC.

1.3.2.2.- Glicoproteína gD

EISENBERG et al. (1982) caracterizaron 17 anticuerpos monoclonales frente a gD de VHS-1 (gD-1) y de VHS-2 (gD-2).

Los anticuerpos reconocían 8 determinantes de gD, basándose en las diferencias en la radioinmuno precipitación y en la capacidad neutralizante.

Los determinantes se distribuyeron de la siguiente forma:

- Tres específicos de gD-1
- Uno específico de gD-2
- Cuatro tipocomunes

El tratamiento de la glicoproteína gD-1 con la proteasa V8 de *S. aureus* y el efecto de su unión con los fragmentos a los anticuerpos monoclonales mostró que un fragmento de 38.000 daltons permanecía unido a los anticuerpos monoclonales de tres grupos distintos. Este fragmento contenía un determinante tipo común y dos determinantes tipos específicos. Un fragmento de 12.000 daltons permanecía unido al grupo de anticuerpos tipocomunes. El análisis triptico de los péptidos reveló que el fragmento de 12.000 daltons constituía una porción del fragmento de 38.000 daltons enriquecido en arginina.

EISENBERG et al. (1982) obtuvieron un anticuerpo monoclonal HD-1 tipocomún, que fue utilizado para purificar la gD mediante cromatografía con Sephara rosa unida al anticuerpo monoclonal HD-1.

Esta proteína purificada inducía títulos elevados de anticuerpos neutralizantes tipocomunes en los ratones.

El análisis de los aminoácidos indicó que gD-1 y gD-2 poseen una composición en aminoácidos semejante pero no idéntica.

JOHNSON y SMILEY (1985) con un anticuerpo monoclonal (178A3) específico de gD-2 y cedido por RAWLS y BACHETTI estudiaron el movimiento de la gD-2 a la superficie de la célula infectada observando que este movimiento es enlentecido ó retardado, acumulando la glicoproteína en la membrana nuclear, probablemente debido a las interacciones con otros componentes estructurales víricos.

SNIRIVAS et al. (1986) investigaron la localización de las glicoproteínas de VHS-2 en las células epiteliales infectadas por dicho virus con un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a las glicoproteínas mayores.

Para ello fueron utilizados los monoclonales siguientes: 178 B3 (anti-gB), 17αC1 (anti-gC2), 188B3 (anti-gD), 178 C2 (anti-gE) y 13αC5-All (anti-gG) obtenidos por BALACHANDRAN et al. (1981; 1982; 1985).

Las monocapas de células Vero fueron infectadas con VHS-2 y examinadas mediante inmunofluorescencia con y sin EGTA (etilenglicol-bis - 8 aminoetil eter) que abre los complejos de unión permitiendo que penetren los anticuerpos monoclonales en la membrana basolateral. Los primeros estudios fueron efectuados con el anticuerpo monoclonal anti-gD y luego con los restantes, observándose una inmunofluorescencia clara en las células infectadas por VHS-2 y no en los controles. Tras el tratamiento con EGTA apareció un patrón de fluorescencia también basolateral.

Los resultados indican que las glicoproteínas de VHS-2 se expresan de forma preferencial en la membrana basolateral de las células epiteliales polarizadas.

Estos estudios fueron repetidos con el monoclonal anti-gD2 marcado con ferritina, es decir utilizando la inmunomicroscopia electrónica, observándose que tanto en las células infectadas por VHS-1, como en las infectadas por VHS-2, el anticuerpo marcado con ferritina se localizaba en la membrana basolateral.

No se sabía si las partículas víricas eran transportadas también de forma direccional en las células epiteliales polarizadas.

Estos autores observaron que a las 10 horas postinfección las vesículas conteniendo partículas víricas estaban localizadas en el citoplasma de las células infectadas y la mayoría de estas vesículas, así como las partículas víricas ya liberadas se encontraban localizadas en las membranas basolaterales.

No está claro todavía si las vesículas organizadas ó reguladoras implicadas en el transporte de las glicoproteínas víricas a la membrana basolateral son semejantes a las implicadas en el transporte de las partículas víricas.

Dicho transporte se realiza en el interior de estructuras vesiculares, y es posible que estas membranas vesiculares contengan glicoproteínas víricas que dirijan la salida de las partículas víricas a la región basolateral de las células infectadas.

RAWLS et al. (1984) aislaron de un paciente con una lesión recurrente herpética nasal una cepa de VHS-1 que reaccionaba con un anticuerpo monoclonal que reconocía un determinante tipoespecífico de la glicoproteína gD de VHS-2 (178A3) y no reaccionaba con los anticuerpos monoclonales que reconocen otros lugares tipoespecíficos de VHS-2.

El análisis de la secuencia del gen que codifica la glicoproteína gD de la cepa aislada reveló la existencia de una alteración en un nucleótido, cambiando el codón de la asparragina por el de histidina en el aminoácido 97 de esta glicoproteína gD.

La histidina se localizó en esta posición en la glicoproteína gD de VHS-2. De ahí que el anticuerpo monoclonal 178A3 reconozca un epitopo localizado en esta región de la glicoproteína.

SHOWALTER et al. (1981) obtuvieron anticuerpos monoclonales frente a una glicoproteína de VHS-1 de 110.000 daltons de peso molecular, codificado en la región UL distinta de las descritas previamente, siendo designada gH1 (BUCKMASTER et al. 1984).

MARSDEN et al. (1984) identificaron una glicoproteína de VHS-2 distinta de gD y gE y codificada en la región Us del genoma de VHS-2 de 92.000 daltons de peso molecular. Probablemente corresponde al polipéptido designado como gG2 por ROIZMAN et al. (1984).

BALACHANDRAN y HUTT-FLETCHER (1985) obtuvieron un hibridoma 13αC5-1-A-11 que inmunoprecipita dos péptidos de pesos moleculares 108.000 y 120.000 daltons a partir de extractos de células BHK21 (Baby hamster Kidney).

El anticuerpo monoclonal AP-1 reacciona con una molécula de 92.000 daltons de peso molecular (gG) Estudios de absorción cruzada con ambos anticuerpos, reaccionando los dos con los mismos péptidos, sugieren, pues que el péptido de 120.000 daltons es un precursor parcialmente glicosilado de gG (pgG) que puede ser escindido en un péptido de 74.000 daltons (pgG2) que posteriormente es procesado a 108.000 daltons (gG).

Un anticuerpo monoclonal LP10 precipita una glicoproteína de 59.000 daltons de peso molecular de virus Herpes simplex tipo 1 purificado (RICHMAN et al. 1986).

Aunque esta glicoproteína es semejante en peso molecular a la gD es menos abundante tanto en los viriones como en las células infectadas, migrando más rápidamente su forma precursora e incorporando glucosamina pero no manosa y presentando un precursor más estable en las células tratadas con tunicamicina.

Esta glicoproteína es codificada en la región Us (unidades 0.892 a 0.924) excluyendo a gD, siendo distinta de la ya caracterizada en Herpes simplex tipo 1 (gB, gC, gD, gE y gH1).

SEIGNEURIN et al. (1983) obtuvieron un anticuerpo monoclonal humano, a partir de una línea celular de médula ósea, frente a la glicoproteína gD de VHS.

1.3.3.- Variación antigénica entre cepas

Desde el reconocimiento de la existencia de dos serotipos de virus Herpes simplex, Herpes simplex tipo 1 (VHS-1) y Herpes simplex tipo 2 (VHS-2) (DOWDLE et al. 1967) existen evidencias claras de la existencia de diferencias intratípicas demostrables por la morfología de placas (EJERCITO et al. 1968), serología (SETH et al. 1974), análisis estructural de polipéptidos y diferencia en la secuencia de nucleótidos de su ADN (HAYWARD et al. 1975).

Un estudio realizado por PEREIRA et al. (1976) de 53 aislamientos de VHS-1 procedente de Italia, Uganda, Sudáfrica y varios lugares de los Estados Unidos mostró variabilidad en la movilidad electroforética de siete polipéptidos estructurales, permitiendo subdividir los aislamientos en al menos 19 grupos.

Se demostró que la variabilidad en la movilidad electroforética de los polipéptidos no podía atribuirse a los artefactos producidos durante la purificación, electroforesis o en la propagación del virus fuera del huésped humano.

Por estas razones se concluyó (PEREIRA et al. 1976) que la movilidad electroforética de los polipéptidos estructurales podría utilizarse como un marcador epidemiológico de las infecciones por VHS.

Estudios paralelos (BUCHMAN et al. 1978) mostraron que el análisis de la secuencia de nucleótidos del ADN también puede ser un indicador de la variedad intratípica, lo que junto con la facilidad de realización, se ha convertido actualmente este método en el más usado en los estudios epidemiológicos (BUCHMAN et al. 1978).

Los anticuerpos monoclonales tanto tipo-específicos como tipo-comunes están siendo utilizados, como reactivos para el tipado serológico de los aislamientos de VHS. BUCKMASTER et al. (1984) y PEREIRA et al. (1982), observaron la existencia de distintas cepas dentro de cada serotipo que variaban en sus determinantes antigénicos.

Dichas variantes fueron identificadas debido a la inexistencia de reactividad con anticuerpos monoclonales frente a un antígeno específico, al igual que muestran otros estudios con otros virus (WINKTOR y KOPROWSKI, 1978; YEDWELL et al. 1979).

PEREIRA et al. (1984) analizaron con un panel de anticuerpos monoclonales frente a distintas glicoproteínas víricas aislamientos de Herpes simplex. Los resultados preliminares de 86 cepas mostraron que el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma HCI reacciona con la glicoproteína gC del VSH-1, no reaccionando dicho monoclonal con un 2% de las cepas identificadas como VSH-1 con antisueros polivalentes.

Un 30% de las cepas tipadas como VSH-2 no reaccionaban con el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma H233 frente a las glicoproteínas gA y gB de ambos serotipos.

Todas las cepas de este estudio reaccionaron con el anticuerpo monoclonal tipocomún, producido por el hibridoma HD1 frente a la glicoproteína gD.

HOLLAND et al. (1983) realizaron un estudio utilizando un panel de anticuerpos monoclonales frente a virus Herpes simplex tipo 1 específicos para la glicoproteína gC y gB relacionando con ellos mutantes víricas resistentes (mar), denominando así a aquellas cepas víricas que no se neutralizaran con dichos anticuerpos monoclonales.

Utilizaron dos anticuerpos monoclonales uno frente a la glicoproteína gC (C5) y otro frente a la glicoproteína gB (B1) enfrentándolos a cuatro mutantes de la cepa vírica de VHS-1 (KOS 321). Consiguieron esta mutante vírica, mediante la acción de dos agentes mutágenos, la BUdR (5-bromo-2'deoxiuridina) y la NG (N'nitro-N-nitro-soguanidina) y otros de forma espontánea. Las mutaciones afectaban a determinantes antigénicos de las glicoproteínas sin alterar las propiedades de la misma (HOLLAND, 1983).

Se sabe que los diferentes anticuerpos monoclonales específicos para una misma glicoproteína reconocen distintos lugares ó antígenos de la misma. Por lo tanto una mutante mar seleccionada por la ausencia de neutralización con un determinado anticuerpo monoclonal, puede no ser resistente frente a otro específico para la misma glicoproteína.

HOLLAND et al. (1983) observaron en un estudio que la frecuencia de mutantes espontáneas resistentes a un anticuerpo monoclonal frente a la glicoproteína gC es elevada. Estos autores han encontrado que existen al menos dos lugares antigénicos en la glicoproteína C.

De estos estudios con anticuerpos monoclonales se deducen los siguientes hechos:

- . Las cepas de VSH varían intratípicamente a nivel de determinantes inmunológicos específicos de sus glicoproteínas, y que por tanto aparecen variantes no reactivas con anticuerpos monoclonales específicos, pudiendo así seleccionarse dichas variantes antigénicas (PEREIRA, 1984).
- . Los determinantes antigénicos existentes en las glicoproteínas víricas no son específicos frente a todas las cepas de un serotipo, de ahí que para realizar el tipado de un aislamiento vírico debemos utilizar un panel de anticuerpos monoclonales tipo específicos (PEREIRA, 1984).
- . La extraordinaria variabilidad antigénica observada en los aislamientos de virus Herpes simplex, fundamentalmente VSH-1.

Estas variaciones han ocurrido a través de los años y se han acumulado y persistido en la población humana. Implícita en esta hipótesis está la noción de que una cepa de VHS no desplaza a otra en la población como es el caso de Influenzavirus (BUCKMAN et al. 1978).

Trás la infección primaria, el virus puede permanecer latente en el organismo y las recurrencias periódicas sirven como fuente de infección para las personas en contacto íntimo con el portador (BUCKMAN et al. 1978).

Aunque sabemos que existen variantes antigénicas distintas del VHS en la población humana, se desconoce si una mutación antigénica rápida puede aparecer durante el curso de la infección vírica (HOLLAND et al. 1983).

El hecho de que las recurrencias sean comunes a pesar de la existencia de anticuerpos neutralizantes en el suero y de células inmunitarias efectoras sugiere que el virus VSH presenta un mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria. Durante los ciclos de recurrencia está sometido a una presión inmunológica selectiva, pudiendo dar lugar a alteraciones en la estructura antigénica del virus (HOLLAND et al. 1983).

Así pues, estas variaciones antigénicas pueden ayudarnos a entender mejor los fenómenos de latencia y recurrencia propios de este virus.

Sin embargo, se necesitan estudios sobre la estructura antigénica de las glicoproteínas que permitan identificar los lugares antigénicos críticos y los mecanismos de variación, puntos esenciales para comprender la interacción virus - sistema inmune.

1.3.4.- Propiedades electroforéticas e inmunológicas de las glicoproteínas

PEREIRA et al. (1981) observaron en estudios realizados con anticuerpos monoclonales que las glicoproteínas víricas se procesan de forma diferente en las distintas líneas celulares.

La movilidad electroforética de las glicoproteínas ya maduras en células Hep-2 (Human epidermoid carcinoma nº 2) es significativamente menor de las glicoproteínas correspondientes (gA, gB y gD) producidas en células Vero.

El anticuerpo monoclonal H368 frente a la glicoproteína gA y gB de VHS-2 reacciona solo con el virus homólogo.

El anticuerpo monoclonal H368 (PEREIRA et al. 1982) reacciona solo con las glicoproteínas gA y gB expresadas en las células Hep-2 y no cuando se utilizan como células huésped del virus, las células Vero.

También se ha observado que los lisados de células Vero de células infectadas con VHS-2 presentan tres polipéptidos adicionales con movilidades electroforéticas mayores que la glicoproteína gD, y que reaccionan con anticuerpos monoclonales frente a gA y gB. El lisado de células Hep-2 no presenta dichos polipéptidos.

Estos polipéptidos han sido denominados como gA y gB reactivos antígenos (A + B) r.

1.3.5.- Protección frente a enfermedades

El papel de los anticuerpos séricos en la inmunidad frente a las infecciones por virus Herpes simplex tipo 1 (VHS-1) ó tipo 2 (VHS-2) no es todavía muy conocido.

Algunas evidencias sugieren que la inmunidad humoral es ineficaz en el control *in vivo* de las infecciones por VHS y se sabe que los episodios recurrentes de infecciones herpéticas, tanto orales como genitales, ocurren en presencia de anticuerpos (CEN--TIFANTO et al. 1970). Incluso en infecciones graves como las encefalitis por virus Herpes simplex tipo 1, es frecuente encontrar una historia previa de herpes labial (LEIDER et al. 1965).

Por otra parte, los estudios de transferencia pasiva de sueros hiperinmunes frente a VHS-1 han demostrado la incapacidad aparente de proteger frente a la infección por VHS-1 en animales inmunocomprometidos (OAKES, 1975).

Sin embargo en ausencia de inmunosupresión, la transferencia pasiva de suero hiperinmune frente a VHS-1 ó VHS-2 puede inhibir la diseminación vírica y reducir la gravedad de la enfermedad neurológica cuando el suero hiperinmune se administra en el momento apropiado postinfección (BARON et al. 1975; McKENDALL et al. 1979).

Los estudios *in vitro* (SHORE et al. 1976) - indican que los mecanismos de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) participan también en la destrucción de las células infectadas por VHS.

Se sabe que los anticuerpos dirigidos frente a las glicoproteínas específicas, expresadas en la membrana de las células infectadas por VHS-1 pueden contribuir a la lisis de las células infectadas en cultivo (HEINE et al. 1972).

Sin embargo, se dispone de muy escasa información acerca de la capacidad de protección in vivo de los anticuerpos dirigidos frente a los antígenos específicos inducidos por el virus durante la infección celular. Dicha información es esencial para producir una vacuna que permita el control de las infecciones herpéticas en humanos (DIX et al. 1981).

Los estudios realizados con anticuerpos monoclonales dirigidos frente a las glicoproteínas de virus Herpes simplex pueden contribuir a dicho conocimiento. Así, DIX et al. (1981) investigaron la efectividad de los anticuerpos monoclonales dirigidos frente a las glicoproteínas víricas en la protección de ratones frente a una enfermedad neurológica inducida por la inoculación en la almohadilla plantar con VHS-1 y VHS-2. En este modelo la diseminación vírica es neural y no sanguínea (KRISTENSSON et al. 1971).

La evolución de la enfermedad aguda en los ratones es la siguiente. Trás la inoculación, el ratón sufre una monoplejía ipsilateral al quinto día postinoculación y dos días después la enfermedad progresa a una paraplejía flácida con mielitis ascendente que lleva a la muerte en unos siete ó diez días cuando la mielitis progresa.

Los anticuerpos monoclonales empleados en este estudio de DIX et al. (1981) estaban dirigidos frente a la glicoproteína C (gC) de 130.000 daltons ó frente a la glicoproteína D (gD) de 59.000 daltons habiendo sido previamente designados como HCl y HD1, respectivamente (PEREIRA et al. 1980).

El anticuerpo HCl, neutraliza in vitro el VHS-1, pero no el VHS-2, mientras que el anticuerpo monoclonal HD1 neutraliza in vitro tanto a VHS-1, como a VHS-2.

Para estudiar el efecto de los anticuerpos monoclonales inocularon grupos de ratones con 10.5.9 UFP de VHS-1 en la almohadilla plantar, a los que 2 horas antes se les había administrado 0.2 ml del anticuerpo monoclonal por vía intraperitoneal. Como control utilizaron un grupo de ratones a los que se administró un suero hiperinmune de conejo frente a VHS-1 y otro grupo al que se administró suero de conejo normal sin inmunizar. La experiencia se repitió administrando los anticuerpos monoclonales y los sueros control 24 horas postinoculación.

Los resultados mostraron que los anticuerpos monoclonales HC1 y HD1 presentaban también capacidad neutralizante in vivo, puesto que los ratones a los que se administró el anticuerpo monoclonal tanto 2 horas después de su inoculación como 24 horas después no padecían enfermedad neurológica alguna. Tampoco la mayoría de los ratones a los que se administró un suero hiperinmune presentaban enfermedad, mientras que murieron todos los del grupo control inoculados con suero de conejo sin inmunizar.

Cuando se inoculó a otros grupos de ratones con VHS-2 (10.6 UFP) también en la almohadilla plantar 2 horas después y 6 horas antes que el anticuerpo monoclonal HC, específico frente a la glicoproteína gC, se observó que no tenía capacidad neutralizante frente al VHS-2, es decir es tipospecífico. El anticuerpo monoclonal HD1 frente a la glicoproteína gD es común a los dos tipos víricos, pues posee capacidad neutralizante in vivo también frente al VHS-2. Sin embargo, el periodo de tiempo postinoculación en el que es eficaz administrar el anticuerpo se acorta en el caso del VHS-2 a 6 horas en comparación con las 24 horas del VHS-1.

Unos resultados parecidos obtuvieron OAKES y ROSEMOND-MORNBEAK (1978) con una supervivencia de un 70% de los ratones infectados con VHS-2 cuando se administraba suero hiperinmune de conejo frente a VHS-2 24 horas postinfección, siendo la supervivencia de un 100% al administrarlo 8 horas postinfección.

Las bases de estas diferencias temporales en la eficacia de los anticuerpos frente a VHS-1 y VHS-2 no está aclarada (McKENDALL, 1980).

McKENDALL (1980) comparó la neurovirulencia de VHS-2 y VHS-1 observando que a las mismas dosis tras la inoculación periférica, es más virulento el VHS-2, proponiendo que debe tenerse en cuenta que no sólo interviene la dosis sino también el grado de replicación vírica.

BALACHANDRAN et al. (1982) administraron anticuerpos monoclonales frente a glicoproteínas específicas del VHS-2 (gC, gA/B, gD, gF y gE). Ninguno de estos anticuerpos monoclonales neutralizaba in vitro al VHS-2. En presencia de complemento de cobaya lisaban las células infectadas con VHS-2 en varios grados (< 1:10 a > 1:5260), variando también los títulos en el ensayo de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) (< 1:30 a 1:10.000).

Al inocular 3 grupos de 20 ratones Balb/c - cada uno con 2 x 10.6 UFP de VHS-2 correspondiente a 10 veces la dosis letal 50 en la almohadilla plantar, e inyectando simultaneamente por vía intraperitoneal a cada ratón 0.5 mililitros de una mezcla de los antiucuerpos monoclonales citados sólo un 30% de los ratones murieron, en contraste con el 10 % de los que murieron en el grupo control que había recibido sólo - virus.

Al administrar un anticuerpo monoclonal con creto a cada grupo de ratones, es decir tantos grupos de ratones como anticuerpos estudiados (gC, gA/B, gD, gE, gF) 3 horas antes de la inoculación de 2 x 10.6 - UFP de VHS-2 en la almohadilla plantar, los anticuerpos frente a la gE protegían a un 35% de los ratones, mientras que los anticuerpos frente a la glicoproteína gC a un 55%. Los anticuerpos frente a las glicoproteínas gF, gD y g A/B fueron capaces de proteger entre un 70 y 75 % de los ratones.

De estos estudios se deduce que ninguna - glicoproteína parece ser la única fuente de antígenos de importancia capital en la respuesta inmunitaria -- frente a VHS-2.

Sin embargo, DIX et al. (1981) inoculando - una cepa de VHS-1 no productora de glicoproteína gC - (cepa MP) a ratones Balb/c y administrando un suero - de conejo hiperinmune frente a VHS-1, demostraron que la glicoproteína gC es el mayor inmunógeno de la superficie de las células infectadas, jugando un papel crítico en la respuesta inmunitaria humoral ya que - todos los ratones inoculados murieron.

OAKES y LAUSCH (1984) estudiaron el efecto - de los anticuerpos monoclonales sobre la multiplicación del VHS-1 en el ganglio trigémino. Para ello ratones de cuatro semanas de edad fueron infectados en una abrasión de la córnea con Herpes simplex tipo 1. Cuarenta y ocho horas postinfección el ganglio trigémino ipsilateral al ojo infectado fué extraído y cultivado en medio mínimo esencial (MEM). Los ganglios - fueron subdivididos en tres grupos.

Un grupo de ganglios fué cultivado con una mezcla de anticuerpos monoclonales sin actividad neutralizante vírica y los dos grupos restantes, fueron incubados, uno con un suero hiperinmune frente a VHS-1 y otro con un suero anti-Salmonella O para actuar como control.

Tanto el antisuero convencional como la mezcla de anticuerpos monoclonales específicos frente a las glicoproteínas de VHS-1 redujeron en un 90% la cantidad de viriones encontrados tras cuatro días de incubación, con respecto a la cantidad de viriones existentes en los ganglios control.

Cuando fueron probados los anticuerpos monoclonales específicos por separado, se encontró que eran mucho menos eficaces que la mezcla de los mismos. Parece ser que la inhibición de la replicación vírica es mayor, cuando se fijan anticuerpos frente a varios epitopos del virion.

Esta suspensión del crecimiento vírico en el cultivo de los ganglios podría ser debida a la capacidad de los anticuerpos de prevenir la diseminación vírica desde las células infectadas a las células no-infectadas ó porque se inhiba la replicación vírica intracelular. Trás la inoculación de VHS-1 en los ganglios trigéminos normales, estos son incubados con los anticuerpos monoclonales y los anticuerpos anti-Salmonella como control. Trás 48 horas de incubación se recogieron en el control 1000 UFP/cultivo y sólo 100 UFP/cultivo en el incubado con anticuerpos monoclonales.

Estos resultados confirman que los anticuerpos pueden suprimir la replicación intracelular del virus, pero sin embargo, no pueden eliminarse de los ganglios sensitivos. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual los anticuerpos inhiben la replicación vírica. Parece ser que ni la capacidad neutralizante de los anticuerpos, ni la lisis mediada por el complemento ya que en el modelo se usa suero inactivado ni la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos ya que los cultivos no contienen células efectoras, tienen importancia en la supresión de la replicación vírica, sino que sólo la interacción entre los anticuerpos y las células infectadas es suficiente en dicha supresión (OAKES y LAUSCH, 1984).

FUJINAMI y OLDSTONE (1979) informaron ya de un fenómeno similar con el virus del sarampión con - alteración de polipéptidos víricos por acción de antiu cuerpos específicos.

Por todos los resultados citados se deduce que son necesarias más investigaciones para conocer - el papel de las glicoproteínas víricas de Herpes sim- plex en la respuesta inmunitaria y la capacidad de - los anticuerpos monoclonales de proteger a los rato-- nes inoculados con VHS de la enfermedad aguda neuro-- lógica inducida por este virus y el papel que pudie-- ran desempeñar tanto las glicoproteínas como los an-- ticuerpos específicos de ellas en la latencia vírica.

2.- HIPOTESIS DE TRABAJO

Por el interés en profundizar en los conocimientos existentes del virus *Herpes simplex* nos hemos propuesto caracterizar las proteínas de ambos tipos 1 y 2, para encontrar proteínas específicas de cada uno de ellos.

La especificidad de los anticuerpos monoclonales hacen de ellos un instrumento muy útil en el campo de la investigación básica y también aplicada en el diagnóstico de los procesos infecciosos para detectar antígenos en las muestras ó diferenciar microorganismos a través de sus componentes, entre otras muchas aplicaciones.

La utilización de los anticuerpos monoclonales en la investigación básica está permitiendo no sólo el conocimiento de la estructura proteica del virus *Herpes simplex*, sino conocer la función biológica patogénica e inmunológica de determinados componentes hasta ahora desconocidos.

Así los anticuerpos monoclonales específicos frente a los virus *Herpes simplex* tipo 1 y 2 están siendo la base fundamental de los estudios de su estructura glicoproteica (PEREIRA et al. 1984), tanto para conocer sus determinantes antigénicos comunes de especies, como tipo-específicos (BALACHANDRAN et al. 1981). Además tales anticuerpos están permitiendo estudiar las variaciones antigénicas existentes entre las distintas cepas víricas aisladas mediante el estudio de las diferencias existentes en los antígenos de un mismo tipo con anticuerpos monoclonales que a pesar de reaccionar con una proteína de un tipo, no reacciona con todos los aislados del mismo tipo (PEREIRA et al. 1982).

Por otra parte, los anticuerpos monoclonales permiten no sólo caracterizar tales estructuras víricas, sino también estudiar su función en la infección y en la respuesta inmunitaria frente a estos virus.

El diagnóstico de las infecciones por virus *Herpes simplex* es otra de las aplicaciones, ya que los anticuerpos monoclonales permite no sólo detectar el virus en las lesiones dermatológicas (VOLPI et al. 1983), sino además identificarlo en los cultivos en los que aún no haya aparecido el efecto citopático característico, determinándose al mismo tiempo el tipo de virus *Herpes simplex* implicado (BUCKMASTER et al. 1984).

En este sentido nos proponemos:

- 1.- Investigar las proteínas específicas de virus -
Herpes simplex tipo 1 y 2 para encontrar aquellas
que permitan diferenciar entre ambos tipos de vi-
rus, por ser específicas desde el punto de vista
antigénico de cada uno de ellos.
- 2.- Obtener anticuerpos monoclonales frente a tales -
proteínas de virus Herpes simplex tipo 1 y 2, pa-
ra encontrar las proteínas específicas de cada -
tipo y que no sean comunes antigénicamente con -
las del otro tipo.
- 3.- Caracterizar los anticuerpos monoclonales, obteni-
dos estudiando la clase de inmunoglobulinas a la
que pertenecen, título y actividad específica.
- 4.- Caracterizar las proteínas ó glicoproteínas víri-
cas mediante electroforesis en gel de poliacrila-
mida de tales proteínas y posterior Western-blot
en membranas de nitrocelulosa para efectuar enzi-
moinmunoanálisis sobre membrana con los anticuer-
pos monoclonales obtenidos.
- 5.- Aplicar los anticuerpos monoclonales obtenidos -
para detectar los aislamientos de virus Herpes -
simplex determinando el momento en que cada uno -
de los anticuerpos monoclonales obtenidos puede -
detectar la proteína para la que es específico -
inoculando cultivos celulares con virus Herpes -
simplex y examinando en horas sucesivas postinocu-
lación la capacidad para detectar el aislamiento
del virus.
- 6.- Investigar la utilidad de los anticuerpos monoclo-
nales obtenidos para identificar y tipar aisla-
mientos de VHS, determinando además si existe al-
gún aislamiento de VHS que no sea detectado ó -
identificado por tales anticuerpos monoclonales.
- 7.- Estudiar si existe reacción cruzada antigénica en-
tre las proteínas encontradas por reacción con -
los anticuerpos monoclonales obtenidos, con las -
proteínas separadas de otros virus emparentados -
como Citomegalovirus, virus Varicella-Zoster y vi-
rus de Epstein-Barr.

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- Antígenos utilizados (Virus Herpes simplex tipos 1 y 2)

3.1.1.- Cepas utilizadas

. Herpes simplex tipo 1

Hemos utilizado la cepa de Virus Herpes simplex tipo 1 VR3 (McIntyre) suministrada a nuestro laboratorio por el North Manchester Reference Virus Laboratory (Great Britain).

. Herpes simplex tipo 2

Las experiencias fueron realizadas utilizando la cepa de Herpes simplex tipo 2 MS suministradas por el Prof. U. Krech (St.Gallen, Switzerland).

3.1.2.- Propagación del virus en cultivos celulares

Las cepas fueron recibidas liofilizadas, siendo rehidratadas con medio de cultivo celular MEM (Mininum Essential Medium. Flow) añadiendo 2 ml a cada vial.

Una fracción de 1 ml fué distribuida en alicuotas de 100 microlitros (criotubos. Nunc) y congelada en nitrógeno líquido para conservar la cepa original. El resto fué inoculado en 2 frascos de cultivos celulares de 25 cm cuadrados de superficie que contenían una monocapa de células Vero.

3.1.2.1.- Preparación de la monocapa de células Vero para la inoculación vírica

Las células Vero fueron suministradas por el Servicio de Virología del Instituto Pasteur (París) y mantenidas en nuestro laboratorio por pases sucesivos utilizando medio MEM (Flow).

La composición del medio MEM (400 ml) es la siguiente:

. Mininum Essential Medium 10x (Flow, ref. 14-170-49)	_____	40 ml
. Agua bidestilada estéril	_____	300 ml
. Glutamina (200 mMol) (Flow ref. 16-801-49)	__	4 ml
. Penicilina - estreptomycin	_____	4 ml
. Suero bovino fetal (Gibco ref. 011-6290)	___	40 ml

El medio contiene un indicador de pH, el rojo de fenol, que vira a amarillo cuando éste se acidifica por la existencia de los productos del metabolismo celular.

Para prevenir la contaminación por hongos - en alguna ocasión hemos añadido anfotericina B (Flow ref. 16-723-46) a una concentración máxima en el medio de 250 mcg/ml.

Los pases sucesivos de las células fueron - realizados cuando existía una monocapa celular completamente formada, unos dos días después del pase, cuando las células eran distribuidas a razón de 100.000 - células por mililitro de medio. La morfología y confluencia celular fue observada utilizando un microscopio invertido (Leitz mod. Diavert) (Fig. 5).

Para efectuar el pase de células de un frasco a otro el medio de cultivo era retirado del que - habían crecido las células, lavándose la monocapa con tampón fosfato salino estéril (PBS) pH 7.3-7.4 y posteriormente añadiendo alrededor de 4 ó 5 mililitros - de una solución de tripsina-verseno estéril que era - mantenida en contacto con la monocapa hasta que las - células comenzaban a separarse unas de otras observándose al microscopio invertido. A continuación la monocapa impregnada en tripsina era mantenida en reposo durante aproximadamente un minuto en estufa a +37°C. El momento de efectuar la recogida de la monocapa se determinó observando el comienzo del despegue de las células de la superficie del frasco.

Las células despegadas fueron recogidas con 5 mililitros de medio MEM con 10% de suero bovino fetal, dejando dos mililitros de medio de cultivo en el mismo frasco y pasando el resto a otro, añadiendo posteriormente más medio MEM con 10% de suero bovino fetal a cada frasco (unos veinte mililitros en cada - uno).

Posteriormente se procedió a incubar los - frascos de cultivo en posición horizontal en estufa a +37°C con atmósfera de 5% de anhídrido carbónico - (Forma Scientific mod. 3157).

La solución de tripsina-verseno se preparó según la siguiente composición:

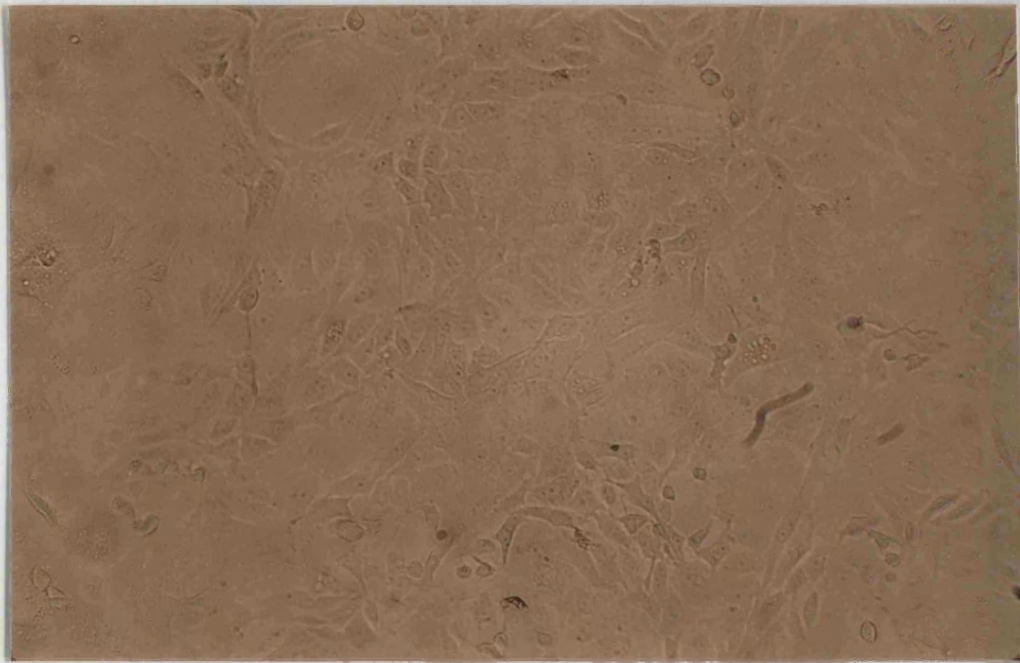


Fig. 5.- Cultivo de células Vero sin infectar por VHS
(10x).

- . Tripsina 1:250 en polvo
(Difco ref. 0152-15) _____ 1.25 g
- . Tampón fosfato sódico (PBS en
tabletas, Oxoid BR 14a) _____ 10 tabletas
- . (Acido etilendiaminotetracético disódico)
(Sigma 285-4) (EDTA Na₂) _____ 0.2 g
- . Agua bidestilada _____ 1000 ml

La mezcla se efectuó en un matraz sobre agitador magnético y fué filtrada a través de una membrana de 0.22 micras de diámetro de poro (filtro Millipore-System C), conservándose distribuida a razón de 20 mililitros en frascos de vidrio y conservada a -40°C.

3.1.2.2.- Inoculación del virus en la monocapa celular

La inoculación del virus en la monocapa celular se realizó mediante el procedimiento de adsorción, es decir, dejando que el virus estuviese en contacto con las células con la menor cantidad posible de medio de cultivo.

Para ello se procedió a retirar el medio de cultivo del frasco de cultivo celular conteniendo las células y su sustitución por 0.5 a 1 mililitro de la suspensión vírica para un frasco de 25 centímetros cuadrados de superficie.

La suspensión vírica se mantuvo en contacto con la monocapa durante 1 hora a +37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y posteriormente previa retirada de la suspensión vírica se procedió a su sustitución por medio de cultivo MEM, con 2% de suero bovino fetal (medio de mantenimiento), pues las células ya no necesitan suero para crecer, sino simplemente para mantener su metabolismo.

El efecto citopático vírico aparecía generalmente a las veinticuatro horas, dependiendo de la cuantía y concentración vírica presente en el inóculo.

La replicación vírica se manifestaba por la aparición de focos de células redondeadas separadas entre sí, birrefringentes y aumentadas de tamaño (Fig. 6).

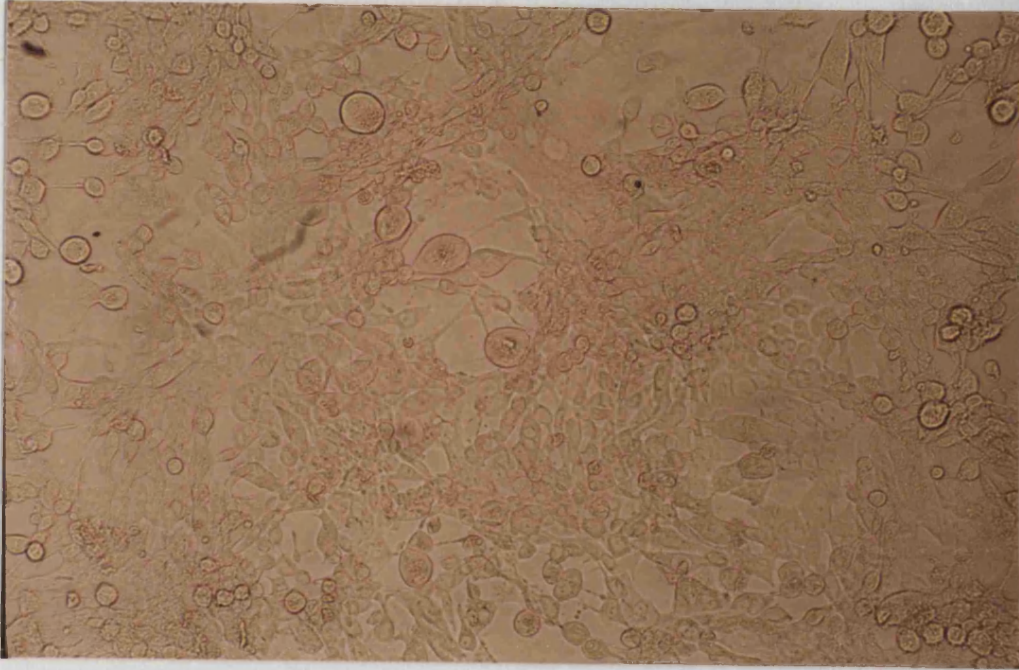


Fig. 6.- Efecto citopático de VHS sobre cultivo de -
células Vero (10x). Observense las células -
redondeadas de mayor tamaño y refringentes -
y algunas células multinucleadas, así como -
la destrucción de la monocapa celular.

Cuando todas las células mostraban apariencia redondeada y se encontraban separadas entre sí, procedíamos a su recogida, ya que es cuando más cantidad de virus existe en el medio de cultivo, no siendo necesaria su tripsinización, puesto que las células se encontraban despegadas del frasco.

Una vez que las células habían sido recogidas se efectuaron 3 ciclos de sonicación de 30 segundos, suspendidas en el medio de cultivo. Estos ciclos pudieron ser sustituidos por 3 ciclos de congelación-descongelación a -70°C .

Para efectuar una purificación de la suspensión vírica que eliminase la mayor parte de los detritus celulares se procedió a sonicar la suspensión y luego a centrifugar a 3000 rpm durante quince minutos.

El sobrenadante conteniendo las partículas víricas fué conservado en alicuotas de 100 microlitros en cada vial de congelación (Nunc). Los viales fueron conservados en nitrógeno líquido (L'air liquide N. DX 55AT).

Todas las manipulaciones en que estaban implicados los cultivos celulares fueron realizadas en campana de flujo laminar y de forma estéril, debiendo utilizarse guantes de goma al manipular las suspensiones víricas, para evitar de esta forma posibles contaminaciones personales.

Una vez se habían replicado los virus utilizados como inmunógenos se procedió a la cuantificación del virus (titulación) existente en la suspensión que sería utilizada posteriormente.

3.1.3.- Titulación vírica. Determinación de la dosis infectante cincuenta (TCID₅₀)

Existen varios métodos para poder titular los virus, inoculación intracerebral ó intraperitoneal a ratones, inoculación en membrana corioalantoidea de huevos embrionarios e inoculación en cultivos celulares. Estos últimos son los más usados y permiten obtener los siguientes tipos de unidades:

- Determinación de la dosis infectante 50 (TCID50) - (Tissue Culture Infectious dose 50)
- Determinación de las unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml).

En nuestro trabajo cuantificamos las suspensiones víricas mediante el cálculo de la dosis infectante 50 (TCID50) para lo cual hemos partido de las partículas víricas existentes en una suspensión original conservada congelada en nitrógeno líquido y a partir de la cual íbamos a realizar todo el resto de las experiencias.

Para efectuar el método hemos utilizado placas de microtitulación (Nunc) de 96 pocillos.

A partir de la suspensión original de virus fueron realizadas siete diluciones de base 10 (10-1 a 10-7) colocando 900 microlitros de medio MEM con suero bovino fetal al 10% en cada uno de siete tubos estériles y 100 microlitros de la suspensión vírica en el primero. Trás su agitación fueron transferidos 100 microlitros del primer tubo al segundo y así sucesivamente hasta llegar al séptimo, cambiando siempre la punta de la pipeta automática entre cada dilución.

Cada una de las diluciones fue ensayada en seis pocillos de la microplaca, ya que cuanto mayor fuese el número de pocillos la titulación sería más exacta.

En cada pocillo fueron distribuidos 50 microlitros de medio de crecimiento celular (MEM con 10% de suero bovino fetal) y 25 microlitros de cada una de las diluciones víricas.

En la última fila de la microplaca (control de células) no fué depositada suspensión vírica, siendo reemplazado el volumen correspondiente por 25 microlitros de medio de crecimiento, ya que este control es utilizado para poder conocer el estado de la monocapa celular sin alterar, es decir como control del estado de las células, y detectar comparativamente el efecto citopático vírico.

A continuación fueron agregados 25 microlitros a cada pocillo de una suspensión de células Vero a una concentración de 3×10^5 células/mililitro, - obtenidas mediante tripsinización de una monocapa celular previamente formada y realizado el recuento en una cámara de Neubauer.

Las microplacas fueron incubadas en estufa a $+37^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de 5% de anhídrido carbónico, - durante 48 horas, procediéndose transcurrido este - tiempo a la lectura de los efectos ocurridos sobre la monocapa.

La lectura de los resultados se realizó - utilizando un microscopio invertido y observando la - existencia de algún foco de efecto citopático vírico en cada uno de los pocillos inoculados.

Durante la lectura se efectuó un contado de los pocillos en los que aparece efecto citopático, - aunque sólo existiese un sólo foco de efecto citopático.

Así por ejemplo, cuando aparecían cinco pocillos con efecto citopático de entre los seis que - pertenecen a la misma dilución vírica, fué expresado 5/6.

Los resultados de las fracciones fueron sumados aplicándose posteriormente la siguiente expresión:

$$\text{logaritmo TCID}_{50} = 1 - 1 (4 - S)$$

siendo S la suma de los resultados de las fracciones.

Así conocemos cual es el título de virus - que poseemos, es decir, cual es la dilución de la sus pensión original a utilizar, en la cual hay cien dosis infectantes cincuenta (existencia de cien partículas víricas aproximadamente).

3.2.- Animales utilizados

3.2.1.- Características y procedencia

Las inmunizaciones fueron efectuadas en ratones Balb/c ya que son singénicos con las células de mieloma que pretendíamos utilizar para las fusiones posteriores.

Estos ratones albinos ofrecieron la ventaja de facilitar la obtención de mielomas, por inoculación intraperitoneal de aceites minerales (pristane ó adyuvante de Freund) y cuyas células han podido ser posteriormente cultivadas in vitro.

Las células P3 x 63 - Ag 8.653 utilizadas por nosotros para obtener los hibridomas son células de mieloma obtenidas de la forma anteriormente citada a partir de ratones Balb/c.

La fusión de estas células debe realizarse con linfocitos singénicos, es decir de sus mismas características genéticas y por tanto procedentes de la misma especie y línea murina.

Los ratones fueron obtenidos inicialmente a partir de Charlie River Breeding Laboratories y distribuidos en España por Panlab, S.L. (Barcelona).

Los ratones fueron recibidos con 5 semanas de edad y unos 15 gramos de peso.

3.2.2.- Mantenimiento y ubicación

Los ratones fueron ubicados en jaulas destinadas al mantenimiento de ratones (Panlab, S.L.), siendo cubetas de macrolon con una reja superior de acero inoxidable, con sistema en V para colocación de alimento y frasco bebedor.

Las dimensiones de las jaulas fueron de 490 x 245 x 150 mm ó bien de 245 x 245 x 150 mm dependiendo del número de animales ubicados en ellas.

Los animales para la cría estuvieron distribuidos en grupos de cuatro hembras y dos machos.

Para inmunizar se utilizaron animales hembras.

Las jaulas (tanto las de ratones inmunizados, como las utilizadas con fines reproductivos) estaban situadas en el estabulario de nuestro laboratorio y para el mantenimiento de las mismas se utilizó la dieta normalizada del estabulario, cuya composición es la siguiente:

- Proteína _____	26 %
- Grasa _____	18 %
- Fibra _____	0.5 %

- Vitaminas:

. Vitamina A _____	30.000	UI/Kg
. Vitamina D3 _____	15.000	UI/Kg
. Vitamina B1 _____	2	mg/Kg
. Vitamina B2 _____	5	mg/Kg
. Vitamina B6 _____	1	mg/kg
. Vitamina B12 _____	0.04	mg/Kg
. Vitamina C _____	100	mg/Kg
. Vitamina E _____	14	mg/Kg
. Vitamina K _____	4	mg/Kg
. Acido nicotínico _____	0.04	mg/Kg

- Aminoácidos:

. Acido pantoténico _____	0.02	mg/Kg
. Metionina _____	100	mg/Kg

- Minerales:

. Calcio _____	9000	mg/Kg
. Fósforo _____	6000	mg/Kg
. Hierro _____	200	mg/Kg
. Manganeso _____	100	mg/Kg
. Zinc _____	100	mg/Kg
. Magnesio _____	100	mg/Kg
. Cobre _____	50	mg/Kg
. Cobalto _____	10	mg/Kg
. Iodo _____	10	mg/Kg

- Antibióticos:

. Neomicina _____	100	mg/Kg
. Estreptomina _____	100	mg/Kg
. Tetraciclina _____	50	mg/Kg

Las jaulas tenían en su fondo una pequeña -
capa de serrín que era cambiada semanalmente.

3.3.- Células de mieloma

Las células de mieloma poseen una forma redondeada y se desarrollan en suspensión sin adherirse a la superficie del frasco, dividiéndose en condiciones óptimas cada 14 a 20 horas.

La línea celular fué obtenida a partir de -
mielomas provocados experimentalmente en ratones -
Balb/c mediante inoculación intraperitoneal de aceites minerales (POTTER, 1972).

3.3.1.- Línea celular utilizada: Características.

Hemos utilizado la línea celular P3 x 63 Ag 8.653, obtenida del Royal Postgraduate Medical School de Londres. Esta línea celular no produce cadenas de inmunoglobulinas y deriva de la línea P3, siendo una mutante defectiva en HGPRT (hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa), lo que permite seleccionar las células híbridas en medio conteniendo hipoxantina, -
timidina y aminopterina (medio HAT) (Fig. 7)

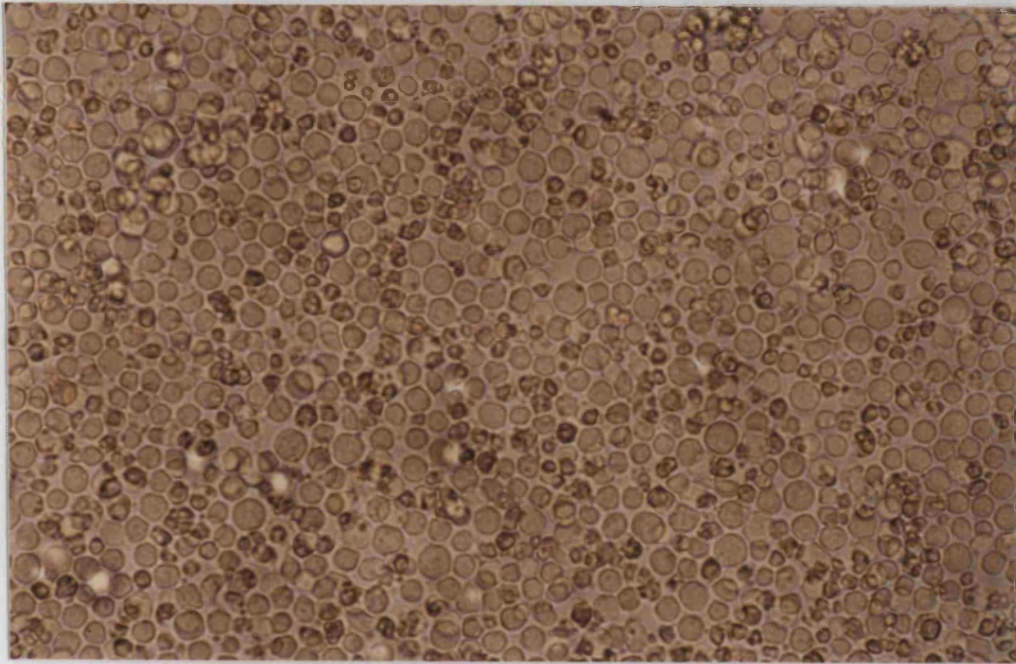


Fig. 7.- Células de mieloma P3 x 63 Ag 8.653 observadas al microscopio (10x).

3.3.2.- Mantenimiento

Las células han sido mantenidas con medio - de cultivo RPMI-1640 (Flow, ref. 10-601-20) adicionán - dole 1% de una solución de penicilina-estreptomicina, 1% de L-glutamina (200 mM), 1% de una solución de 11 mg/ml de piruvato sódico (Flow, ref. 16-820-49), bi-- carbonato sódico al 4.4%, y suero bovino fetal -- (Gibco) al 10% .

El medio RPMI-1640 fué preparado de la si-- guiente forma:

Un sobre conteniendo 10.42 g de medio RPMI- 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico (Flow) - conservado a +4°C fué disuelto en 1 litro de agua bi- destilada, siendo posteriormente filtrado por presión (Filtro Millipore, System C).

A 400 mililitros de medio estéril se añadie - ron las siguientes sustancias:

. Glutamina (Flow, ref. 16-801-49)___	4 ml
. Cristinamicina _____	4 ml
. Bicarbonato sódico al 4.4% _____	10 ml
. Piruvato sódico (11 mg/ml) (Flow, ref. 16-820-49) _____	5 ml

Para prevenir la contaminación por hongos - puede añadirsele 4 mililitros de anfotericina B (250 mcg/ml).

- Preparación de la solución cristinamicina (penicili - na-estreptomicina).

. Estreptomicina sulfato _____	4 g
. Penicilina (Unicilina - (1 x 10.6 UI/ml) (Antibióticos S.A., ref. 109090) _____	600 mg
. Agua bidestilada _____	400 ml

La solución de antibióticos fué distribuída en ampollas con 4 ml a una concentración final de - estreptomicina de 10 mg/ml (= 10.000 mcg/ml) y de - penicilina de 6 mg/ml (= 6.000 mcg/ml).

- Solución al 4.4% de bicarbonato sódico (NaHCO_3H)

Esta solución fué preparada según la siguiente composición:

- . Bicarbonato sódico (NaHCO_3) _____ 44 g
- . Agua bidestilada _____ 1000 ml
- . Unas gotas de solución de rojo de fenol

Para su preparación fué disuelto el NaHCO_3 en agua bidestilada y fué saturada la solución con - anhídrido carbónico (burbujeando el gas durante 15 a 20 minutos). La solución fué distribuída en ampollas de 10 mililitros, y esterilizada en autoclave a - $+120^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

- Solución de rojo de fenol (0.22%)

La solución fué preparada disolviendo 1 g - de rojo de fenol en 50 mililitros de solución 0.5 M - de sosa (NaOH). La solución 0.5 M de Na OH contiene - 1.05 g de NaOH en 50 mililitros de agua bidestilada.

Cuando está completamente disuelto se agrega agua bidestilada hasta 500 mililitros.

- Preparación de la solución anfotericina B

La solución de anfotericina B se preparó según la siguiente composición:

- . Fungizona para cultivo celular (Squibb) _____ 50 mg
- . Agua bidestilada _____ 200 ml

Para su preparación fué disuelta y distribuída en ampollas con 4 mililitros cada una, teniendo una concentración final de 0.25 mg/ml (250 mcg/ml).

- Suero bovino fetal (Gibco)

El suero bovino fetal es un componente muy importante del medio de cultivo celular, puesto que - tiene una gran influencia en el desarrollo de las células de mieloma y también en el porcentaje de híbridos obtenidos tras cada fusión.

Para elegir un lote de suero bovino fetal - que reuniese tales requisitos fueron probados de forma empírica cinco lotes de suero bovino fetal distintos (Gibco), cultivando las células con el mismo medio, pero con distinto lote de suero, partiendo siempre de la misma concentración celular (5×10^5 células/mililitro) y observando tras cuatro días de crecimiento mediante contado celular en cámara de Neubauer el número de células por mililitro existentes - en cada frasco.

Posteriormente probamos también estos mismos cinco lotes de suero con fusiones celulares (apartado 3.5) con células de bazo de ratón sin inmunizar y células de mieloma, para conocer el suero que permitía obtener un mayor porcentaje de hibridomas.

Elegimos para las experiencias restantes el lote de suero bovino fetal que había permitido un mayor crecimiento celular (Gibco ref. 011-6290) y obtener mayor número de células fusionadas.

Una vez preparado el medio fué conservado - a $+4^{\circ}\text{C}$, realizándole una prueba de esterilidad (4 - mililitros de caldo corazón-cerebro y 2 mililitros - del medio). Antes de usar fué mantenido durante 15 - días a $+37^{\circ}\text{C}$, observándose la aparición de turbidez en su caso antes de usar el medio. Cada vez que se - utiliza dicho medio debe realizarse otro control de - esterilidad tras su utilización.

El medio de cultivo celular una vez completo fué conservado a $+4^{\circ}\text{C}$. Si se conserva durante más de quince días, debe añadirse de nuevo glutamina a la concentración necesaria.

Las células P3 x 63 - Ag 8.653 crecen en - suspensión, depositándose en el fondo del frasco de - cultivo celular mantenido en posición vertical en estufa a $+37^{\circ}\text{C}$ con atmósfera de CO_2 al 5%, con el tapón del mismo sin cerrar completamente para permitir la - penetración de anhídrido carbónico.

El medio de cultivo contiene un indicador - de pH, rojo de fenol, que vira del rojo al amarillo - cuando éste se acidifica al acumularse los metabolitos que liberan las células, por lo que debe cambiarse cada 3 ó 4 días.

Para observar las células hemos utilizado un microscopio invertido (Leitz. mod. Diavert) colocando el frasco de células también en posición vertical sobre la platina del mismo.

Los pases de las células han sido realizados retirando el medio, de forma que quedasen sólo unos diez mililitros en el fondo del frasco.

A continuación se procedía al contado de las células en cámara de Neubauer utilizando como colorante vital azul tripano al 2% en tampón fosfato salino.

Las células eran ajustadas a una concentración de 5×10^5 células/mililitro en medio RPMI-1640 con 10% de suero bovino fetal repartiendo el volumen final entre dos frascos de cultivo e incubándolas a $+37^{\circ}\text{C}$ en estufa con atmósfera de anhídrido carbónico al 5%.

La concentración de 5×10^5 células/mililitro es la concentración de crecimiento óptima de estas células.

Cuando no se requería obtener una gran cantidad de células, simplemente se procedía a cambiar el medio de crecimiento aspirando el medio de cultivo con una pipeta estéril y sustituyendo por medio RPMI-1640 nuevo con 10% de suero bovino fetal.

Estas células pueden ser congeladas en nitrógeno líquido, siguiendo la pauta siguiente:

- . Introducir todo el contenido de un frasco en un tubo cónico graduado estéril de 40 ml de capacidad (Bellico).
- . Centrifugar a 1500 rpm durante cinco minutos a $+4^{\circ}\text{C}$
- . Eliminar el sobrenadante.
- . Resuspender el sedimento celular en suero bovino fetal descomplementado, a razón de 10.7 células/mililitro.
- . Repartir 0.5 mililitros en cada vial de congelación (previamente enfriado y mantenido sobre hielo picado).

- . Agregar a cada ampolla 0.5 ml de medio RPMI-1640, -
conteniendo 20% de dimetilsulfoxido (DMSO) (ref. --
Sigma D-5879) estéril y mantenido previamente a -
+4°C. Esta operación se efectúa sobre el hielo.
- . Mantener los viales con las células suspendidas en
medio con suero y DMSO durante 30 minutos sobre el
hielo picado moviéndolo suavemente cada 10 minutos.
- . Proceder a congelar progresivamente, dejando los via-
les envueltos en algodón e introducidos en una caja de
poliestireno durante 24 horas a -70°C. Al día si-
guiente la caja es mantenida durante unas horas so-
bre vapores de nitrógeno líquido y luego se deposi-
tan los viales dentro del nitrógeno líquido.

Cuando necesitábamos descongelar células -
procedíamos del siguiente modo:

- . Descongelar rápidamente un vial a +37°C (baño).
- . Diluir rápidamente a 1:10 en medio RPMI-1640 con -
5% de suero bovino fetal.
- . Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos a +4°C.
- . Resuspender el sedimento celular en el medio habi-
tual de crecimiento celular (RPMI-1640 con 10% de -
suero bovino fetal).
- . Introducir en un frasco pequeño de cultivo celular
(25 centímetros cuadrados Nunc) e incubar en posi-
ción vertical a +37°C en atmósfera de CO₂ al 5% .

3.3.3.- Preparación de las células pre-fusión

Las células de mieloma destinadas a la fu-
sión con linfocitos procedentes del bazo de ratón in-
munizado deben estar en fase de crecimiento exponen-
cial.

Para ello, el día antes de realizar la fu-
sión eran recogidas a partir de un frasco de cultivo,
procediéndose a su recuento en cámara de Neubauer uti-
lizando azul tripano al 2% en tampón fosfato salino -
como colorante vital y resuspendidas en otro frasco -
de cultivo a razón de 3 a 5 x 10⁵ células mililitro.

3.4.- Inmunización de animales

3.4.1.- Antígeno inmunizante

Hemos utilizado como antígeno un cultivo de células Vero infectadas con 1 ml de una suspensión de virus conteniendo (100TCID₅₀), recogiendo las células infectadas a las 16 horas postinoculación.

Para recoger las células fueron tripsinizadas y posteriormente centrifugadas a 1500 rpm durante cinco minutos.

Las células fueron resuspendidas a la concentración de 4×10^6 células/ml.

Posteriormente fueron sometidas a 3 ciclos de sonicación de 30 segundos cada uno y los detritus celulares eliminados centrifugando a 20.000 rpm durante 1 hora.

El sobrenadante conteniendo los viriones y el antígeno vírico fué mantenido congelado a -70°C - hasta ser inoculado intraperitonealmente a los ratones Balb/c.

3.4.2.- Pauta de inmunización

La inmunización se realizó por vía intraperitoneal inoculando semanalmente 0.2 ml en cada ocasión durante cuatro semanas y una última inoculación tres días antes de la fusión. Se utilizaron ratones - hembras de seis semanas de edad (20 g de peso). Para la primera inmunización se utilizó el antígeno unido a adyuvante completo de Freund (al 50% con la suspensión inmunizante) para aumentar la inmunogenicidad - del antígeno. Para el resto de las inoculaciones no - se utilizó ningún tipo de adyuvante.

3.5.- Fusión celular

3.5.1.- Obtención de linfocitos de bazo de animal inmunizado.

La fusión celular fue efectuada con linfocitos de bazo obtenidos de los animales inmunizados con VHS-1 ó VHS-2 siguiendo el protocolo de inmunización expuesto en el apartado 3.4.

Antes de obtener el bazo para recoger los linfocitos, fué comprobada la existencia de anticuerpos en el ratón elegido, utilizando inmunofluorescencia indirecta sobre células infectadas con VHS-1 ó VHS-2.

Para detectar la existencia de anticuerpos se extrajo una muestra pequeña de sangre realizando un corte transversal en la base de la cola y recogiendo la sangre con un tubo capilar (hematocrito) y depositándola en un microtubo tipo Ependorf. Para extraer el suero de la sangre, esta fué mantenida en estufa a +37°C durante 1 ó 2 horas para permitir la coagulación y la retracción del coágulo y a continuación fué centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos, recogiendo luego el suero con una pipeta Pasteur.

Sólo fueron utilizados para obtener los linfocitos de bazo aquellos animales en los que pudieron detectarse anticuerpos específicos frente al virus VHS-1 ó VHS-2 según el caso.

Los animales elegidos por poseer anticuerpos fueron sacrificados por dislocación cervical.

Para obtener el bazo, la piel del abdomen fué desinfectada con alcohol etílico de 70% y se efectuó una incisión lateral en el abdomen colocando el ratón sobre su lado derecho. De esta forma pudo extraerse el bazo sin necesidad de tocar las asas abdominales (Fig. 8).

A continuación fueron cortadas con tijeras y pinzas estériles todas las uniones ligamentosas y de irrigación que fijan el bazo a las estructuras de la cavidad abdominal (Fig. 9).

El bazo extraído fué depositado en una placa de Petri de plástico estéril de 5 cm de diámetro añadiéndosele 10 ml de tampón fosfato salino estéril (PBS-J) de la siguiente composición:

- Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄) (ref. Merck 141509) _____	2	g
- Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄) (ref. Merck 6586) _____	8.56	g
- Cloruro sódico (NaCl) (ref. Merck 6404) _____	4.5	g

Con la ayuda de dos jeringuillas de insulina el bazo fue disgregado para liberar los linfocitos del parénquima tisular.

Los linfocitos suspendidos en tampón PBS-J fueron recogidos con una pipeta estéril de vidrio, de boca ancha, para evitar lesionar las células, y fueron colocados en un tubo estéril de fondo cónico, dejándolo en reposo para que sedimentasen los fragmentos del bazo que hubieran podido aspirarse con la pipeta en el fondo del tubo (alrededor de diez minutos).

El sobrenadante conteniendo los linfocitos libres fué recogido e introducido en otro tubo cónico de vidrio estéril, centrifugándose a 1000 rpm durante 10 minutos para recoger las células por sedimentación. El sobrenadante fué desechado y el sedimento celular (hematíes, linfocitos, monocitos...) fué lavado con medio RPMI-1640 conteniendo 1% de la solución de penicilina-estreptomicina, 1% de la solución de glutamina y 1% de la solución de piruvato sódico, pero sin suero bovino fetal.



Fig. 8.- Ratón Balb/c inmunizado con VHS-1 cepa VR3 McIntyre. Apertura de la piel abdominal y localización del bazo por transparencia.



Fig. 9.- Ratón Balb/c inmunizado con VHS-1 cepa VR3 - McIntyre. Incisión de la pared abdominal y - exposición del bazo para su extracción.

3.5.2.- Células de mieloma P3 x 63-Ag 8.653

Las células de mieloma destinada a la fusión fueron recogidas por centrifugación a 1000 rpm durante cinco minutos y lavadas varias veces con el mismo medio de cultivo utilizado para preparar la suspensión de los linfocitos de bazo (ver apartado 3.5.1).

Es importante efectuar los lavados con medio de cultivo exento de suero, puesto que el polietilenglicol utilizado como agente fusógeno es inactivado por el suero.

3.5.3.- Preparación de las suspensiones celulares para la fusión

Los dos tipos celulares utilizados en la fusión fueron ajustados a la concentración que permitiese obtener una proporción óptima entre ellas durante la fusión (10:1), de forma que existiesen 10 linfocitos de bazo por cada célula de mieloma.

El recuento de las células fue efectuado en una cámara de Neubauer. Para ello las células de mieloma fueron resuspendidas en la proporción 1:1 en el colorante vital azul tripano al 2% en tampón fosfato salino.

Los linfocitos del bazo de ratón fueron contados por el mismo procedimiento, resuspendiendo el sedimento celular en un volumen de medio conocido y luego suspendiendo un volumen en la proporción 1:20 en una solución de azul tripano al 0.2% con 1% de ácido acético en tampón fosfato salino con el fin de poder lisar los hematíes. La mezcla fué preparada con 50 microlitros de la suspensión de linfocitos, 450 microlitros de la solución de ácido acético y 500 microlitros de la solución de azul tripano.

El azul tripano es un colorante vital que tinte totalmente de azul la célula no-viable, por lo que estas no deben ser contadas.

Una vez efectuado el recuento y preparadas las suspensiones de ambos tipos de células, fueron mezcladas en la proporción indicada y recogidas juntas para lo cual fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 5 a 10 minutos, en un tubo cónico de vidrio estéril de 50 ml de capacidad.

El sobrenadante fue eliminado totalmente y el sedimento celular fué resuspendido cuidadosamente para que no se produjesen grumos al adicionar la solución fusógena de polietilenglicol.

3.5.4.- Adición de polietilenglicol (PEG)

Antes de efectuar la fusión debe disponerse de medio RPMI-1640 tamponado con bicarbonato sódico - al 4% y sin suero bovino fetal y de una solución de - polietilenglicol-1500 (PEG-1500) al 50%, precalentada a +37°C en baño.

La solución de PEG-1500 (Merck, ref. 807-489) utilizada fue preparada pesando una cantidad del producto en gramos, introduciéndola en un frasco y esterilizándola en autoclave a +120°C durante 15 minu--tos, ya que así ocurre su licuación durante la esterilización.

Para obtener la solución al 50% se añadió - después de la esterilización (+45°C) una cantidad - igual de medio RPMI-1640 sin suero bovino fetal igual a la cantidad pesada antes de la esterilización y - ajustado el pH a 7.2-7.4 con NaOH 1N estéril. Se con--serva a +4°C.

El sedimento celular resuspendido debe en--frentarse a la solución de polietilenglicol-1500 al - 50%, para lo cual con una pipeta larga de vidrio estéril se depositó la solución con suavidad agitando a - la vez que iba añadiéndose. La cantidad total de la - solución PEG-1500 añadida debe ser de 1 ml por cada - fusión.

La solución PEG-1500 no debe estar en con--tacto con la suspensión celular sin diluir durante - más de dos minutos por ser tóxico para las células.

Inmediatamente después debe añadirsele 1 ml de medio RPMI-1640 efectuando simultáneamente movi--mientos de rotación con la pipeta durante 1 minuto. - Posteriormente se añadieron 4 ml del mismo medio de - cultivo dejándole verter sobre las paredes del tubo - durante 3 ó 4 minutos. A continuación el contenido - del tubo fue transferido con cuidado a otro tubo estéril de las mismas características para impedir que - las células quedaran pegadas a la pared del tubo por la acción del polietilenglicol residual.

Una vez recogida la suspensión celular post fusión deben añadirse otros 20 mililitros de medio RPMI-1640 sin suero bovino fetal y tamponado con bicarbonato sódico al 4% y 20 mililitros más de medio RPMI-1640 conteniendo suero bovino fetal al 15%

La adición del suero bovino fetal comenzará la neutralización del efecto tóxico del PEG-1500, para lo cual se mantuvo en estufa +37°C con atmósfera de CO₂ al 5% durante 1 hora con el tapón del tubo parcialmente cerrado.

3.5.5.- Obtención de macrófagos peritoneales

Para facilitar el desarrollo *in vitro* de los híbridos deben hacerseles crecer en presencia de macrófagos peritoneales obtenidos de peritoneo de ratones Balb/c sin inmunizar (feeders cells). Estas células pueden obtenerse durante la incubación de los híbridos para neutralizar el efecto del polietilenglicol.

Para ello utilizamos ratones Balb/c sanos, sin inocular y de unas 6 a 8 semanas de vida que fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

Una vez efectuado su sacrificio y la desinfección cutánea con alcohol, se procedió a la apertura de la piel del abdomen, teniendo cuidado de no escindir el peritoneo.

A continuación se introdujeron intraperitonealmente 5 ml de medio RPMI-1640 sin suero bovino fetal a +4°C, utilizando una jeringuilla de 5 ml de capacidad y una aguja 25 G (insulina) para no rasgar el peritoneo y poder efectuar un masaje abdominal.

El medio introducido arrastrará los macrófagos, y fue extraído con otra jeringuilla dotada de una aguja de mayor calibre (21G Ico-steril) que evita alterar la viabilidad celular, recuperandose unos 3 mililitros aproximadamente.

El recuento de los macrófagos se efectúa utilizando la solución de azul tripano al 2% con 1% de ácido acético en tampón fosfato salino y en cámara de Neubauer. Habitualmente de un ratón pueden obtenerse alrededor de 5 x 10.6 macrófagos/mililitro.

Los macrófagos obtenidos son lavados con medio RPMI-1640 sin suero, centrifugando dos veces a 1000 rpm durante cinco minutos y añadiéndose a la suspensión de células fusionadas de forma que la concentración final fuese de 2 a 5 x 10.4 macrófagos/mililitro.

3.5.6.- Distribución de las células de mieloma en placas

Transcurrida una hora de incubación a +37°C y 5% de CO₂, se procedió a recoger las células por centrifugación a 1500 rpm durante cinco minutos. El sedimento celular (linfocitos, células de mieloma, hematíes y probables híbridos) se resuspendió con medio RPMI-1640 con 10% de suero bovino fetal, y se efectuó su contado en cámara de Neubauer utilizando como colorante vital azul tripano al 2%.

La concentración final se ajustó entre 2 a 5 x 10.4 células/mililitro.

Las células fueron distribuidas en pocillos de 200 microlitros de placas de plástico estéril (Nunc) a razón de 100 microlitros (Fig. 10 y 11).

Las placas con las células distribuidas fueron introducidas en una estufa a +37°C y 5% de CO₂ (aproximadamente de cada fusión se obtienen 2 placas de 96 pocillos).

La composición del medio RPMI 1640 utilizado fue la siguiente :

. RPMI-1640	_____	800 ml
. Glutamina	_____	8 ml (1%)
. Penicilina-estreptomina	_____	8 ml (1%)
. Bicarbonato sódico al 4%	_____	20 ml
. Suero bovino fetal (dependiendo de que sea o no necesario)		

Los componentes fueron disueltos y se procede a su filtración por presión y control de su esterilidad, inoculando una muestra en caldo corazón-cerebro e incubando a +37°C durante un mínimo de 7 días.

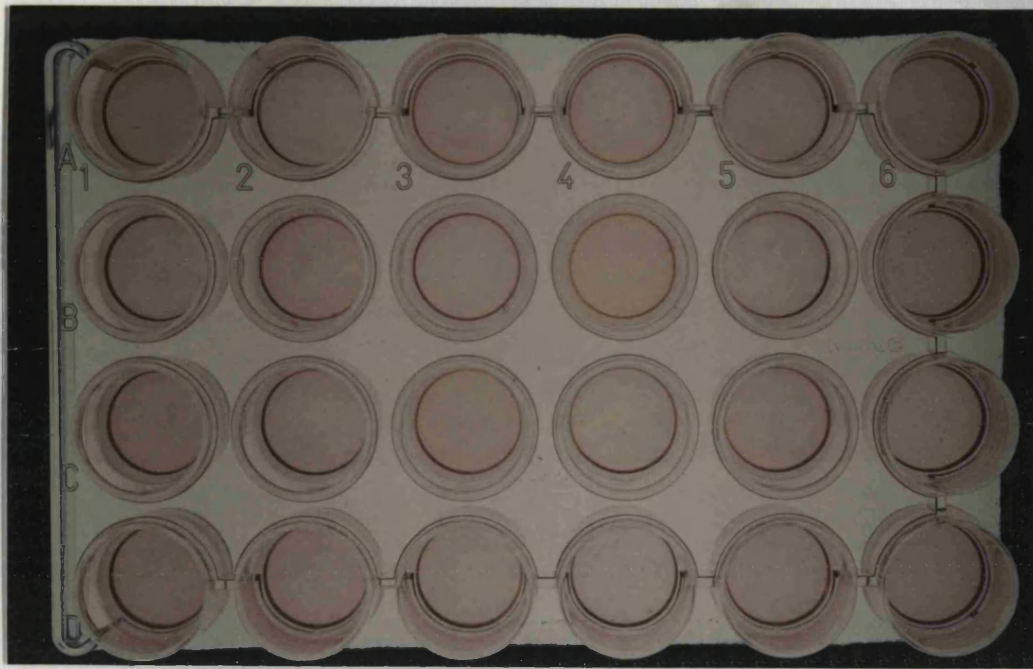


Fig. 10.- Placa de 24 pocillos de 2 ml de capacidad - cada uno utilizados inicialmente para la - distribución de las células postfusión en - nuestro laboratorio. Estas placas son tam- bien utilizadas para la expansión inicial - de los clones después de la clonación.

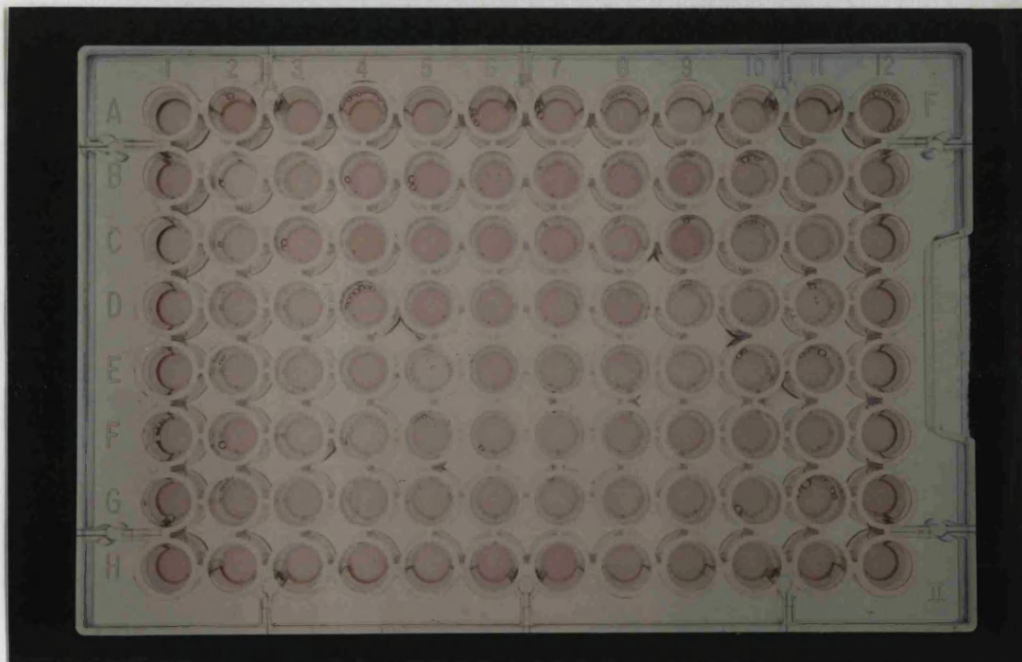


Fig. 11.- Placa de 96 pocillos de 200 microlitros de capacidad cada uno utilizados actualmente - para la distribución de las células postfu- sión en nuestro laboratorio. Estas placas - son también utilizadas para efectuar la -- clonación.

3.6.- Selección de los híbridos

3.6.1.- Selección con medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina)

Para seleccionar las células híbridas de la mezcla de células de mieloma no-fusionadas, hemos utilizado el medio selectivo HAT con la siguiente composición:

- . Medio RPMI-1640 con SBF al 10%
- . Hipoxantina (ref. Sigma H-9377) ___ 16 mcg/ml
- . Timidina (ref. Sigma T-9250) ___ 3.8 mcg/ml
- . Aminopterina (ref. Sigma A-2255) ___ 0.1 mcg/ml

La incorporación de aminoproteína, hipoxantina y timidina se debe a que las células de mieloma P3 x 63 Ag 8.653 son mutantes 8-azaguanina resistentes, que sintetizan el ADN utilizando la vía endógena. Esta vía puede bloquearse mediante la aminoproteína, por lo cual las células de mieloma no-fusionadas mueren mientras que las células híbridas viven al utilizar la vía exógena a partir de la hipoxantina y timidina ya que posee la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT) adquirida a partir de la dotación genética de la célula linfocítica de bazo de ratón.

Transcurridas 24 horas después de realizar la fusión, añadimos 100 microlitros por pocillo de medio HAT-2x, para que adquiera la concentración 1x al diluirse en los 100 microlitros existentes previamente en cada pocillo.

Una semana después fueron retirados 100 microlitros de medio de cada pocillo, y se añadieron 100 microlitros de medio HAT-1x.

3.6.2.- Incorporación del medio HT

Transcurrida una semana más, se retiraron 100 microlitros del medio HAT-1x, teniendo cuidado de no arrastrar las células híbridas y de no alterar los clones, y se añadieron 100 microlitros de medio HT compuesto sólo de hipoxantina (16 microgramos/ml) y timidina (3.8 microgramos/ml), y sin contener aminopterina.

3.7.- Selección de los clones productores de anticuerpos específicos

3.7.1.- Condiciones de detección de producción de anticuerpo monoclonal

Las células híbridas comienzan a ser observadas con el microscopio invertido a los cinco ó seis días postfusión. En este momento se observan restos de las células de mieloma no fusionadas, linfocitos, hematíes procedentes del bazo de ratón inmunizado y macrófagos adheridos al fondo del pocillo.

Los clones procedentes del crecimiento de las células fusionadas pueden observarse claramente a los diez días postfusión.

Los pocillos en los que fueron observados los clones de hibridomas fueron marcados y los sobrenadantes estudiados para detectar la presencia de anticuerpos específicos mediante técnicas específicas y sensibles, como la inmunofluorescencia indirecta y el enzoinmunoanálisis (ELISA : Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay).

Debe realizarse la selección de los clones productores de anticuerpos específicos dos ó tres veces, aunque no se hayan obtenido resultados positivos en la primera selección, ya que puede a veces tardar en acumularse suficiente concentración del anticuerpo.

Así pues a los catorce días post-fusión, cuando se retiraron 100 microlitros de sobrenadante (medio HAT-1x) de los pocillos para sustituirlo por medio HT (hipoxantina, timidina) se recogen estos microlitros en viales, dándoles a cada uno una identificación (por ej. en la fusión número 2, la placa número 1 el pocillo F de la fila 3, sería denominado -- 21F3) y con ellos se efectuó una prueba de selección de las indicadas posteriormente.

Cuando fue detectado algún clon productor de anticuerpos específicos se procedió al clonado del mismo (apartado 3.8), y a su congelación (apartado 3.9) (Fig. 12).



Fig. 12.- Clon de hibridoma de ratón Balb/c inoculado con el VHS-1 cepa VR3 McIntyre, obtenido por el método de dilución límite en placa de 96 pocillos de 200 microlitros de capacidad (4x). Observense las células alargadas o estrelladas aisladas por la superficie del pocillo correspondientes a los macrófagos peritoneales utilizados como células "feeders".

Como hemos citado cada sobrenadante de pocillo con clones debe ensayarse al menos dos veces para poder ser considerado productor ó no de anticuerpos - específicos y con al menos siete días de diferencia, entre cada prueba de selección para que así las células híbridas hayan podido secretar los anticuerpos en cantidad suficiente para poder ser detectados, no desgartando un hibridoma productor por no existir una - concentración adecuada en el medio en una fase ini--cial.

Los métodos utilizados por nosotros para la selección de los clones productores de anticuerpos monoclonales han sido: la inmunofluorescencia indirecta y el ELISA.

3.7.2.- Inmunofluorescencia indirecta

Para efectuar el método de inmunofluorescencia fueron utilizados portaobjetos con células infectadas con los respectivos virus utilizados para efectuar la inmunización y preparado de la siguiente forma:

Un cultivo de células Vero (monocapa en - frascos de cultivo de 80 centímetros cuadrados de superficie) inoculado por adsorción durante 1 hora a - +37°C con 1 mililitro de una suspensión vírica conteniendo 100 TCID₅₀ (VHS-1 ó VHS-2) y añadiéndose pos--teriormente medio MEM con 2% de suero bovino fetal, - incubándose en estufa a +37°C con un 5% de CO₂.

Las células fueron recogidas cuando el efecto citopático afectaba a un 20% de las células de la monocapa y siempre entre las 12 y 14 horas postinoculación, evitándose así la aparición de receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas y por tanto la posible inespecificidad que conlleva este método.

Las células fueron recogidas por tripsini--zación de la monocapa con una solución de tripsina- - verseno (apartado 3.1.2.) y posteriormente centrifugadas a 1500 rpm durante cinco minutos en centrifuga refrigerada a +4°C para evitar el fenómeno de capping.

El sobrenadante fué eliminado y el sedimento resuspendido con tampón fosfato salino (PBS, pH - 7.2-7.4) a una concentración de 1×10^6 células por mililitro.

A continuación las células fueron centrifugadas de nuevo a 1500 rpm durante cinco minutos, añadiendo el volumen de tampón calculado anteriormente - para obtener dicha concentración celular.

La suspensión celular fué distribuída a razón de 25 microlitros por cada pocillo en portaobjetos de inmunofluorescencia (Flow, ref. 60-418-05) dejando secar a temperatura ambiente y fijando en acetona fría (+4°C) durante 10 minutos.

Los portaobjetos con el antígeno fijado (células infectadas) pueden conservarse a -70°C durante un máximo de 1 mes.

Como control de antígeno fueron utilizadas células Vero sin infectar preparadas del mismo modo - que las infectadas.

Para detectar la existencia de anticuerpos por inmunofluorescencia 15 microlitros de los sobrenadantes sin diluir de los clones fueron depositados - sobre los círculos con las suspensiones de las células infectadas y de las células control no-infectadas.

El sobrenadante fué mantenido en incubación durante 30 minutos a +37°C en cámara húmeda y fue lavado posteriormente con tampón fosfato salino (PBS) - efectuando 3 lavados de 10 minutos cada uno y finalmente un último lavado breve con agua destilada, procediéndose a continuación al secado de los portaobjetos con un secador.

Posteriormente los círculos con el antígeno fueron cubiertos con anti-inmunoglobulina de ratón - (IgG, IgM, IgA) marcada con fluorescencia a la dilución de 1:50 en tampón fosfato salino (PBS) e incubado durante 30 minutos en cámara húmeda a +37°C. Transcurrida esta incubación se procedió de nuevo a realizar 3 lavados con tampón fosfato salino durante 10 - minutos cada uno y un lavado breve con agua destilada para eliminar las sales.

Finalmente se depositó sobre los círculos - de los portaobjetos una solución de azul de Evans al 0.1% en agua destilada que se mantuvo en contacto durante cinco minutos, lavando brevemente con agua destilada y tras proceder a su secado con secador, montar con glicerina tamponada pH 8.9.

Al observar al microscopio de fluorescencia es necesario buscar la presencia de células que aparezcan verdes (fluorescentes) que eran consideradas - como indicativo de positividad, es decir, que traducen la existencia de anticuerpos específicos en el so brenadante del clon ensayado.

Las células control (Vero) sin inocular con virus deben aparecer de color rojo (inmunofluorescencia negativa), indicando que el anticuerpo producido por el clon es específico de un antígeno vírico y no de un antígeno celular.

Cada lote nuevo de portaobjetos que se prepara debe probarse previamente, antes de usarlo en - la selección de los clones productores de anticuerpos incubando un portaobjetos del lote con suero procedente de ratones Balb/c sin inmunizar.

Con ello comprobamos, al ser negativa la - inmunofluorescencia que en las células utilizadas como antígeno no se han desarrollado receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas de ratón.

Cada sobrenadante fué probado utilizando - tres tipos de portaobjetos:

- . Con antígeno celular de VHS-1
- . Con antígeno celular de VHS-2
- . Con células Vero sin infectar

En cada ocasión que se realizó el método se colocó un pocillo control positivo (suero con anti-- cuerpo frente al virus Herpes simplex) y un control - negativo (tampón fosfato ó suero de ratón sin inmunizar).

3.7.3.- Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

3.7.3.1.- ELISA para detección de anticuerpos específicos

Para utilizar este método en la selección de los clones productores de anticuerpos específicos, hemos tenido que normalizar las condiciones de realización es decir la dilución óptima del antígeno utilizado y la dilución óptima de la anti-inmunoglobulina conjugada con peroxidasa a utilizar.

3.7.3.1.1.- Preparación del antígeno

El antígeno fué preparado a partir de una monocapa de células Vero (frasco de 80 centímetros cuadrados de superficie Nunc) inoculado con 1 ml de la suspensión vírica (VHS-1) conteniendo 100 TCID₅₀.

Cuando el efecto citopático era máximo se recogieron las células mediante tripsinización (apartado 3.2.1.), aunque las células estuviesen separadas unas de otras y se despegasen del fondo del frasco por raspado con la punta de la pipeta.

Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en tampón fosfato salino a una concentración de 10.8 células/mililitro y fueron sometidas a tres ciclos de sonicación de 30 segundos cada uno (Sonicador MSE mod. Soniprep 150), purificándose la suspensión mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos.

La concentración proteica total del antígeno fué de 50 microgramos/mililitro.

Como control de antígeno se utilizaron extractos preparados a partir de células Vero no-infectadas con virus Herpes simplex.

3.7.3.1.2.- Normalización del antígeno

Para conocer la dilución óptima del antígeno que debíamos utilizar, utilizamos un suero policlonal con anticuerpos frente a virus Herpes simplex procedentes de los ratones Balb/c inmunizados con virus Herpes simplex tipo 1 y como control negativo un suero de un ratón Balb/c no-inmunizado. Los sueros fueron utilizados a la dilución 1:2000 ya que a esta dilución presentaban la misma concentración proteica - que la existente en los sobrenadantes de los clones - (10 microgramos/mililitro).

El antígeno se utilizó para posteriores determinaciones a la dilución a la que encontramos mayor diferencia entre un suero positivo y uno negativo (1:100 en nuestro caso).

La anti-inmunoglobulina marcada con peroxidasa fué utilizada con las mismas diluciones de sueros y de antígeno a 1:300, siendo esta última dilución la óptima para su uso.

3.7.3.1.3.- Realización

El antígeno fué fijado en placa de 96 pocillos (Nunc microtest ref. 1745) de fondo plano, depositando 100 microlitros de una dilución de antígeno - al 1:100 en tampón carbonato-bicarbonato pH 9.6 e incubándose durante 18 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados con tampón fosfato salino con 4% de tween-20 y 1% de suero bovino fetal.

Las placas conteniendo el antígeno y 100 microlitros de cada sobrenadante en cada pocillo se incubaron durante 45 minutos a +37°C.

La primera fila de la placa se dejó libre, sin sobrenadante, y fué utilizada como blanco para la lectura de la reacción.

Posteriormente fueron realizados tres lavados consecutivos con tampón fosfato salino con tween-20 al 4% y 1% de suero bovino fetal.

Posteriormente se añadieron 100 microlitros en cada pocillo del conjugado diluido a 1:300, y se incubó a +37°C durante 45 minutos.

Trás la incubación se realizaron tres lavados más con tampón fosfato salino (tween-20 al 4% y - 1% de suero bovino fetal) y se reveló la reacción utilizando como sustrato ortofenilendiamina (OPD) diluída en tampón citrato.

La composición de los tampones y sustrato - utilizados para realizar el método fué la siguiente:

- Tampón carbonato - bicarbonato

. NaCO ₃	_____	1.59 g/l
. NaHCO ₃	_____	2.93 g/l
. NaN ₃	_____	0.2 g/l

pH 9.6

- Tampón fosfato salino tween-20 (al 4%) y 1% de SBF

. Tampón fosfato salino (Oxoid)	_____	10 tabletas
. Agua destilada	_____	1000 ml
. Tween-20	_____	40 ml
. Suero bovino fetal (SBF)	_____	10 ml

- Sustrato de la reacción enzimática

. Acido cítrico 0.1 M (Ref. Sigma C8532)	_____	12.2 ml
. Fosfato disódico Na ₂ HPO ₄ 0.2 M	_____	12.8 ml
. Agua destilada	_____	25 ml
. Ortofenilendiamina (OPD) (Sigma ref. P 1157)	_____	20 mg
. Agua oxigenada (Laforet) 110 volúmenes	_____	20 microlitros

El sustrato fué filtrado antes de usar.

La incubación con el sustrato debe efectuarse en la oscuridad durante 30 minutos, deteniéndose la reacción agregando 25 microlitros de ácido sulfúrico 4M en cada pocillo.

Finalmente se añadieron 100 microlitros de tampón fosfato salino a cada uno de los pocillos de la primera fila y se procedió a la lectura del resultado con un filtro de 492 nanómetros, utilizando un lector Titertek Multiscan (Flow).

Fueron considerados como positivos los valores superiores a un 25% de la media de los negativos utilizados como control.

3.7.3.2.- Enzimoimmunoanálisis para detectar producción de inmunoglobulinas

Este método permite detectar las inmunoglobulinas de ratón producidas por los hibridomas en el sobrenadante de los pocillos, fijando directamente dichos sobrenadantes a microplacas (Nunc) de fondo plano.

Para ello se dispensaron 100 microlitros de sobrenadantes diluido al 1:10 en tampón carbonato-bicarbonato pH 9.6, preparado según la fórmula descrita en el apartado 3.7.3.1.

Se dejó durante 18 horas a temperatura ambiente, cubriendo la placa con un papel de filtro Whatman nº1 mojado, con agua para evitar la desecación.

Se procedió al lavado (3 veces) de los pocillos con tampón fosfato salino tween-20 al 4% y suero bovino fetal al 1%.

Se agregaron 100 microlitros de globulina de conejo anti-ratón marcada con peroxidasa diluida al 1:300 en tampón fosfato salino a todos los pocillos y se incubó 1 hora a +37°C.

Se lavó tres veces con tampón fosfato salino tween-20 al 4% y 1% de suero bovino fetal.

Se añadió 100 microlitros de sustrato ortofenilendiamina a todos los pocillos e incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La reacción se detuvo añadiendo 30 microlitros de una solución de ácido sulfúrico (SO₄H₂) 4 M.

119.-

La lectura se realizó a 492 nanómetros en un espectrofotómetro Titertek Multiscan (Flow).

Se utilizó como control positivo medio RPMI-1640, con concentraciones distintas de inmunoglobulina de ratón (de 2 a 20 microgramos) y como control negativo medio RPMI-1640 procedente de cultivo de células P3 x 63 - Ag8. 653.

3.8.- Clonado por dilución límite

Los pocillos que contienen híbridos productores de anticuerpos específicos demostrados por los métodos citados previamente, deben clonarse para aislar cada uno de los clones presentes.

El clonado debe realizarse lo más precozmente posible para evitar un crecimiento desmesurado de los híbridos no-productores de anticuerpos. Un clonado tardío incrementa la probabilidad de seleccionar híbridos con aberraciones cromosómicas incapaces de sintetizar anticuerpos.

Deben realizarse tantos clonados como sean necesarios hasta conseguir clones únicos productores de anticuerpos de la especificidad deseada.

Los clones fueron cultivados hasta conseguir una concentración celular que pudiese aportar 1×10^5 células/mililitro.

Este conjunto de células fué clonado en placas de 96 pocillos (Nunc) distribuyendo aproximadamente 6 células por pocillo inicialmente.

Para distribuir en cada pocillo 200 microlitros de la suspensión celular, se requiere partir de una concentración de 30 células por mililitros y un volumen total de la suspensión celular de 20 mililitros para una placa de 96 pocillos.

Es decir, partiendo de una suspensión inicial de híbridos a una concentración de 1×10^5 células/mililitro se efectuó la dilución necesaria de la suspensión celular para obtener la concentración de 1000 células por ml. A partir de esta concentración de la suspensión celular fueron tomados 600 microlitros que fueron diluidos en 20 ml de medio HT. De esta forma, disponemos de 30 células por ml y al distribuir 200 microlitros en cada pocillo tendremos la probabilidad de distribuir 6 células en cada uno.

A la suspensión de células híbridas deben añadirse macrófagos de peritoneo de ratón Balb/c no inmunizado, obtenidos siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.5.5.

Habitualmente hemos obtenido 2 a 5×10^6 macrófagos por mililitro que fueron añadidos a la suspensión a razón de 5×10^4 macrófagos/mililitro.

Finalmente fue distribuida la mezcla obtenida (híbridos/macrófagos) en la placa de 96 pocillos (Nunc) a razón de 200 microlitros por pocillo, incubándose a +37°C en atmósfera de 5% de CO₂.

Cuando transcurridas 1 ó 2 semanas de incubación no se habían podido aislar clones únicos, productores de los anticuerpos de la especificidad deseada, se procedió al reclonado, que se realizó del mismo modo que el clonado descrito, siendo el número de células por pocillo de 0.3 a 1, en lugar de 6 como hemos referido. Puede suceder que tras el clonado seaislen clones, pero que estos no sean productores de los anticuerpos específicos deseados, bien porque hayan perdido la capacidad de producirlos o bien porque las células que se han aislado no pertenecen al clon productor. Por ello, cuando se realiza el clonado -- siempre hay que conservar las células restantes (del pocillo inicial) congeladas y en cultivo, aunque no estén aisladas de otros híbridos no-productores.

3.9.- Conservación de los clones

3.9.1.- Congelación

Una vez hemos conseguido obtener clones productores de anticuerpos específicos, deben transferirse a un pocillo de una placa de 24 (Nunc), para conseguir un crecimiento y posteriormente puede ser trasladados ya a frascos de cultivos (Nunc) de 25 cm.² de superficie.

A partir de los pocillos debe comenzarse la congelación, aunque existan muy pocas células, para prevenir la pérdida del clon productor.

Para efectuar la conservación de los clones se ha procedido de la siguiente forma:

- . Introducir la suspensión celular en un tubo cónico graduado.
- . Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos a +4°C.
- . Recoger el sobrenadante y conservarlo congelado.
- . Resuspender el sedimento celular en suero bovino fetal descomplementado a razón de 10.6 células/ml.
- . Repartir 0.2 ml en cada vial de congelación (previamente enfriado y mantenido sobre hielo picado).

- . Agregar a cada ampolla 0.2 ml (RPMI-1640) conteniendo 20% de DMSO (dimetilsulfóxido estéril) y mantenido previamente a +4°C. Esta operación debe efectuarse dentro del hielo.
- . Mantener los viales con las células suspendidas en medio con suero y DMSO durante 30 minutos sobre el hielo picado, moviéndolos suavemente cada 10 minutos.
- . Proceder a congelar progresivamente, dejando 24 horas a -70°C envueltos los viales en algodón e introducidos en una caja de poliestireno. Al día siguiente se deja la caja durante unas horas sobre vapores de nitrógeno líquido y luego son introducidos en el tanque de nitrógeno líquido.

3.9.2.- Descongelación

- . Descongelar rápidamente un vial a +37°C en baño.
- . Diluir rápidamente a 1:10 en medio habitual (RPMI-1640) frío.
- . Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos a +4°C.
- . Resuspender el sedimento celular en el medio habitual e introducir en un frasco pequeño de cultivo e incubar a +37°C.

3.10.-Estudio de la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos

Para caracterizar las proteínas y glicoproteínas víricas, estas deben solubilizarse y separarse por electroforesis en presencia del detergente dodecil sulfato sodico (SDS). Este detergente hace que las proteínas y glicoproteínas posean una carga negativa elevada y que su migración en el gel de acrilamida se realice en función de su peso molecular y no en función de su carga eléctrica.

Una vez han sido separadas electroforéticamente se procede a transferirlas a una membrana de nitrocelulosa, procedimiento conocido como Western-blot.

La membrana de nitrocelulosa conteniendo las proteínas transferidas es utilizada como sustrato de una reacción inmunoenzimática que permite caracterizar inmunoquímicamente los anticuerpos monoclonales, es decir, conocer su especificidad para determinadas proteínas.

Existen gran número de variaciones en este método, siendo el más sensible aquel en el que el antígeno se marca con isótopos radiactivos (Iodo-125), aunque es preferible utilizar aminoácidos y precursores de sustancias hidrocarbonadas marcadas con H3, C14 o S35. El marcado se realiza durante la síntesis de las moléculas que ocurre con el crecimiento de las células en un medio que contenga los precursores marcados, incorporándolos así a su metabolismo.

La mezcla antigénica se solubiliza y el extracto soluble se mezcla con el anticuerpo monoclonal concentrado, siendo posteriormente el complejo antígeno-anticuerpo aislado por precipitación. Este precipitado se redisuelve y somete a una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, apareciendo una banda de precipitado en el lugar correspondiente a la glicoproteína precipitada.

3.10.1.- Preparación del extracto antigénico de proteínas de VHS

Hemos utilizado el método de solubilización selectiva de las glicoproteínas descrito por varios autores (SPEAR, 1976; PEREIRA et al. 1982; ARVIN et al. 1983).

Este procedimiento selectivo solubiliza solamente la membrana plasmática, dejando el núcleo celular intacto.

Para disponer de un cultivo celular infectado con virus Herpes simplex (VHS), hemos inoculado una monocapa de células Vero con 1 ml de una suspensión de antígeno vírico (VHS-1), conteniendo 100 TCID₅₀ titulado previamente como se describe en el apartado 3.1.3.

Para facilitar la adsorción del virus a las células, el medio de cultivo fué eliminado y la monocapa fué mantenida en contacto con el virus durante una hora a +37°C. Posteriormente fué añadido el medio de mantenimiento de cultivo celular que fue medio mínimo esencial con 2% de suero bovino fetal.

El cultivo de células Vero inoculado con - VHS fué mantenido durante 16 horas a +37°C en estufa con atmósfera al 5% de CO₂.

Posteriormente la monocapa fué tripsinizada y las células fueron recogidas por centrifugación, - resuspendiéndose a continuación en tampón de lisis a una concentración de 4 x 10⁷ células por mililitro.

El tampón de lisis fué preparado según la - siguiente composición:

. Tampón Tris pH 7.4 _____	10	mM
. Cloruro sódico _____	0.15	mM
. Triton X-100 _____	0.5	%
. Deoxicolato sódico _____	0.5	%

La suspensión celular en el tampón de lisis fué incubada a +4°C durante 45 minutos y posterior- mente fueron sometidos a tres ciclos de sonicación - (Soniprep 150) en frío de 30 segundos cada ciclo. A - continuación los extractos celulares fueron purifica- dos por centrifugación a 20.000 rpm y +4°C durante 60 minutos para eliminar los detritus celulares.

El sobrenadante fué conservado a -20°C du- rante un máximo de una semana después de su prepara- ción. Antes de usarse fué descongelado y centrifugado de nuevo a 20.000 rpm durante 60 minutos.

3.10.2.- Preparación de gel de poliacrilamida con SDS (SDS/PAGE)

Para preparar el gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS), hemos utilizado el método de LAEMMLI modificado (1970).

El gel de poliacrilamida fué preparado entre dos láminas de vidrio con un borde biselado. El montaje de las láminas de vidrio se efectuó sobre un soporte de plástico adecuado para cubeta Protean II (Bio-Rad) y con unos cierres laterales, dejando una separación de un milímetro entre ambas placas de vidrio gracias a una cinta de plástico que se introduce entre ambas placas de vidrio.

La solución polimerizante se dispensó entre las dos placas, dejando que ocurriese la polimeración durante unos 10 a 15 minutos.

Hemos utilizado dos tipos de geles:

- Un gel inferior ó separador (separating gel), por el que migran las proteínas que serán separadas - unas de otras por su peso molecular, debido a que - todas estarán cargadas negativamente.
- Un gel superior ó introductor (stacking gel), que - se dispensa en segundo lugar para que quede ubicado en la parte superior y a través del que migrarán - inicialmente las proteínas muy próximas entre sí - para que lleguen al segundo gel como una banda delgada, lo que permite obtener una mejor resolución.

Los geles fueron preparados con una solución inicial de acrilamida preparada según la siguiente composición:

. Acrilamida (Bio-Rad 161-0100)	30	g
. Bis-acrilamida (Bio-Rad 161-0200)	0.8	g
. Agua destilada csp	100	ml

Una vez disuelta la acrilamida y bis-acrilamida en agua destilada, fué filtrada a través de un papel de Whatman nº 1 y conservada en oscuridad a +4°C. La acrilamida es un potente neurotóxico, por lo que debe manejarse con guantes y mascarilla, siendo preferible en cámara de gases.

Además se utilizaron los siguientes tampo--
nes, colorante y decolorante preparados segun se des-
cribe a continuación:

- Tampones Tris-HCl (Tris hydroxymethylaminomethano)
Merck 609 KA 1997382)

- . Tris HCl 1M pH 8.9
- . Tris Hcl 1M pH 6.7

Pueden conservarse a +4°C pero deben ser -
utilizados a temperatura ambiente.

- Dodecil sulfato sodico (SDS)

Diluir SDS (Bio-Rad 161-0300) al 10% en -
agua destilada. Esta solución precipita en frío a -
+4°C, y aunque puede redisolverse en baño a +37°C,
debe conservarse a temperatura ambiente para evitar
su precipitación.

- Tampón de muestra

El tampón de muestra es utilizado para di--
luir la muestra antes de ser depositada en el gel.
Contiene una sustancia de elevado peso molecular -
para facilitar su depósito en el gel y un colorante
que será utilizado para conocer el frente de migra-
ción electroforético (azul de bromofenol).

Este tampón fué preparado según la siguien-
te composición:

. SDS, solución al 10% _____	0.5 ml
. Glicerol _____	0.5 ml
. Tris HCl pH 6.71 1M _____	0.4 ml
. Agua destilada _____	3.1 ml
. Azul de bromofenol al 2% _____	500 microlitros

- Tampón de electroforesis

. Tris HCl _____	0.025 M
. Glicina _____	0.192 M
. SDS _____	0.1 %

pH 8.3

- Azul de Coomasie

Solución al 0.1% en la solución decolorante.

- Decolorante de geles

La solución decolorante fué preparada según la siguiente composición:

. Acido acético glacial	_____	100 ml
. Alcohol etílico	_____	400 ml
. Agua destilada	_____	500 ml

Preparación del gel separador

El gel separador puede utilizarse con distintas concentraciones de acrilamida. Sin embargo, la concentración al 10% es la usada con más frecuencia y proporciona una mejor resolución de las bandas de distintos pesos moleculares.

La preparación de este gel al 10% de acrilamida se realiza de la siguiente forma:

. Acrilamida (solución inicial)	___	10 ml
. Agua destilada	_____	15.8 ml
. Tampón Tris-HCl 1M pH 8.9	_____	3.5 ml
. TEMED (N,N,N',N' Tetramethylene-diamine) (ref. Bio-Rad 161-0800)	_	15 microlitros
. Persulfato amónico al 10% (ref. Bio-Rad 01-700)	_____	450 microlitros
. SDS al 10% (Bio-Rad 01-800)	_____	300 microlitros

La solución de persulfato amónico debe prepararse en el momento de su utilización.

Al añadir el TEMED y la solución de persulfato amónico, comienza la polimerización, por lo que son considerados los desencadenantes de la misma.

Inmediatamente después de añadir la solución de persulfato amónico y el TEMED, el gel todavía líquido debe introducirse evitando formar burbujas entre las dos placas de vidrio y dejar polimerizar durante unos quince minutos.

Mientras que ocurre la polimerización del gel separador debe prepararse el gel superior (stacking gel).

Para que el gel separador polimerice en su zona superior, en una línea recta y perfectamente horizontal, debe dispensarse sobre él agua destilada - (0.5 ml) con una pipeta Pasteur, hasta que quede un nivel rectilíneo. El agua debe eliminarse por vertido antes de colocar la solución del gel superior.

Preparación del gel superior

El gel superior se prepara según la siguiente composición:

. Acrilamida _____	2 ml
. Tris-HCl 1 de pH 6.7 _____	1.5 ml
. Agua destilada _____	6.7 ml
. Solución de SDS al 10% _____	100 microlitros
. TEMED _____	5 microlitros
. Persulfato amónico _____	150 microlitros

Esta solución de gel debe colocarse introduciéndola entre las dos placas de vidrio y a continuación colocar un peine de plástico que dejará al retirarse los pocillos rectangulares donde serán introducidas las muestras para someterse a electroforesis.

Una vez ha polimerizado (10 ó 15 minutos) - se introduce el gel en la cubeta de electroforesis - (Protean II. Bio-Rad), marcándose los trayectos que seguirán las muestras e introduciéndose las muestras.

La solución antigénica será mezclada con el tampón de muestra antes de introducirse (2 partes de antígeno o lisado celular y una parte de tampón de muestra), siendo hervido durante cinco minutos, junto con los patrones de peso molecular (Bio-Rad).

De cada muestra fueron introducidos 50 microlitros en cada uno de los huecos dejados por el peine.

A continuación debe añadirse el tampón de electroforesis a la cubeta y conectarse a la fuente de corriente eléctrica a 20 mAmp hasta que llegue el frente de avance al nivel de separación del gel de separación.

Posteriormente, debe disminuirse la corriente a 10 mAmp hasta que finalice la migración que será en el momento en el que el frente haya llegado al final de la placa de vidrio.

En este momento el gel es sacado de entre las dos placas de vidrio con ayuda de una espátula, eliminando el gel superior y dejando sólo el gel separador que es por donde habrán migrado las proteínas correctamente, procediéndose a la tinción del mismo con una solución colorante de azul de Coomassie al 0.1% durante al menos dieciseis horas, ó realizando la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.

3.10.3.- Tinción de PAS (Periodic acid - Schiff) de geles de poliacrilamida

Para efectuar la tinción de PAS fué realizado el método descrito por LEACH et al. (1980).

La fijación del gel de poliacrilamida fué realizada en ácido fosfotúngstico al 5% en ácido clorhídrico 2 M durante una hora y media. A continuación fué lavado abundantemente en metanol al 7% y ácido acético al 15% para eliminar el SDS.

Luego fué adicionado ácido periódico al 1% en ácido tricloroacético al 7% durante una hora.

Seguidamente los geles fueron tratados con metabisulfito sódico al 0.5% en HCl 0.1 M durante una hora y a continuación se efectuó la tinción con el reactivo de Schiff.

La decoloración del gel fué realizada con una solución de metabisulfito sódico en ácido clorhídrico 0.01 M.

Las glicoproteínas aparecen como bandas de color rosa.

El peso molecular de las bandas fue calculado como se describe en el apartado 3.10.6.

3.10.4.- Transferencia de las proteínas a membrana - de nitrocelulosa.

La transferencia de las proteínas separadas en el gel a una membrana de nitrocelulosa es la alternativa más usada para detectar los anticuerpos monoclonales específicos de determinados antígenos, siendo más sencillo que la inmunoprecipitación y que la radioinmunoprecipitación al no necesitar utilizar isótopos radiactivos.

Para efectuar la transferencia hemos utilizado el método de TOWBIN et al. (1976).

Una vez el gel ha sido extraído de entre las dos placas de vidrio está dispuesto para efectuar se la transferencia de proteínas.

Hemos utilizado para este fin una cubeta de transferencia (Bio-Rad, Transfer Cell) en la que se introduce el tampón de transferencia que impregna por completo un dispositivo central, formado por dos placas de plástico con orificios, entre los que se introduce el gel y la membrana de nitrocelulosa.

Debido a que las proteínas por estar en contacto con el SDS están cargadas negativamente, serán transferidas a la membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) mediante el paso de una corriente continua de 30 V durante 7 horas, situando la membrana de nitrocelulosa en el polo positivo.

Para montar el dispositivo de transferencia se necesitan dos esponjas (Scotch Brite) entre la que se dispone el gel y la membrana.

Para efectuar la colocación mantener las dos placas de plástico abiertas y colocar una esponja impregnada previamente con tampón de transferencia y sobre ella colocar dos hojas de papel Whatman nº 3 del mismo tamaño que el gel a transferir y sobre ellas colocar el gel. Encima del mismo situar la membrana de nitrocelulosa también del mismo tamaño e impregnada previamente con tampón de electroforesis. Debe cuidarse que no quede ninguna burbuja de aire entre la membrana y el gel, ya que impediría la transferencia proteica.

Sobre la membrana colocar otras dos hojas de papel Whatman nº 3 también impregnadas en tampón y finalmente otra esponja.

A continuación se efectúa el cierre de las dos placas de plástico de forma que la presión ejercida sea homogénea en toda la superficie del gel para asegurar una transferencia homogénea, colocándose las placas con el gel y la hoja de nitrocelulosa en la cubeta de transferencia y sometiéndole al paso de la corriente eléctrica durante 7 horas a 30 V.

La composición del tampón de transferencia es la siguiente:

. Tris HCl	_____	25	mM
. Glicina	_____	92	mM
. Metanol	_____	20	%

pH 8.3

Una vez ha sido completada la transferencia desmontar el conjunto, pudiendo utilizarse la membrana de nitrocelulosa para realizar un enzimoimmunoanálisis. Además una tira estrecha de la membrana de nitrocelulosa, correspondiente a una carrera de migración proteica, alrededor de 1 cm de ancho, puede teñirse con negro amido para comprobar la eficacia de la transferencia.

La tinción de negro amido utiliza la siguiente solución colorante: --

. Negro amido (Merck Art. 1167)	_____	0.1	%
. Metanol	_____	45	%
. Acido acético	_____	10	%
. Agua destilada	_____	45	%

Dejar teñir durante unos treinta minutos y luego desteñir con una solución decolorante compuesta por:

. Metanol	_____	90	%
. Acido acético	_____	2	%
. Agua destilada	_____	8	%

La decoloración se mantiene hasta que quedan bien contrastadas las bandas proteicas. --

El resto de la membrana de nitrocelulosa debe tratarse para realizar sobre ella una reacción inmunoenzimática entre el antígeno que tiene transferido y el anticuerpo monoclonal, de forma que pueda revelarse la banda proteica específica frente a la que haya sido obtenido el anticuerpo monoclonal.

3.10.5.- Enzimoimmunoanálisis sobre membrana de nitrocelulosa

La membrana nitrocelulosa una vez extraída de la cubeta de transferencia debe introducirse en una solución proteica para que las proteínas se fijen a los lugares libres de unión de la membrana.

Para efectuar la neutralización de los lugares libres hemos utilizado la siguiente solución:

- . Hemoglobina (Sigma ref. 525-18) 3 g
- . Tampón fosfato salino pH 7.2 ___ 100 ml
- . Tween-20 (Merck ref. 822184) ___ 0.5 ml

La membrana debe dejarse en la solución durante un mínimo de veinticuatro horas. Posteriormente debe lavarse con una solución de tampón fosfato salino con tween-20 al 0.5% durante al menos una hora, mantenido en agitación.

La membrana puede secarse y conservarse entre dos hojas de papel de filtro, ó cortarse en tiras correspondiente a los trayectos de migración proteica (un centímetro de ancho) y efectuarse un enzimoimmunoanálisis (ELISA) utilizando como fase sólida la membrana de nitrocelulosa.

Por ello se incuba la tira de membrana elegida, que ya tiene las proteínas transferidas con el anticuerpo monoclonal durante un mínimo de una hora a temperatura ambiente.

Posteriormente debe efectuarse su lavado con tampón fosfato salino con tween-20 al 0.5% (PBStween) durante 1 a 2 horas en agitación. A continuación se efectúa la incubación con 10 mililitros de globulina antiratón marcada con peroxidasa (Sigma ref. A-0412) a una dilución 1:50 y durante una hora.

Una vez mantenida la incubación con el suero anti-ratón debe lavarse como en el caso anterior procediéndose mientras tanto a la preparación del sustrato.

El sustrato utilizado ha sido el siguiente:

- . Diaminobencidina (DAB) (Sigma n^o D-5637) _____ 50 mg
- . Tampón fosfato salino pH 7.2 ___ 100 ml

La solución es agitada durante al menos -
treinta minutos y filtrada a través de un papel -
Whatman nº 1. Cuando fué a utilizarse se añadieron -
10 microlitros de agua oxigenada de 110 volúmenes.

La banda de revelado de la reacción antige-
no-anticuerpo apareció de un color marrón claro en me-
nos de diez minutos y se procedió a un lavado con -
agua destilada y secado entre dos papeles de filtro.

Esta banda que aparece corresponde a una -
proteína del Herpes simplex utilizado como antígeno -
que ha sido revelado mediante la reacción con el -
anticuerpo monoclonal específico.

Este método permite caracterizar el anti--
cuerpo monoclonal, y la proteína frente a la que se -
ha producido, es decir la especificidad antigénica y
a la vez su característica de monoclonalidad.

3.10.6.- Cálculo de los pesos moleculares

Los pesos moleculares de las bandas de pro-
teínas fueron calculados mediante interpolación en -
una recta patrón constituida a partir de valores cono-
cidos de pesos moleculares de proteínas (Bio-Rad).

En la recta patrón fue representada la movi-
lidad electroforética frente al logaritmo decimal del
peso molecular.

Los valores obtenidos fueron corroborados -
siguiendo el método de PLYKAITIS et al. (1984).

3.11.- Producción de anticuerpo monoclonal específico

El objeto de obtener anticuerpos monoclonal-
es es que sean específicos frente al antígeno desea-
do y además producirlos en cantidad suficiente para -
utilizarlos en el diagnóstico, estudio de las funcio-
nes, estructura ó identidad de cada proteína vírica.

Hemos utilizado dos formas de producir los
anticuerpos en gran cantidad que describimos a conti-
nuación:

3.11.1.- Cultivos de hibridomas en rotación

Los cultivos de hibridomas fueron realizados en frascos de cultivo de vidrio (Bellco), con un eje central magnético y dos orificios laterales para la entrada de anhídrido carbónico y para extraer el sobrenadante. Se han utilizado frascos de 50, 100 y 200 mililitros de capacidad dependiendo de la concentración celular existente.

El sobrenadante fué recogido semanalmente, siendo sustituido por nuevo medio de cultivo RPMI-1640 con 10% de suero bovino fetal, pasándose las células a otro frasco cuando al ajustar la concentración celular a 5×10^6 células/mililitro era superior.

Los sobrenadantes de estos clones mantenidos en cultivo, poseen alrededor de 10 microgramos/mililitro de anticuerpo, pudiendo ser concentrado posteriormente por las técnicas descritas en el apartado 3.12 (Fig. 13).

3.11.2.- Producción de ascitis en ratón Balb/c

Al inocular los hibridomas en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c pueden obtenerse grandes cantidades de anticuerpo monoclonal, alrededor de 10 mg/ml de líquido ascítico.

Este método está basado en que los hibridomas crecen en la cavidad peritoneal de animales sinérgicos (Balb/c) y secretan anticuerpos monoclonales en el líquido ascítico que se acumula en el interior de la cavidad peritoneal.

El líquido ascítico contiene también inmunoglobulinas procedentes del animal en que se ha producido la ascitis. Sin embargo puede ser purificado utilizando los métodos descritos en el apartado 3.12.

Antes de efectuar la inoculación del hibridoma los animales fueron inyectados intraperitonealmente con 0.5 mililitros de pristane (2,6,10,14 tetramethylpentadecane) (Sigma T-7640).

Transcurridos siete días después de la inyección de pristane las células de los hibridomas mantenidas en cultivos fueron recogidas por centrifugación y el sobrenadante fué retirado conservándolo congelado, ajustando las células a una concentración en tampón fosfato salino estéril de 2×10^7 células/mililitro.

A cada animal se inyectaron 0.5 mililitros de la suspensión celular por vía intraperitoneal, utilizando una aguja de 21G (Ico-Steril).

Los animales fueron observados diariamente, apareciendo la ascitis a los seis ó siete días post-inoculación.

La recogida del líquido ascítico se efectuó por punción con una aguja de 19G (Ico Steril) procurando no dañar al ratón, puesto que puede ser utilizado para posteriores extracciones.

La purificación del líquido ascítico se efectuó centrifugando durante 10 minutos a 1500 rpm y el líquido sobrenadante fué conservado congelado a -70°C en alícuotas de 1 mililitro.

Cuando el animal sufre un distress respiratorio tras la extracción del líquido ascítico debe sacrificarse obteniéndose también la sangre del animal en la que también existen anticuerpos monoclonales específicos (Fig. 14).

3.12.- Purificación del anticuerpo monoclonal específico

En muchos casos el sobrenadante de los clones ó el fluido ascítico puede utilizarse sin purificar. Sin embargo, en otros casos, como para realizar un marcado radioactivo o fluorescente, es necesario purificar el anticuerpo monoclonal.

Dependiendo del grado de pureza requerido, de la velocidad del proceso, y del mantenimiento de la inmunoreactividad, existen diferentes métodos de purificación.

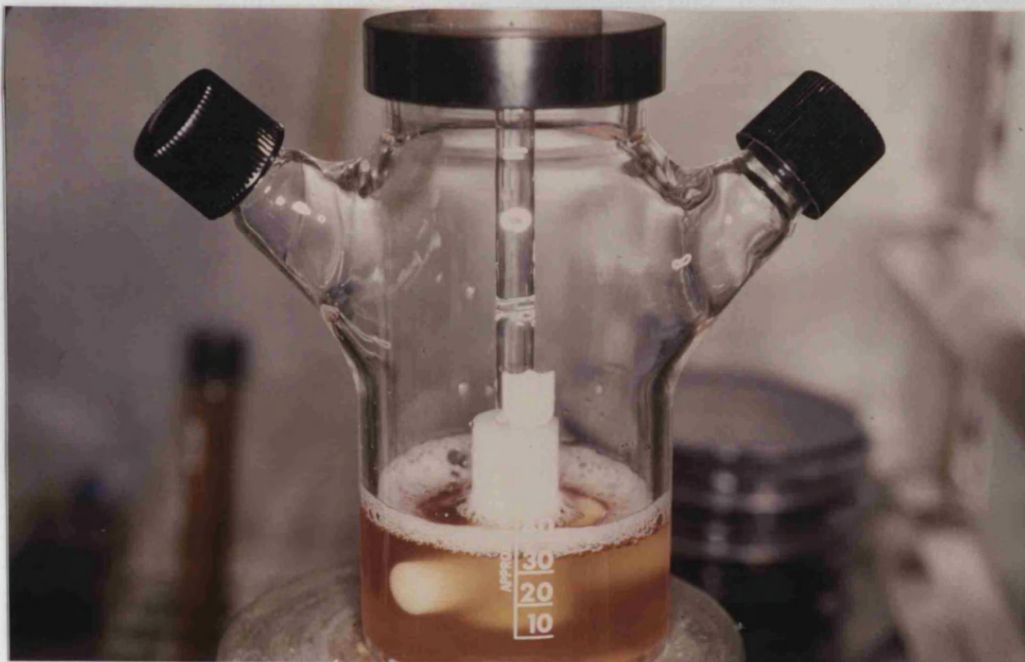


Fig. 13.- Propagación in vitro de los clones productores de anticuerpos monoclonales en frasco - con agitación continua.



Fig. 14.- Ratón Balb/c con ascitis provocada después de inocular por vía intraperitoneal un clon de hibridoma productor de anticuerpos monoclonales.

En el presente trabajo se han empleado los métodos de purificación y concentración descritas a continuación:

- . Precipitación con sulfato amónico.
- . Filtración en gel.
- . Cromatografía en proteína A Sepharosa CL-4B
- . Liofilización.

3.12.1.- Precipitación con sulfato amónico

Un método sencillo para realizar una purificación parcial de los anticuerpos monoclonales es realizar una precipitación con sulfato amónico.

La adición de una solución saturada de sulfato amónico a líquido ascítico del ratón o sobrenadante de clones, produce una captación del agua de hidratación de las proteínas y consecuentemente una precipitación de dichas proteínas.

El procedimiento seguido fue el siguiente:

En primer lugar se preparó una solución saturada (SAS) de sulfato amónico disolviendo 1000 g de esta solución en 1 l de agua a +50°C y en agitación durante 2 h. Posteriormente se permitió precipitar el sulfato amónico no disuelto durante 1 hora, recogiendo el sobrenadante y ajustándose a pH 7.2 con ácido sulfúrico diluido ó amoniaco.

El líquido ascítico fue diluido previamente a 1:2 con tampón PBS frío sobre hielo, y se añadió SAS hasta alcanzar la concentración del 45%.

Posteriormente fué mantenido en agitación a +4°C durante 30 minutos. Una vez transcurrido dicho tiempo el precipitado fue recogido centrifugando a 1000 g durante 15 minutos a +4°C y fue lavado en una solución de sulfato amónico al 45%.

Tras el lavado fue centrifugado de nuevo a 1000 g durante 15 minutos a +4°C y el precipitado fue disuelto en un volumen de PBS igual al volumen de líquido ascítico del que se partió.

A continuación fue purificado centrifugando a 5000 g durante 15 minutos a +4°C y se añadió SAS hasta alcanzar una concentración del 40%.

Tras realizar una nueva recogida de precipitado por centrifugación a 1000 g durante 15 minutos a +4°C, el precipitado se disolvió en un volumen mínimo de tampón PBS.

La solución resultante fué filtrada en gel de Sephadex G-25 para eliminar el sulfato amónico, - técnica que se describe a continuación.

Un método alternativo de eliminar el sulfato amónico, sería la realización de una diálisis, pero se descartó este método por su lentitud.

3.12.2.- Cromatografía

La cromatografía abarca un conjunto de técnicas que permiten separar mezclas de solutos en virtud de la retención que experimentan estos solutos al atravesar un medio poroso (fase estacionaria) al ser arrastrados, a través de este medio por un disolvente en movimiento (fase móvil ó eluyente).

Existen diferentes tipos de técnicas cromatográficas basadas en la naturaleza de la interacción - entre los solutos y la fase estacionaria:

- Cromatografía de adsorción
- Cromatografía de reparto
- Cromatografía de intercambio iónico
- Cromatografía de exclusión molecular
- Cromatografía de afinidad
- Cromatografía continua
- Cromatografía por pasos
- Cromatografía en gradiente

Las técnicas cromatográficas pueden clasificarse también en función de las características de estudio de la fase estacionaria y el eluyente:

Eluyente	Líquido	Gas	Líquido	Gas
Fase estacionaria	Sólido	Sólido	Líquido	Líquido

Por último según la disposición de la fase estacionaria:

- Cromatografía en columna
- Cromatografía abierta

En nuestro trabajo hemos utilizado la cromatografía de filtración en gel y la cromatografía de afinidad con Sepharosa-proteína A, según los métodos que describimos a continuación:

3.12.2.1.- Cromatografía de filtración en gel

Las técnicas de filtración en gel se realizaron utilizando el tipo de Sephadex adecuado para cada propósito.

El Sephadex es un gel obtenido por entrecruzamiento del polisacarido dextrano. Existen diferentes tipos de Sephadex, cada uno de los cuales tiene un grado conocido de entrecruzamiento entre las cadenas de polisacaridos.

Debido al abundante número de grupos hidroxilo, el Sephadex se hincha en agua y soluciones acuosas dando lugar a un gel poroso. El tamaño de los poros esta determinado por el grado de entrecruzamiento. Unicamente las moléculas menores a un determinado tamaño, son capaces de atravesar los intersticios de los poros. Por lo general, el peso molecular es función del tamaño, y en consecuencia, la sustancias pueden ser separadas en función de su peso molecular.

Las moléculas mayores que el tamaño de los poros del Sephadex hinchado no penetran en las partículas del gel y pasan a través de la fase líquida por fuera de dichas partículas siendo eluidas en primer lugar. Las moléculas menores penetran en las partículas del gel dependiendo de su tamaño siendo eluidas según los pesos moleculares decrecientes.

Las inmunoglobulinas precipitadas con sulfato amónico fueron filtradas en una columna de Sephadex G-25 de 40 cm de largo y de 1.2 cm de diametro con un volumen total de 90 ml, siendo el eluyente utilizado tampón PBS con azida sódica al 0.02%

Para montar una columna de Sephadex G-25 -
fué calculado el volumen de la columna a llenar con -
el gel. Una vez conocido dicho volumen, y sabiendo -
que por cada gramo de Sephadex G-25 seco se consigue -
un volumen de 5 ml de gel hinchado, fué pesado el -
Sephadex necesario añadiéndose un exceso del tampón -
referido para hinchar el gel.

El tiempo de hinchado para este gel es de -
2 a 3 horas a temperatura ambiente y de 1 hora en ebu-
llición.

Cuando el gel esta hinchado es retirado el
exceso de tampón de modo que el gel no quede muy lí-
quido, ya que al montar la columna se produzcan co-
rrientes en el gel, ni tampoco muy espeso para que no
fuesen atrapadas burbujas.

A la columna, situada verticalmente en un -
soporte y con un poco de tampón en su parte inferior,
le fué añadido el gel necesario para llenarla.

Una vez depositado el gel, fué colocado en
la parte superior del gel un círculo de papel Whatman
nº 1, de diametro un poco inferior al de la columna.

El filtro tiene la función de evitar la dis-
torsi3n de la parte superior del gel al depositar la
muestra.

Por último la columna es equilibrada con el
tampón que vaya a usarse posteriormente, pasando de
dos a tres veces el volumen de la columna. El equili-
brio es realizado a un flujo constante, trabajándose
posteriormente a ese flujo.

Una vez la columna está equilibrada, antes
de empezar a trabajar con ella se estructuran sus pa-
rámetros característicos como son el volumen muerto -
y el volumen total. Para ello se hace pasar por la co-
lumna una cantidad conocida de azul dextrano al 0.2%.

Para realizar dicha filtración se empleó -
una bomba marca LKB modelo 2232 Microperpex Sa (ref.
LKB 2232) a un flujo constante de 18 ml/h siendo el -
pico de proteínas detectado mediante el uso de un de-
tector UV (LKB modelo 2158 Uvicord SD) y registrado -
en un integrador Shimatzu C-R3A Chromatopac.

Las muestras fueron recolectadas con un co-
lector de fracciones (LKB, modelo 2211, Superrac).

3.12.2.2.- Cromatografía de afinidad con Sepharosa - unida a proteína A

La proteína A es una proteína aislada a partir de la pared *Staphylococcus aureus*, con un peso molecular de 42.000 daltons. Consiste en una cadena simple con varias regiones de homología interna y biológicamente es capaz de interactuar con un amplio rango de moléculas de IgG de diferentes especies.

Mediante el método del bromuro de cianogeno esta proteína puede acoplarse a la Sepharosa CL-4B y ser utilizada como método de aislamiento de anticuerpos de la clase IgG, ó de moléculas de IgG de las subclases 1, 2 y 4, y sus fragmentos conteniendo la región Fc. Las inmunoglobulinas que no sean IgG no serán retenidas y las moléculas retenidas de IgG pueden eluirse con un tampón de pH bajo.

La columna de proteína A-Sepharosa CL-4B, se montó en una jeringilla de 10 ml de volumen, siendo el volumen del lecho de 6 ml.

Los tampones utilizados fueron los siguientes :

- Tampón de equilibrio

Tris 0.05 M

ClNa 0.15 M

pH 8.6

0.2% ácido sodico

- Tampones de elución:

- Acetato sodico 0.1 M pH 3

- Acetato 0.05 M, ClNa 0.05 M, pH 4.3

3.12.3.- Marcado fluorescente

El liófilo con los anticuerpos monoclonales purificados se resuspendió hasta alcanzar una suspensión de 20 mg/ml.

Posteriormente se procedió a marcar estos anticuerpos con fluoresceína del modo siguiente:

Se añadieron 0.05 mg de FITC por mg de proteína total manteniendo la mezcla a +4°C durante 24 horas.

La proteína conjugada fue separada del fluorocromo libre mediante una cromatografía en gel de Sephadex G-25 equilibrada con el siguiente tampón:

- 0.1 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.4
- 0.15M Cloruro sódico
- 0.1% Azida de sodio
- 0.1% Seroalbúmina bovina

La columna de Sepharex G-25 fué separada en una jeringuilla de 10 ml colocando lana de vidrio en su extremo inferior para evitar la pérdida del gel.

Una vez equilibrada la columna fueron colocados 100 microlitros de muestra en la columna y se eluyeron con el mismo tampón recogiendo fracciones de 500 microlitros.

Al observar los tubos con luz ultravioleta aparecieron dos fracciones coloreadas visibles, de las que se recogió la primera correspondiente al conjugado y fué desechada la segunda del fluorocromo libre.

3.12.4.- Liofilización

Los anticuerpos monoclonales una vez purificados a partir de líquido ascítico y sobrenadante de clones, fueron dispensados en viales a razón de 2 ml y congelados a -70°C.

Posteriormente fueron liofilizados en un liofilizador Edwards modelo Modulyo conservándose los liofilos a +4°C.

3.13.- Caracterización de los anticuerpos monoclonales

Como ya hemos comentado la característica más relevante de los anticuerpos monoclonales es su especificidad. Sin embargo, existen otros datos importantes en la caracterización de un anticuerpo monoclonal, como son: título, afinidad, estabilidad, monoclonalidad y determinación de la clase y subclase de inmunoglobulina a la que pertenece dicho anticuerpo monoclonal.

3.13.1.- Especificidad

Un anticuerpo monoclonal viene determinado por su especificidad.

Dicha característica no puede establecerse con absoluta seguridad, ya que no es posible conocer si un determinado anticuerpo monoclonal que reconoce un determinante antigénico específico formando parte de un antígeno puede existir en otro como parte integrante de otra molécula antigénica, es decir existencia de reacciones cruzadas.

Por ello debe establecerse la especificidad en el contexto del uso potencial de dicho anticuerpo.

Para establecer la existencia de reacciones cruzadas un anticuerpo monoclonal frente a un antígeno vírico debe probarse frente a otros virus con los cuales el antígeno diana pudiera ser confundido, y frente a antígenos relacionados (p.ej. células en las que se replica dicho virus).

El estudio de la especificidad de un anticuerpo monoclonal puede realizarse utilizando el método de selección (screening) de anticuerpos monoclonales, como una fase previa y mediante la caracterización inmunoquímica del antígeno.

Los métodos de selección que hemos puesto en marcha para estudiar los anticuerpos monoclonales frente a Herpes simplex son la inmunofluorescencia indirecta y el enzimoanálisis.

La inmunofluorescencia indirecta la realizamos utilizando como antígeno fijado al portaobjetos células Vero infectadas con virus Herpes simplex tipo 1 y 2 y sin infectar (control de inexistencia de reacciones cruzadas con antígenos presentes en la célula sin infectar y control de que el anticuerpo monoclonal se ha obtenido frente a un antígeno de codificación vírica), como hemos expuesto en el apartado 3.7.2.

Para poder estudiar la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos frente a otros virus pertenecientes a la familia Herpesviridae (Citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus Varicella-Zoster), hemos realizado la inmunofluorescencia indirecta con células infectadas fijadas a portaobjetos como antígeno.

En el caso de Citomegalovirus usamos células HEL (fibroblastos humanos de pulmón embrionarios) infectados con dicho virus (cepa AD169) durante 48 horas, para detección de reacciones cruzadas con antígenos precoces de Citomegalovirus y también cuando el efecto citopático vírico afectaba a un 60 a 80% de las células de la monocapa para detectar reacciones cruzadas con otros antígenos.

Para estudiar las reacciones cruzadas frente a virus de Epstein-Barr hemos utilizado células linfoblastoides infectadas por dicho virus, tanto productoras como no-productoras de viriones (P3HRJK y Raji), tratadas con el inductor TPA (phorbol-miristate-acetate) (Sigma P-8139) e IDU (iododexiuridina) (Sigma 17125).

Las células P3HRJK tras exponerlas durante cinco días a 40 nanogramos/ml de TPA expresan antígeno VCA de capsida vírica en un 80% de las células.

Las células Raji expresan el antígeno EBNA, antígeno nuclear de virus de Epstein-Barr.

Las células Raji se recogieron a las setenta y dos horas del pase, centrifugándose y resuspendiéndose en citrato sódico al 1%, colocándose en portaobjetos y siendo fijadas en una mezcla de alcohol/acetona (vol:vol) a -20°C.

Cuando las células Raji son expuestas a iododexiuridina (IDU) expresan en su membrana antígeno precoz EA (early antigen).

Los anticuerpos monoclonales fueron ensayados frente a estos tres tipos de antígenos propios de las células infectadas por virus de Epstein-Barr.

El virus Varicella-Zoster adaptado a células Vero, fue replicado en dichas células, utilizándose se como antígeno a las 48 horas postinfección y también cuando el efecto citopático alcanzaba a un 80% de las células existentes en la monocapa.

Tras treinta minutos de incubación con el anticuerpo monoclonal a +37°C en cámara húmeda, fueron realizados tres lavados de diez minutos de duración cada uno con tampón fosfato salino (PBS) pH 7.2-7.4.

Los portaobjetos fueron incubados posteriormente con inmunoglobulina polivalente anti-ratón (Ortho) a la dilución 1:20 durante treinta minutos en cámara húmeda a +37°C, lavándose después 3 veces en tampón fosfato salino (10 minutos cada vez) y cinco minutos en una solución de azul de Evans al 0.1%. Fueron montados con glicerina tamponada tras un lavado con agua destilada y secado, observándose con un microscopio de epifluorescencia (Leitz).

La caracterización inmunoquímica del antígeno frente al que posee actividad el anticuerpo se realizó mediante separación de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferencia de dichas proteínas a membrana de nitrocelulosa y posterior reacción inmunológica sobre el papel de nitrocelulosa, como fué descrito en el apartado 3.10.

3.13.2.- Título

El título de un lote de anticuerpo monoclonal nos informa de la cantidad de anticuerpo disponible en un determinado volumen. El título de un anticuerpo se calcula conociendo la máxima dilución a la que se obtiene un resultado positivo en una prueba concreta.

El título de nuestros anticuerpos monoclonales fue determinado mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando como antígeno células Vero infectadas con virus Herpes simplex tipo 1 y 2 respectivamente a las 16 horas postinoculación, exponiendo las células a diluciones seriadas (1:2ⁿ) del anticuerpo monoclonal.

Como ya hemos expuesto la máxima dilución - que ofrece resultados positivos (fluorescencia celular) se considera el título de dicho lote de anticuerpo.

Esta determinación es de escaso valor y sólo nos sirve para uso interno, dándonos una idea de la dilución de uso y para evaluar su estabilidad tras la conservación por distintos procedimientos.

3.13.3.- Actividad específica

La actividad específica de un anticuerpo monoclonal se expresa en unidades de actividad por miligramo de inmunoglobulina.

$$\text{Nº de unidades} = \text{Inversa del título} \times \text{mg de inmunoglobulina/ml}$$

El título se determinó, como ya hemos expuesto en el apartado anterior (ver apartado 3.12.2.).

La determinación proteica puede realizarse de dos formas, como cuantificación de proteínas totales ó mediante la cuantificación de las inmunoglobulinas, siendo esta última la que aporta una información más precisa sobre la cantidad de anticuerpo existente por mililitro.

La cuantificación de proteínas totales fué realizada mediante el método de LOWRY (1951) y el método de BRADFORD (Azul Coomassie, Bio-Rad).

La cuantificación de inmunoglobulinas se realizó mediante la inmunodifusión radial (IDR) como se describe en el apartado 3.14.5.2.

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

La cuantificación proteica por el método de Lowry se realizó de la siguiente forma:

Elaboración de una recta patrón

Fueron preparadas soluciones patrón con seroalbúmina bovina (BSA) entre 10 y 100 microgramos/mililitro, utilizando una solución inicial de BSA de 100 microgramos/mililitro pesando 5 mg y diluyéndolos en 50 mililitros de agua destilada.

A continuación fueron preparados los siguientes tubos para elaborar la recta patrón:

Tubo nº	1	2	3	4	5	6
BSA/ml de la solución inicial	-	0.1	0.25	0.5	0.75	1
Agua destilada (ml)	1	0.9	0.75	0.5	0.25	-

Con la recta patrón se interpolaron las absorbancias de la muestra y su concentración es proporcional en el rango de 10 a 100 microgramos/ml.

Preparación de reactivos

Reactivo A:

Carbonato sódico (Na_2CO_3) _____	2	%
Hidróxido sódico (NaOH) _____	0.4	%
Tartrato sódico potásico _____	0.16	%
Dodecil sulfato sodico (SDS) _____	1	%

Para su preparación todos los componentes - excepto el SDS fueron disueltos en un volumen inferior a 1 litro, añadiendo el SDS y colocando el matraz en agitación continua. Cuando el SDS estuvo totalmente disuelto (2 a 3 horas) fué enrasado a un litro en un matraz aforado.

Reactivo B:

Sulfato de cobre (CuSO_4). 5 H_2O al 4 %

Reactivo C:

Se mezclan 100 partes de reactivo A y 1 parte de reactivo B. Los reactivos A y B son estables - independientemente a temperatura ambiente, pero en frío precipita el SDS.

Los reactivos A y B se preparan al menos un día antes de ser utilizados.

Reactivo D:

Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck) al 50% en agua destilada.

Procedimiento:

- . Preparar los tubos con una muestra patrón de BSA (1 ml en cada tubo).
- . Depositar en un tubo 1 mililitro de la muestra problema.
- . Preparar el reactivo C y añadir 3 mililitros a cada tubo, agitando de forma intensa.
- . Incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos.
- . Añadir 0.3 ml a cada tubo del reactivo D al 50% , - agitar e incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Este reactivo debe prepararse en el momento de uso.
- . Medir la absorbancia en un espectrofotómetro Uvi--cord con cubeta de vidrio a 660 nm.

Cuantificación por el método de azul de Coomassie

Este método esta basado en el cambio de absorbancia de un colorante al unirse a diferentes concentraciones de proteínas segun describió BRADFORD (1976).

La absorbancia maxima para una solución acida de azul brillante de Coomassie G-250 cambia de 465 a 595 nm cuando se une a proteínas.

El método es facil y rápido de realizar, la absorbancia de los complejos proteina-colorante es realmente estable, y no existen muchas de las interferencias que limitan el uso del método de Lowry.

Solamente cuando existen detergentes a una concentración superior al 0.1% y cuando existen tamp^ones fuertemente alcalinos se producen interferencias en el método.

El procedimiento seguido para realizarlo -
fué el siguiente:

El colorante proporcionado por Bio-Rad (Brilliant Blue Azul Coomassie G-250 Ref. 161-0406) disuelto en metanol y ácido fosfórico fue diluido a 1:5 y filtrado por un papel Whatman nº 1.

El colorante diluido es estable a temperatura ambiente durante una semana.

Fue preparada también una solución de seroalbovina de 1.4 mg/ml para elaborar la recta patrón.

Posteriormente fueron colocados 0.1 ml de patrón y muestra a la dilución conveniente, así como 0.1 ml de agua como tubo blanco.

Fueron añadidos 5 ml del colorante diluido y mezclados manteniéndose a continuación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se midió la absorbancia a 595 nm.

Los valores de absorbancia obtenidos con las muestras se interpolaron en la recta patrón y de este modo pudieron conocerse las concentraciones proteicas de nuestras muestras.

3.13.4.- Conservación y estabilidad

La conservación de los anticuerpos monoclonales como sobrenadantes de clones ó líquido ascítico puede realizarse a +4°C, congelados entre -20°C a -100°C ó nitrógeno líquido y liofilizados.

La estabilidad es un parámetro de significación puramente práctica, pues nos informa de las alteraciones que pueden sufrir dichos anticuerpos monoclonales en función de su forma de conservación y de su uso.

Nosotros hemos mantenido los anticuerpos monoclonales a una concentración igual de inmunoglobulinas conocida y a diferentes formas de conservación durante 30, 60 y 90 días, respectivamente, midiendo la concentración de inmunoglobulinas tras estos períodos y relacionándolo con la forma de conservación.

El mantenimiento a +4°C se realizó con azida de sodio 0.02M para inhibir el crecimiento bacteriano. Realizamos congelaciones y descongelaciones (4 veces) valorando la pérdida de actividad específica de los anticuerpos monoclonales.

3.13.5.- Determinación de clase/subclase

La clase/subclase de un anticuerpo monoclonal tiene interés para considerar sus aplicaciones, como por ejemplo la IgM es útil para experimentos de citotoxicidad mientras que no se fijará a la proteína A, y es también una indicación de monoclonalidad.

Hemos utilizado dos métodos para caracterizar la clase de inmunoglobulina, inmunofluorescencia indirecta sobre las células del clon y por inmunodifusión radial con el sobrenadante.

3.13.5.1.- Inmunofluorescencia indirecta sobre las células del clon.

La inmunofluorescencia indirecta ha sido utilizada con antígeno de células híbridas productoras del anticuerpo monoclonal específico frente a virus Herpes simplex tipo 1 y 2, utilizando en este caso la propiedad de poseer en su membrana la inmunoglobulina que secretan.

Para ello las células híbridas fueron recogidas, lavadas en tampón fosfato salino (PBS) y resuspendidas también en tampón PBS a una concentración de 10.6 células por mililitro.

A continuación fué añadido suero bovino fetal (10%) a la suspensión celular para que se adhieran mejor a los portaobjetos, preparándose portaobjetos de citocentrifuga y utilizando 100 microlitros de la suspensión celular para cada portaobjetos.

Las células fueron fijadas a los portaobjetos con metanol durante un minuto y lavadas con tampón fosfato salino.

Fueron preparadas diluciones al 1:20 de suero antiisotipos (IgG, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM).

A cada portaobjetos fueron añadidos 50 microlitros de cada suero anti-isotipo respectivamente y fueron incubadas durante 45 minutos en cámara húmeda a +37°C.

Posteriormente fueron lavados tres veces en tampón fosfato salino, durante tres minutos cada vez.

Los portaobjetos fueron secados con papel absorbente alrededor de la zona donde estaban depositadas las células, pero de forma que la zona con las células permaneciese húmeda.

Fueron añadidos 50 microlitros de conjugado fluorescente anti-inmunoglobulina (Ortho) e incubados durante 45 minutos en cámara húmeda a +37°C.

Finalmente fueron realizados tres lavados - como antes, secado y montado con glicerina tamponada pH 8.9 visualizándose los resultados en un microscopio de luz ultravioleta (Leitz Orthoplan).

3.13.5.2.- Inmunodifusión radial.

La inmunodifusión radial permite caracterizar y cuantificar simultáneamente el anticuerpo monoclonal.

La inmunodifusión radial fué introducida - por MANCINI et al. (1965) para cuantificar inmunoglobulinas, y en ella un antígeno (inmunoglobulina) difunde en un gel que contiene un anticuerpo específico frente a la inmunoglobulina que deseamos caracterizar.

La difusión permite la precipitación por una antígeno-anticuerpo (inmunoglobulina - anti-inmunoglobulina), apareciendo un halo de precipitación al rededor del pocillo desde el que difunde el antígeno. El diametro del halo de precipitación es directamente proporcional a la concentración del antígeno en el pocillo.

La inmunodifusión radial de nuestros anticuerpos fue efectuada a partir de sobrenadantes concentrados con membrana minicon-B (Amicon) a razón de 1 mg/ml de proteína total.

Para realizar la inmunodifusión radial se siguió el siguiente procedimiento:

- . Preparación del gel de agarosa con el antisuero específico incorporado.
- . Distribución de las muestras en el gel
- . Difusión de la muestra
- . Tratamiento de la placa para la cuantificación
- . Lectura de los resultados

Para preparar el gel de agarosa fue utilizada agarosa a la concentración final de 1% en tampón fosfato pH 8.

El tampón fosfato utilizado tenía la siguiente composición:

- Solución A

52.26 g de fosfato bipotásico en 1000 ml de agua destilada.

- Solución B

4.08 g de fosfato monopotásico en 1000 ml de agua destilada.

Para preparar el tampón final fueron mezclados 950 ml de la solución A y 50 ml de la solución B, agregándose 6.5 g de azida de sodio. El pH fue ajustado a 8 con NaOH 7.5 N ó ClN 10 N según fue necesario.

La conservación se efectuó a +4°C y fue usado diluido al 1:10.

Los antisueros anti-ratón empleados fueron:

- . Anti - IgG (Sigma ref. M3014).
- . Anti - IgG1, anti - IgG2a, anti - IgG2b, anti - IgG3 (Sigma ref. M8144, M8269, M8394, M8519).
- . Anti - IgA (Sigma ref. M7144).
- . Anti - IgM (Sigma ref. M7019).

Todos los antisueros fueron incorporados a la concentración final en el gel del 3%.

El antisuero se incorporó al gel de agarosa mientras este se mantuvo líquido en un baño a +56°C, procurando que desde la incorporación del antisuero hasta la preparación de la placa transcurriese el menor tiempo posible.

Una vez mezclado el gel con el antisuero, - fué distribuido sobre una placa de cristal precoaptada con una solución de agarosa al 1% en agua destilada para que pueda fijarse a ella el gel.

Para obtener una capa de gel de espesor uniforme (1mm) se utilizaron dos placas de vidrio, de las cuales sólo una de ellas había sido precoaptada con agarosa, interponiendo entre ambas un marco en forma de -U- de 1 mm de espesor, fijando el conjunto de las piezas con pinzas que mantuviesen unidas ambas placas.

Una vez solidificada la agarosa fué depositada en el molde con una pipeta precalentada inclinando la placa para que no se produjesen burbujas de aire y fué retirada la placa de vidrio no coaptada y el molde en -U-.

- Colocación de las muestras

Las muestras se aplicaron en pocillos horadados en el gel.

Estos pocillos se realizaron con un troquel extrayéndose el gel de su interior mediante un sistema de aspiración.

El diámetro de los pocillos es de 2 milímetros y pueden recibir 3 microlitros del sobrenadante del clon productor del anticuerpo monoclonal problema

En cada placa debe colocarse pocillos con soluciones control de inmunoglobulinas, es decir de una mezcla de inmunoglobulinas (Serotec Was 05) de ratón, pura y diluida a 1:2 y a 1:4.

- Difusión de las muestras

Una vez colocadas las muestras en los pocillos, las placas fueron incubadas en una cámara húmeda. El tiempo y temperatura de incubación dependió del tipo de inmunoglobulina a cuantificar:

IgG : 16 a 20 horas a +4°C

IgM : 24 a 36 horas a temperatura ambiente (+20°C a +50°C)

IgA : 16 a 20 horas a +4°C

- Tratamiento de las placas para la lectura

La observación y medición del halo puede realizarse directamente ó tras tinción de la placa.

Antes de proceder a la tinción, se eliminaron las proteínas no precipitadas. Para ello el gel de agarosa fué cubierto con un papel de filtro (Whatman nº 1) previamente humedecido con agua, evitando la presencia de burbujas de aire entre el papel y el gel.

El gel cubierto con papel de filtro se colocó a +37°C durante unas horas hasta su secado, lavando la placa cuando este seca, ya que el papel de filtro se desprende solo.

Los geles fueron introducidos en una solución colorante de azul brillante de Coomassie durante 15 minutos. La composición de la solución colorante es:

- . Coomassie brillant blue R 250 _____ 10 g
(Merck 12553)
- . Alcohol etílico 96° _____ 900 ml
- . Acido acético glacial _____ 200 ml
- . Agua destilada _____ 900 ml

Tras los 15 minutos de tinción se decoloró el gel introduciendolo en una cubeta que contiene un decolorante preparado según la siguiente composición:

- . Agua destilada _____ 450 ml
- . Alcohol etílico _____ 450 ml
- . Acido acético glacial ____ 100 ml

Tras decolorar, se introdujo el gel durante unos minutos en un baño de agua y se procedió a su secado con una corriente de aire caliente.

- Lectura de los resultados

Apareció un halo de precipitado donde había existido reacción antígeno - anticuerpo, identificandose de ese modo la clase y subclase de inmunoglobulina a la que pertenece el anticuerpo monoclonal problema.

Además a partir de las medidas de los diámetros de los halos obtenidos con las tres diluciones del suero patrón (de contenido patrón puro, patrón - diluido a 1:2 y patrón diluido a 1:4) se elabora una gráfica en papel semilogarítmico representando en el eje de abscisas las concentraciones (mg/dl) y en el - eje de ordenadas los diámetros correspondientes (mm), trazandose una recta que pasa por los tres puntos.

Los resultados obtenidos fueron interpolados para conocer la concentración existente en la - muestra a partir del diámetro del halo de precipitado.

3.13.6.- Monoclonalidad

La monoclonalidad de un anticuerpo monoclonal viene definida por la existencia de una sola subclase de inmunoglobulinas y de un sólo tipo celular - presente en el hibridoma.

Nosotros hemos determinado la monoclonalidad de acuerdo con el primer parametro estudiándolo - mediante inmunodifusión radial y el método de Ouchterlony.

El segundo parámetro ha sido confirmado mediante subclonado del clon productor de los anticuerpos específicos y producción a partir de una única célula.

3.13.7.- Capacidad neutralizante

La capacidad neutralizante *in vitro* puede determinarse por la capacidad de dicho anticuerpo monoclonal de impedir la aparición de efecto citopático en las células al ser infectadas por virus Herpes simplex tipos 1 y 2.

Para ello utilizamos células Vero susceptibles de ser infectadas por dicho virus a razón de 100 TCID₅₀, anticuerpo monoclonal procedente de ascitis de ratón Balb/c a unas concentraciones determinadas (5 mg/ml y 15 mg/ml) puro y realizando diluciones de los mismos entre 1:5 y 1:80 en medio MEM con 10% de suero bovino fetal (SBF).

La realización fue la que a continuación se describe:

Fueron distribuidos 25 microlitros de medio MEM al 10% de SBF en cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc).

A continuación se dispensaron 25 microlitros por pocillo de una suspensión vírica conteniendo 100 TCID₅₀ de VHS-1 en unos pocillos y 100 TCID₅₀ de otra suspensión vírica de VHS-2 en otros. No fue añadido virus en el pocillo de control de células, ni en el pocillo de control del suero (1 de cada).

Posteriormente fueron añadidos 25 microlitros de cada dilución del anticuerpo monoclonal con cada dilución por cuadruplicado y a su vez tanto con el monoclonal frente a VHS-1, como de virus VHS-2 y con cada una de las concentraciones proteicas.

Finalmente fue mantenido en incubación a temperatura ambiente durante 1 hora tras haber agitado la placa en un agitador plano.

Fueron añadidos 25 microlitros de medio MEM conteniendo 300.000 células Vero por mililitro.

En los pocillos control de virus fueron sustituidos los 25 microlitros de la dilución del anticuerpo monoclonal por medio de cultivo.

En el caso del control de suero, fueron sustituidos por medio los 25 microlitros del anticuerpo monoclonal y en el caso del control de células se sustituyó por medio de cultivo (75 microlitros) la sus--pensión vírica y el anticuerpo.

La lectura se realizó en el microscopio in--vertido 24 horas despues, valorando la ausencia de - efecto citopático vírico como indice de seroneutrali--zación.

3.13.8.- Aparición de las proteínas detectadas en cé--lulas infectadas

Para detectar la aparición de las proteínas detectadas de VHS en células infectadas fueron prepa--radas dos placas de 24 pocillos (Nunc) con 3 x 10.5 - células Vero por ml en cada pocillo.

La incubación fué efectuada durante 24 ho--ras en estufa de CO₂ al 5%, eliminándose el sobrena--dante que fue sustituido por una suspensión vírica - (100TCID 50) a razón de 250 microlitros por pocillo. Fue utilizada una placa para VHS-1 y otra para VHS-2.

Tras una hora de adsorción fue añadido MEM (Minimum Essential Medium) al 2% hasta completar la capacidad del pocillo.

La recogida de la monocapa celular fue -- efectuada cada hora a partir de 4 horas postinocula--ción mediante tripinización, centrifugación en tubos Ependorf (Haereus. Minifuge) y tres lavados con tam--pón fosfato salino pH 7.2 - 7.4.

El sedimento celular fue resuspendido en - 100 microlitros de tampón fosfato salino (PBS), dis--tribuyéndose la suspensión celular en un portaobjetos de inmunofluorescencia (Flow).

Después de secar a temperatura ambiente se procedió a la fijación en acetona fría a +4°C y a rea--lizar la inmunofluorescencia indirecta con los anti--cuerpos monoclonales como se describió en el apartado 3.7.2.

4.- RESULTADOS

El objetivo principal del proyecto es la identificación de proteínas antigénicas de virus Herpes simplex específicas de tipo 1 y/o 2, que permitan diferenciar entre ambos. Para ello es necesario determinar el peso molecular y su antigenicidad, siendo éste el aspecto mas importante.

Para determinar la antigenicidad de elevada especificidad es necesario obtener de anticuerpos monoclonales lo cual ha exigido el desarrollo y puesta en marcha de la metodología de obtención de los anticuerpos monoclonales.

Así pues, podemos considerar la obtención de anticuerpos monoclonales como un objetivo, condición sine qua non, para poder caracterizar las proteínas diferenciadoras o tipos específicas codificadas por el VHS y expresadas en la célula en la que se replica.

El desarrollo de esta metodología presenta unas líneas básicas a seguir señaladas en la literatura científica sobre el tema, pero que ha sido necesario adaptar a nuestras condiciones de trabajo y de nuestro modelo exigiendo la evaluación de protocolos y métodos de laboratorio necesarios para su logro.

Presentamos pues, los resultados obtenidos, siguiendo el esquema de producción de anticuerpos monoclonales, ya que ha sido realmente el orden de trabajo seguido para conseguir los objetivos propuestos en nuestra hipótesis de trabajo.

4.1.- Inmunización de animales

Debido a la importancia de una buena inmunización por parte de los ratones para obtener clones productores de anticuerpos monoclonales, realizamos varias experiencias previas destinadas a obtener ratones productores de anticuerpos específicos.

4.1.1.- Antígeno inmunizante

Para obtener animales con anticuerpos frente a virus Herpes simplex se ensayaron varias formas de preparar el antígeno inmunizante.

Una de ellas fué utilizando como antígeno células Vero infectadas con VHS (VHS-1 o VHS-2) con 100 TCID₅₀ y cuando el efecto citopático era de un 60%, la monocapa fué tripsinizada, recogidas las células por centrifugación y lavadas en tampón fosfato salino, ajustándolas a una concentración de 2×10^6 células/mililitro.

La otra forma de obtención del antígeno inmunizante fue tras someter las células infectadas a tres ciclos de congelación-descongelación y posteriormente purificar el extrado centrifugando a 1500 rpm, para que sedimentasen los restos celulares y quedasen las partículas víricas en el sobrenadante.

Fueron inoculados dos lotes de 6 ratones - cada uno con los antígenos celular y soluble respectivamente, siguiendo la pauta de una inoculación semanal. En la primera inoculación fué utilizado antígeno soluble con adyuvante completo de Freund (1:1).

Un mes después los ratones fueron sangrados por la cola, y su suero probado mediante inmunofluorescencia indirecta sobre células infectadas con VHS (VHS-1 o VHS-2) y sobre células Vero no-infectadas, como antígeno control.

Todos los ratones presentaban anticuerpos frente a las células Vero infectadas por VHS (100%). Sin embargo, ninguno de los ratones inoculados con antígeno soluble presentó anticuerpos frente a las células Vero sin infectar con VHS.

Un 80% de los animales inmunizados con antígeno celular presentaron anticuerpos detectados por inmunofluorescencia frente a las células Vero no-infectadas por VHS.

De esta experiencia previa, dedujimos que las inmunizaciones serían realizadas con antígeno soluble, pues la posibilidad de obtener clones de hibridoma productores de anticuerpos monoclonales frente a los antígenos celulares era mínima.

Además, permitió la congelación en alícuotas de un lote titulado y conservado a -70°C , que fué utilizado para toda la inoculación, sin necesidad de tener que preparar el antígeno en cada ocasión.

Los ensayos previos inoculando concentraciones víricas superiores a 10.4 UFP/ml no ofrecen un rendimiento óptimo en la inmunización ya que se provoca en los ratones un cuadro encefalítico que lleva a la muerte.

Comparando la mortalidad de dos lotes de ratones Balb/c de seis semanas de edad (diez ratones en cada lote) tras la inoculación de 10.2 UFP/mililitro y 10.4 UFP/mililitro respectivamente, observamos un porcentaje más elevado de éxitos en el lote inoculado con 10.4 UFP/mililitro (80%) (tabla 1).

Sin embargo, el porcentaje de ratones que tras cuatro inoculaciones semanales con 10.4 UFP/mililitro presentaban anticuerpos específicos frente a VHS por inmunofluorescencia indirecta con células Vero infectadas con VHS es de un 80% y de un 60% el obtenido tras la inoculación de 10.2 UFP/mililitro. (tabla 1).

Tabla 1.- Efectos obtenidos sobre la supervivencia de los ratones inoculados y su inmunización -- utilizando dos concentraciones de virus -- Herpes simplex (UFP/ml) en 10 ratones -- Balb/c

UFP/ml	Nº de exitus		Nº de ratones con anticuerpos	
	Nº	%	Nº	%
10.2	2	20	6	60
10.4	8	80	8	80

Debido a la elevada mortandad obtenida cuando utilizabamos el antígeno sin inactivar, procedimos a inactivarlo sometiendo a +56°C durante 10 minutos e inoculando posteriormente a los ratones. De esta forma obtuvimos también ratones inmunizados y sin mortalidad.

Como consecuencia de estas experiencias preliminares el antígeno utilizado para inmunizar fue el antígeno soluble, a la concentración de 10.2 UFP/mililitro e inactivado por calor.

4.1.2.- Procedimientos de inoculación

Ensayamos tres procedimientos de inoculación, intraperitoneal semanal, subcutáneo semanal e intravenoso semanal.

- . La inoculación intraperitoneal semanal durante cuatro semanas, fué efectuada la primera ocasión con adyuvante completo de Freund (1:1) y las restantes sin adyuvante, siendo administrada la última tres días antes de efectuar la fusión.
- . La inoculación subcutánea semanal fué efectuada igual que la anterior, pero por vía subcutánea.
- . La inoculación intravenosa semanal fué efectuada igual que las pautas anteriores pero sin adyuvante de Freund en la primera inoculación.

Un 75% de los ratones inoculados por vía intraperitoneal presentaban anticuerpos frente a VHS mediante inmunofluorescencia indirecta y sólo un 60% de los inoculados por vía subcutánea.

La inoculación por vía intravenosa presentaba elevada mortandad, y al mismo tiempo era más difícil de realizar por lo que fue abandonada para todas las inoculaciones posteriores.

4.2.- Agentes promotores de fusión

Desde los trabajos de KÖHLER y MILSTEIN (1975) es sabido que las fusiones celulares pueden producirse espontáneamente, pero estas son escasas. Es necesario añadir algún agente que incremente las posibilidades de que las células se fusionen y que permita ejercer un cierto control sobre el proceso. El agente promotor de la fusión más utilizado es el polietilenglicol (PEG). Nosotros hemos empleado PEG-1500 (Merck) en solución al 50% (peso/volumen) en medio RPMI-1640, con pH ajustado a 7.2 - 7.4.

Sin embargo, realizamos ensayos previos, partiendo de un mismo frasco de células (spinner vessel) y realizando fusiones con células procedentes de ratones sin inmunizar.

Los medios utilizados (RPMI-1640, PBS-J) procedían de un mismo lote, así como las placas de 96 pocillos (Nunc), incubándose en la misma estufa de CO₂.

La única variable en estas fusiones fué la concentración y el peso molecular del polietilenglicol utilizado.

Así pues, ensayamos con distintos pesos moleculares, realizando combinaciones con las concentraciones a utilizar, para conocer así, la mejor forma de uso del agente fusogéno PEG en nuestras condiciones de trabajo, con nuestra línea celular y nuestros medios de cultivo.

Fueron realizadas fusiones con polietilenglicol (Merck) de pesos moleculares 1.000, 1.500 y 4.000, todos ellos a las concentraciones del 30%, 40% y 50%.

Para poder comparar los resultados, realizamos un recuento de los clones obtenidos post-fusión con cada una de las distintas concentraciones y pesos moleculares del agente fusogéno.

Los porcentajes fueron calculados contando el número de clones de células híbridas aparecidos por placa de 96 pocillos (Tabla 2).

Tabla 2.- Porcentaje de clones obtenidos con tres tipos de polietilenglicol de diferentes pesos moleculares (1.000, 1.500 y 4.000) y utilizados a tres concentraciones diferentes -- (30, 40 y 50 por cien).

Concentración de PEG(%)	PEG (pm)		
	1.000	1.500	4.000
30	35	60	50
40	40	60	40
50	55	70	30

Observamos que los mayores porcentajes de híbridos fueron obtenidos utilizando polietilenglicol 1500 a la concentración 50% en medio RPMI-1640 sin suero bovino fetal y ajustado a pH 7.2 -7.4.

Tal como expuso LOVBORG (1982) una solución muy concentrada de PEG es de elevada osmolaridad, lo que puede ser corregido con la adición de DMSO (dimetilsulfóxido).

De ahí que intentásemos disminuir la toxicidad del PEG-4000 añadiendo DMSO al 5%. Sin embargo, los resultados obtenidos no mejoraron el porcentaje de híbridos obtenidos.

También el tiempo de contacto del PEG con las células a fusionar antes de diluir e inactivar su efecto con la adición de medio con SBF es un factor determinante de la toxicidad celular a tener en cuenta para obtener un porcentaje de fusión óptimo.

Los ensayos anteriores los realizamos manteniendo la solución de PEG junto con las células durante un minuto, antes de ser diluido, tal como señalaron GALFRE y MILSTEIN, 1982.

Cuando ya habíamos decidido la utilización del PEG-1500 al 50% realizamos distintas fusiones manteniendo las células en contacto con el PEG, entre uno y cinco minutos.

Los resultados obtenidos proporcionaron un porcentaje de fusión superior (70%) cuando sólo estaban en contacto un minuto, ya que la toxicidad del PEG sobre la célula era mayor que el número de células fusionadas.

De ahí, que tras estos ensayos, utilizásemos en nuestras fusiones posteriores y en las mismas condiciones de trabajo PEG-1500 al 50%, sin DMSO y con sólo un minuto de contacto del agente fusógeno con las células a fusionar.

4.3.- Distribución de células postfusión en placas

La distribución de las células tras la adición del polietilenglicol (PEG) es de capital importancia para la selección rápida de los híbridos productores de anticuerpos monoclonales específicos.

Ensayamos la distribución de las células en placas de veinticuatro pocillos (Nunc) a razón de un mililitro/pocillo y en placas de 96 pocillos a razón de 100 microlitros/pocillo, partiendo de una misma concentración celular (2.5 a 5×10.4 células/ml).

La utilización de las placas de 96 pocillos permitió obtener clones de células híbridas aisladas, obviando en algunos casos el clonado posterior de los mismos y acelerando la selección de los clones productores de anticuerpos específicos.

Utilizando las placas de 24 pocillos y la inmunofluorescencia indirecta como método de selección no obtuvimos clones productores hasta el día veintiocho postfusión, debido a la escasa concentración del anticuerpo en el medio de crecimiento de los clones, encontrándose en este momento un elevado número de células por pocillo (2×10.6 células/mililitro) lo que hacía necesario múltiples clonados posteriores.

Con las placas de 96 pocillos obtuvimos -- clones únicos por pocillo y positividad con el método de selección a los catorce ó veintiún días post-fusión (Fig. 15)

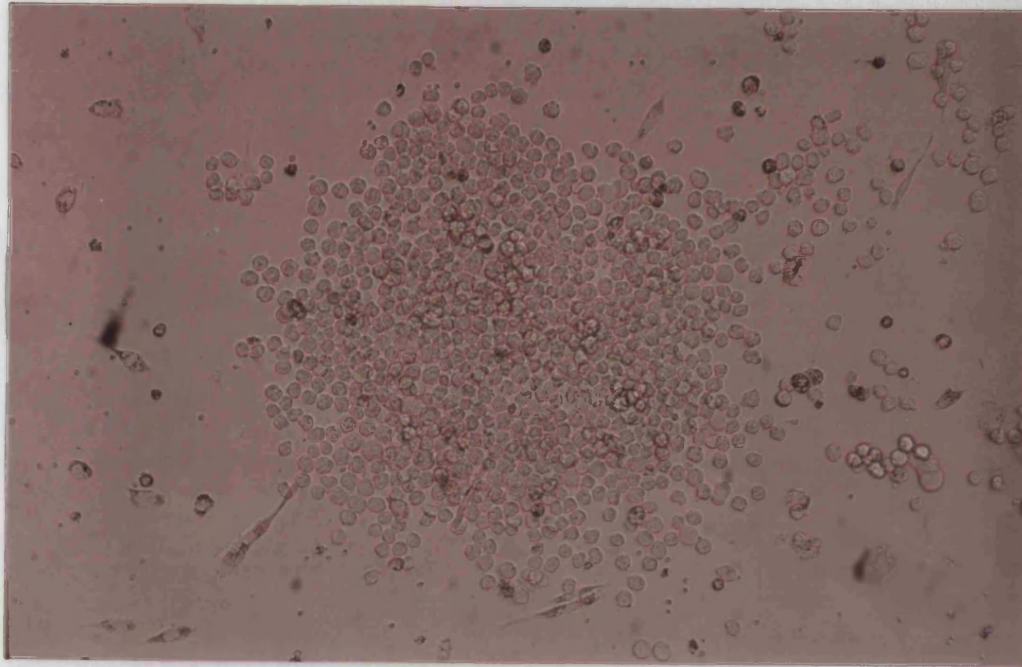


Fig. 15.- Clon de hibridoma de ratón Balb/c inoculado con el VHS-1 cepa VR3 McIntyre, obtenido por el método de dilución límite en placa de 96 pocillos de 200 microlitros de capacidad (10x). Observense las células alargadas o estrelladas aisladas por la superficie del pocillo correspondientes a los macrófagos peritoneales utilizados como células "feeders".

4.4.- Detección de la producción de anticuerpos monoclonales específicos

Para poder detectar los anticuerpos monoclonales específicos a partir del medio de crecimiento de los clones fué necesario normalizar y poner a punto dos métodos de selección: la inmunofluorescencia indirecta y el enzimoimmunoanálisis (ELISA).

4.4.1.- Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

Para normalizar el antígeno destinado al método ELISA realizamos pruebas con un suero polivalente de ratón con anticuerpos específicos frente a virus Herpes simplex a una dilución (1:2000) en tampón fosfato salino que presentaba la misma concentración proteica (10 microgramos/ mililitro) existente en el medio de crecimiento de los clones.

Ensayando este suero polivalente frente a concentraciones del antígeno entre 1:10 y 1:500, observando que la dilución 1:100 del mismo era la óptima para su uso, pues las diferencias entre el suero con anticuerpos específicos (positivo) y el suero sin ellos (negativo) era máxima a este dilución.

Este método de ELISA utilizando antígeno de VHS-1 o VHS-2 obtenido de la forma expuesta en el apartado 3.7.3.1.1 es más sensible que la inmunofluorescencia, pues permitió en algún caso detectar clones productores de anticuerpos monoclonales específicos, cuando todavía no lo había permitido la inmunofluorescencia indirecta.

Sin embargo, debido probablemente a que el antígeno fué preparado a partir de células Vero infectadas con VHS y no de viriones purificados, presentaba grandes dificultades en su interpretación.

Debido a que el método ELISA utilizando dicho antígeno (es decir ELISA de detección de clones productores de anticuerpos específicos frente a VHS-1 y/o 2) en muchas ocasiones presentaba densidades ópticas elevadas con medio de crecimiento de células híbridas que posteriormente no era confirmado mediante IFI ni Western-blot (53% de falsos positivos con respecto a estos otros dos métodos de referencia) nos planteamos desarrollar el método de ELISA para detectar inmunoglobulinas de ratón a partir del medio de crecimiento de híbridos como describimos en el apartado 3.7.3.2.

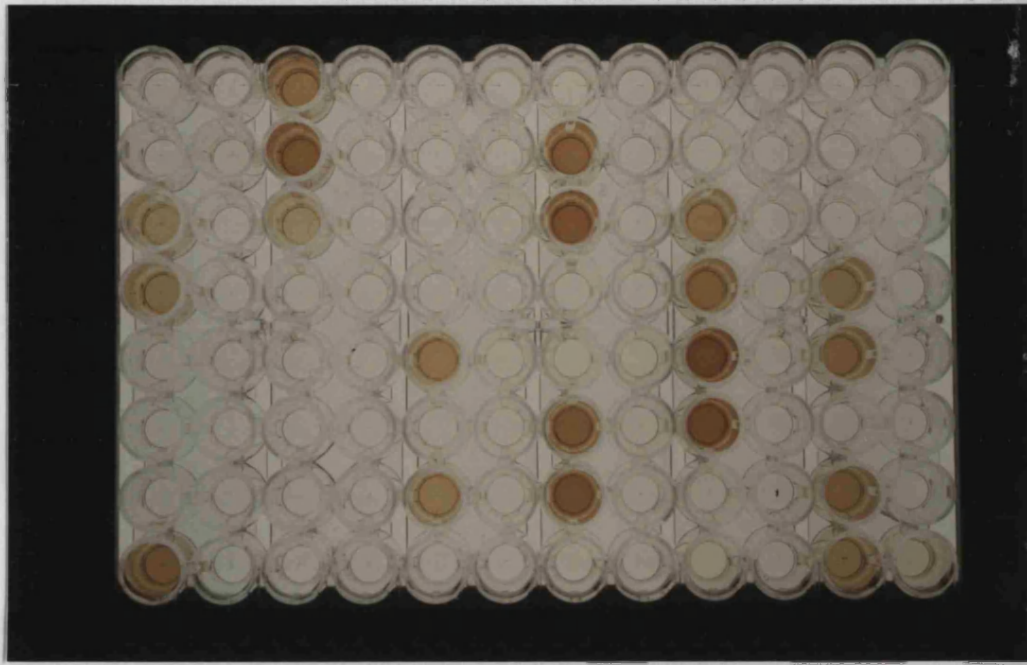


Fig. 16.- Placa de enzimoimmunoanálisis para detectar producción de inmunoglobulinas en los clones desarrollados en los pocillos.

No hemos encontrado ningún falso negativo, y solo un 5% de falsos positivos (o falsos positivos relativos), probablemente debidos a los problemas de fijación a la fase sólida.

Este método de ELISA fue utilizado como método de selección por su sensibilidad y facilidad de realización, sobre todo manejando gran número de muestras (Fig. 16)

4.4.2.- Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando como antígeno células Vero infectadas con --- VHS-1 o VHS-2, fue utilizada como método de confirmación de los resultados obtenidos mediante ELISA.

Este método permite detectar clones productores de anticuerpos específicos, cuando la concentración del anticuerpo en el medio de crecimiento del clon es superior a 5 microgramos/mililitro y ya ha podido ser detectado por ELISA.

La IFI es pues un método más específico, -- pero menos sensible.

El problema que planteó la IFI fue el gran número de portaobjetos a manejar, ya que cada medio de cultivo de clon positivo por ELISA, debió enfrentarse al antígeno celular recogido a horas distintas postinoculación, para detectar así también la existencia de clones productores de anticuerpos monoclonales frente a las proteínas precoces.

Todos los clones fueron tratados dos veces antes de ser rechazados como no-productores de anticuerpos específicos frente a VHS-1 y/o VHS-2 (Figs. - 17, 18 y 19).

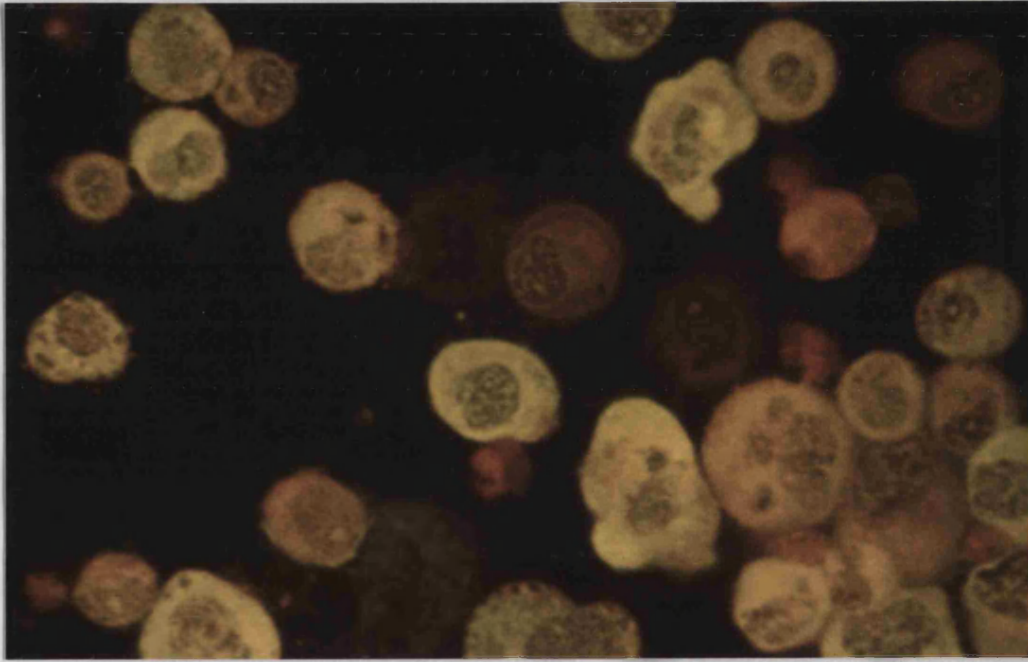


Fig. 17.- Cultivo de células Vero infectadas con VHS-1. Prueba de inmunofluorescencia indirecta efectuada con células tripsinizadas a las 16 horas postinoculación, fijadas con acetona y enfrentadas al anticuerpo monoclonal 23G10. Fluorescencia citoplásmica.

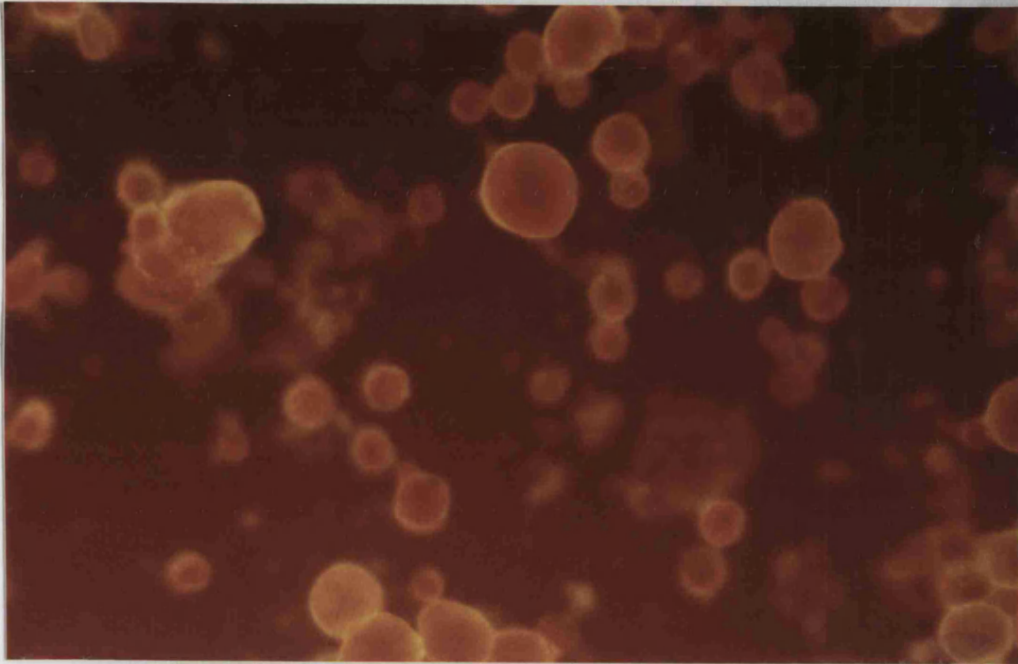


Fig. 18.- Cultivo de células Vero infectadas con VHS-2. Prueba de inmunofluorescencia indirecta efectuada con células tripsinizadas a las 16 horas postinoculación, fijadas con acetona y enfrentadas al anticuerpo monoclonal anti-VHS-2. Fluorescencia de membrana.

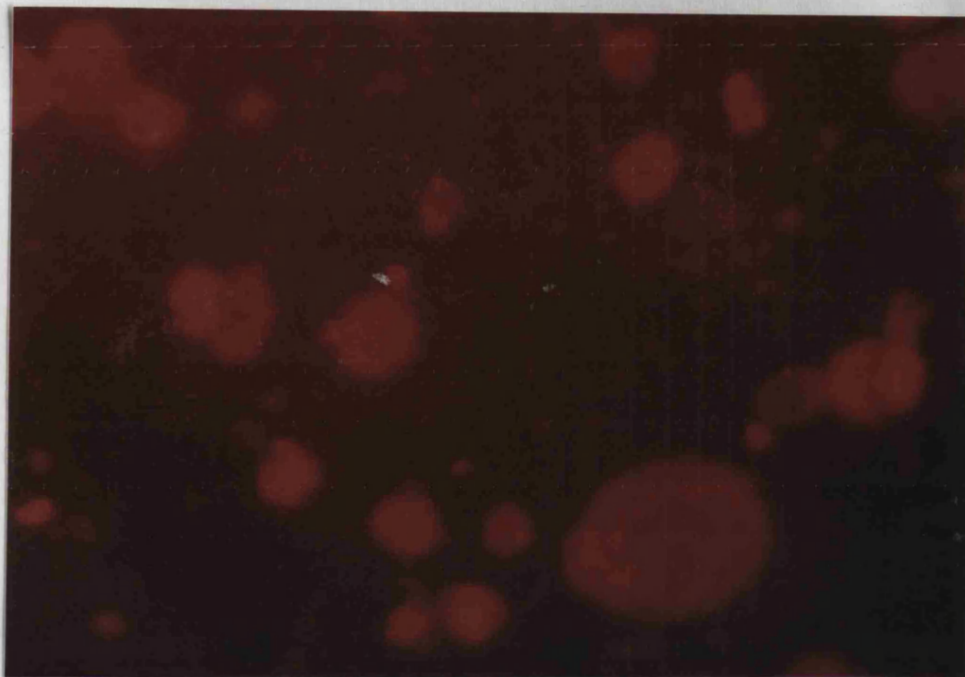


Fig. 19.- Cultivo de células Vero infectadas con VHS-1. Prueba de inmunofluorescencia negativa - efectuada con células tripsinizadas a las - 16 horas postinfección, fijadas con acetona y enfrentadas al anticuerpo monoclonal anti-VHS-2 (32D9).

4.5.- Propagación de los clones productores de anticuerpos específicos frente a VHS-1 y VHS-2

Los clones obtenidos tras el clonado por -- dilución límite de las células híbridas existentes en los pocillos cuyos sobrenadantes presentaban anticuerpos específicos frente a VHS-1 o VHS-2 detectados mediante ELISA o IFI fueron propagados para obtener mayores cantidades de sobrenadante.

La forma de propagación utilizada nos permitió obtener células productoras de anticuerpos monoclonales en número elevado, pudiendo disponer de la cantidad suficiente para poder efectuar los estudios requeridos (apartado 3.11).

El clon único procedente del clonado, fue transferido a un pocillo de una placa de 24 y de ahí a un frasco de 25 cm² (Nunc). A partir de ahí se realizaron pases del mismo modo que con la célula del mieloma Ag8 (apartado 3.3).

A partir de ahí, propagamos las células híbridas en frascos de vidrio "spinner vessel" en agitación continua situados en el interior de la estufa de anhídrido carbónico e inoculando 10.7 células/mililitro en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c inoculados siete días antes con pristane (Fig. 13 y 14).

La concentración proteica medida según se describió en el apartado 3.13.2. a partir de sobrenadante fue de 0.8 a 1 mg/ml.

Sin embargo, las concentraciones alcanzadas en líquido ascítico antes de purificar oscilaban entre 25 y 30 mg/ml.

4.6.- Caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos

4.6.1.- Especificidad del virus

Hemos obtenido un clon de células híbridas (23G10) productor de anticuerpos monoclonales específicos frente al virus Herpes simplex tipo 1 y otro clon (32D9) productor de anticuerpos monoclonales -- frente a virus Herpes simplex tipo 2.

La especificidad de estos anticuerpos monoclonales fué determinada mediante inmunofluorescencia indirecta con células infectadas con VHS-1 y VHS-2, - Citomegalovirus (CMV) y virus Varicella-Zoster (VVZ). Enfrentamos también dichos anticuerpos a células Vero sin infectar y a células P3HRK (expresan antígeno de cápside vírica -VCA- y células Raji) que expresan antígeno nuclear y antígenos precoces de virus Epstein-Barr.

Los resultados de dicha inmunofluorescencia mostraron especificidad frente a VHS-1 (clon 23G10) y a VHS-2 (clon 32D9) sin ninguna reacción cruzada con otros antígenos existentes en células infectadas por otros virus de la familia Herpesviridae.

La ausencia de fluorescencia al enfrentar el anticuerpo obtenido con las células Vero sin infectar permite confirmar su especificidad antigénica.

Esta especificidad de proteína fue posteriormente confirmada tras realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida para separar las proteínas - de VVZ, CMV y VEB y su posterior transferencia a una membrana de nitrocelulosa sobre la que fue efectuado un enzimoanálisis con los anticuerpos monoclonales obtenidos.

4.6.2.- Título

El título de las soluciones de dichos anticuerpos monoclonales fué determinando mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) considerándose como tal la dilución más elevada a la que se obtiene un resultado positivo.

Para ellos fueron realizadas diluciones seriadas del anticuerpo desde 1:2 hasta 1:1024.

El anticuerpo monoclonal específico frente a VHS-1 (23G10) posee un título de 1:128 y el anticuerpo monoclonal específico frente a VHS-2 (32D9) - un título de 1:64 en las condiciones obtenidas, a partir de medio de cultivo del clon, ajustándola a 5×10^5 células/ml en el pase y recogiendo dicho medio cuatro días después.

Estas diluciones tienen un valor relativo, indicando la dilución óptima de uso, que es de 1:64 y 1:32 respectivamente, para el sobrenadante sin purificar ni concentrar.

4.6.3.- Actividad específica

La actividad específica del anticuerpo expresada en unidades de actividad por miligramo de anticuerpo es de 12.800 unidades por miligramo para el anticuerpo específico frente a VHS-1 (23G10) y de 6.400 unidades/miligramo para el anticuerpo específico frente a VHS-2 (32D9).

4.6.4.- Estabilidad

La estabilidad de los anticuerpos obtenidos ha sido determinada sometiénolos a proceso de congelación-descongelación conociendo previamente su título inicial antes del proceso de congelación y tras su descongelación.

Comprobamos que tras cuatro procesos de congelación-descongelación el título sólo descendía en una dilución.

La conservación de los mismos a -70°C fraccionado en alícuotas no alteraba dicho título, comprobado a los 3, 5 y 7 meses de congelación.

Tampoco hemos observado una alteración en dicho título tras su liofilización.

4.6.5.- Clase y Subclase

La clase y subclase de las inmunoglobulinas fué determinada mediante inmunodifusión radial.

Los dos anticuerpos monoclonales pertenecen a la clase IgG y el producido por el clon 23G10 a la subclase IgG 2a y el producto por el clon 32D9 a la subclase IgG 2b.

4.6.6.- Especificidad de proteína

La identificación inmunoquímica de los antígenos detectados se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior inmunoblotting.

La realización de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y tinción con azul de Coomassie ha permitido analizar extractos proteicos obtenidos de células Vero infectadas con virus Herpes simplex tipo 1 y virus Herpes simplex tipo 2, tal como se explica en los apartados 3.10.1 (Fig. 20).

Al utilizar marcadores de peso molecular - (SDS-PAGE Low and High MW Standards, Bio Rad 161-0303 y 161-0304) pudimos conocer los pesos moleculares de las distintas bandas aparecidas en el gel con diferente movilidad electroforética.

Lógicamente, este análisis electroforético no nos permitió discernir entre proteínas celulares y proteínas de codificación vírica.

Con objeto de analizar la especificidad inmunológica de los anticuerpos monoclonales obtenidos, se procedió a transferir las proteínas separadas en gel a membrana de nitrocelulosa utilizando el método descrito por TOWBIN et al. (1976) (apartado 3.10.4), comprobándose la eficacia de la transferencia tiñendo con negro amido una porción de membrana de nitrocelulosa.

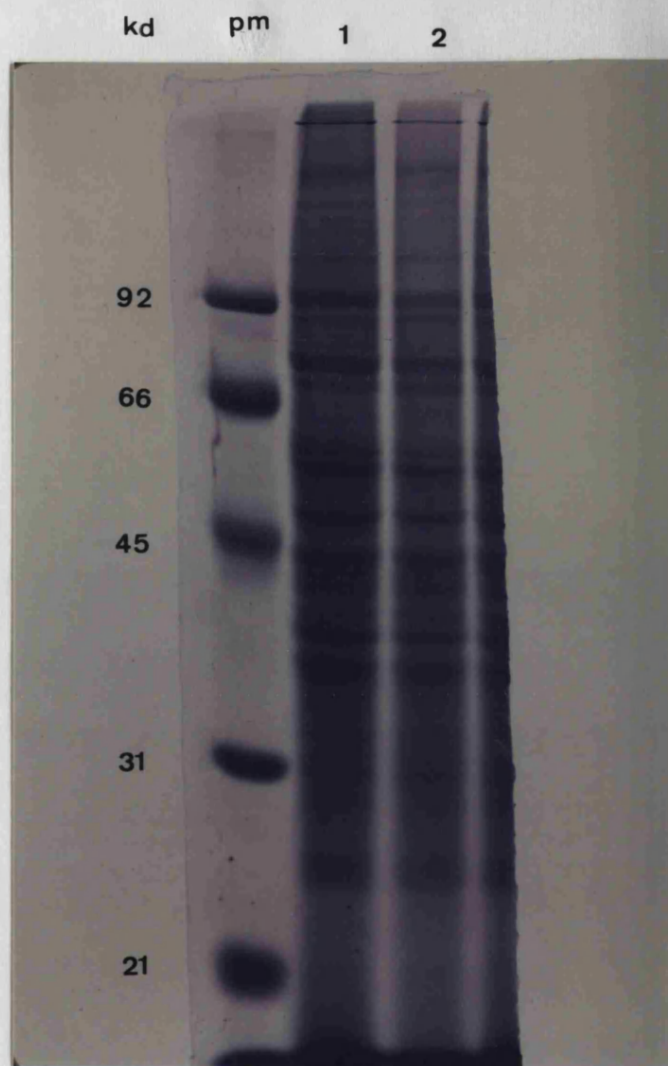


Fig. 20.- Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) de proteínas de membrana extraídas por el método de ARNIN et al. (1983) de células Vero infectadas con VHS-1 (1) y VHS-2 (2) y patrones de pesos moleculares, teñidas con azul de Coomassie.

Las proteínas inmovilizadas sobre la membrana de nitrocelulosa fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal estudiado utilizando sobrenadantes de los clones cuatro días después del pase habiéndolas ajustado a 5×10^5 células/mililitro.

La concentración proteica de estos sobrenadantes utilizados fué de 0.8 a 1 mg/ml.

El revelado de la reacción con un sistema peroxidasa-diaminobencidina mostró una banda detectada por el anticuerpo monoclonal 23G10, con p.m. de 35.000 daltons y una banda detectada por el anticuerpo monoclonal 23D9, con una movilidad electroforética correspondiente a 60.000 daltons (Fig. 21 y 22).

No apareció ninguna banda cuando las membranas de nitrocelulosa a las que se habían transferido las proteínas de células Vero, fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales, confirmando así que se trataba de una proteína de codificación vírica, como ya habíamos comprobado mediante inmunofluorescencia indirecta con células Vero sin infectar por VHS.

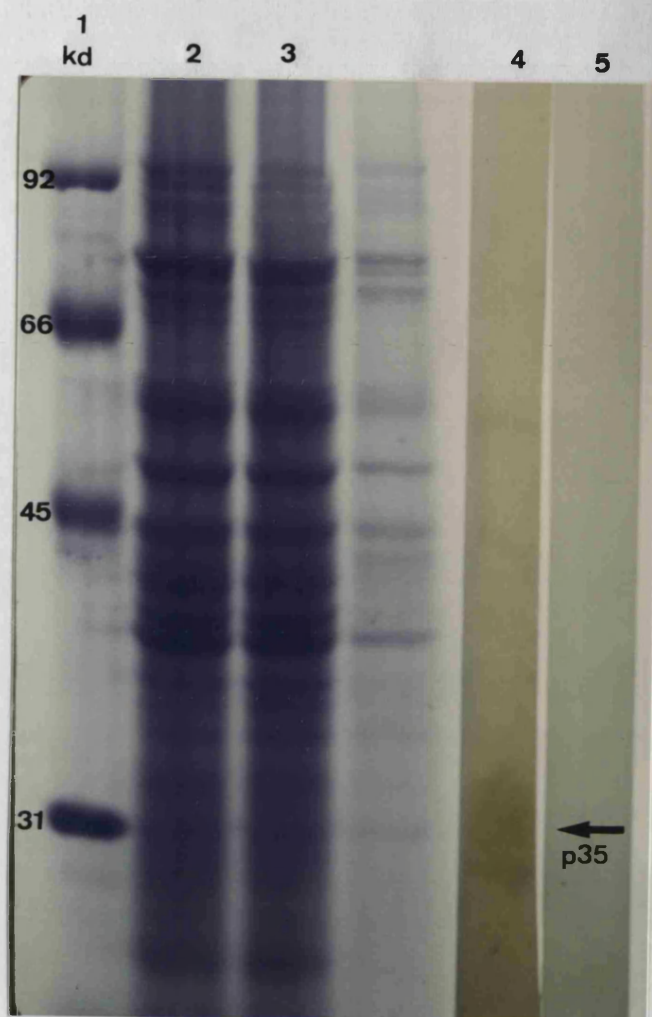


Fig. 21.- Gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico de proteínas extraídas de cultivos de células Vero infectadas con VHS-1 (2), VHS-2 (3) y patrón de pesos moleculares (1) teñidos con azul de Coomassie. Inmunotransferencia de las proteínas de VHS-1 (4) y VHS-2 (5) separadas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa y enfrentamiento al anticuerpo monoclonal frente a VHS-1 (23G10), con revelación con conjugado de peroxidasa anti-inmunoglobulina de ratón.

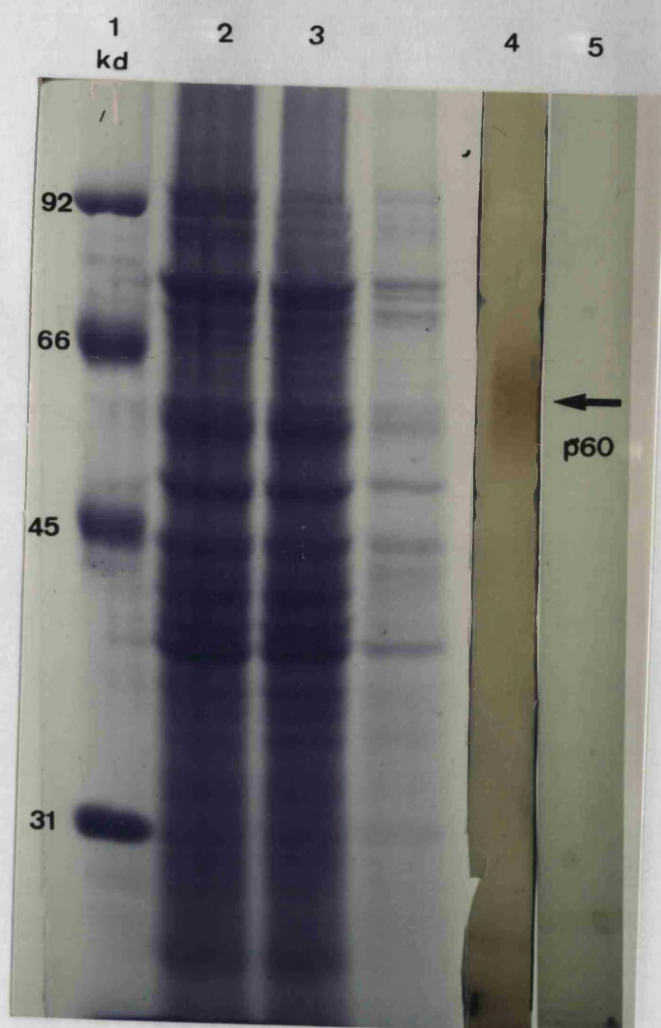


Fig. 22.- Gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico de proteínas extraídas de cultivos de células Vero infectadas con VHS-1 (2), VHS-2(3) y patrón de pesos moleculares (1) teñidos con azul de Coomassie. Inmunotransferencia de las proteínas de VHS-1 (4) y VHS-2 (5) separadas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa y enfrentamiento al anticuerpo monoclonal frente a VHS-2 (32D9), con revelación con conjugado de peroxidasa anti-inmunoglobulina de ratón.

4.7.- Identificación de las proteínas de 35.000 y -
60.000 daltons en cepas de aislamiento de pa-
cientes al enfrentarlas con sus sueros

Para comprobar que las proteínas de VHS-1 y VHS-2 que son identificadas por los anticuerpos monoclonales producidos por los clones de híbridos 23G10 y 32D9, son proteínas que estimulan la respuesta inmunitaria humana, replicamos 10 cepas (cinco identificadas como VHS-1 y cinco como VHS-2) en células Vero, - aisladas de pacientes con lesiones herpéticas.

A partir de las mismas fue preparado el antígeno en la forma indicada en el apartado 3.10.1, - procediéndose a migrar en el gel de poliacrilamida y transferirlo a papel de nitrocelulosa, tal y como hemos descrito en el apartado 3.10.4.

La membrana de nitrocelulosa fue cortada en pequeñas tiras correspondiendo cada una de ellas a - una cepa vírica.

Estas tiras fueron incubadas con el suero - del propio paciente que presentaba la lesión herpética. El suero se obtuvo en el momento en el que al paciente le fue tomada la muestra a partir de la - - lesión, 15 ó 20 días después. Las lesiones herpéticas de estos sujetos eran recurrentes.

Cada cepa fue enfrentada, tanto con el suero obtenido en el momento agudo, como con los sueros obtenidos 15 y 30 días después de la toma de la muestra.

Como control de cada una de estas reacciones inmunoenzimáticas incubamos cada uno de los sueros con membranas de nitrocelulosa a las que habíamos transferido proteínas procedentes de extractos de células Vero.

La realización de este método inmunoenzimático (apartado 3.10.5.2), sobre membrana de nitrocelulosa con proteínas de extractos de células infectadas con la cepa y el suero del mismo sujeto, permitió observar un gran número de bandas, correspondiéndose - con las situadas en el gel de poliacrilamida tras tinción con azul de Coomassie.

Conociendo el peso molecular de las bandas que detectan los anticuerpos monoclonales 23D10 y 32D9, que corresponde a 35.000 daltons y 60.000 daltons respectivamente, se reconoció en todas las membranas de nitrocelulosa la existencia de una banda correspondiente a una proteína transferida, cuya movilidad electroforética correspondía con los pesos moleculares de las proteínas identificadas por los anticuerpos monoclonales 23G10 y 32D9 (Fig. 23).

No aparecieron dichas bandas en las membranas de nitrocelulosa a las que se habían transferido proteínas procedentes de extractos de las células Vero sin infectar.

4.8.- Caracterización química de las proteínas de 35.000 y 60.000 daltons

Tal y como expusimos en el apartado 3.10.3, realizamos una tinción de PAS (Periodic acid-Schiff) que tiñe de forma selectiva las glicoproteínas existentes en el gel.

Este método (BEELEY, 1985) obvia la utilización de isotopos radiactivos para incorporar en las glicoproteínas glucosamina o galactosamina marcadas con 14-C.

La tinción del gel de poliacrilamida en el que habían migrado los extractos de células Vero infectadas por VHS-1 y VHS-2, permitió identificar una banda con una movilidad electroforética correspondiente a 60.000 daltons de peso molecular, tanto para VHS-1 como para VHS-2, que corresponde a la proteína detectada por el anticuerpo monoclonal específico de VHS-2.

No apareció sin embargo la banda correspondiente a un peso molecular de 35.000, correspondiente a la proteína detectada por el anticuerpo monoclonal 23G10, específico de VHS-1.

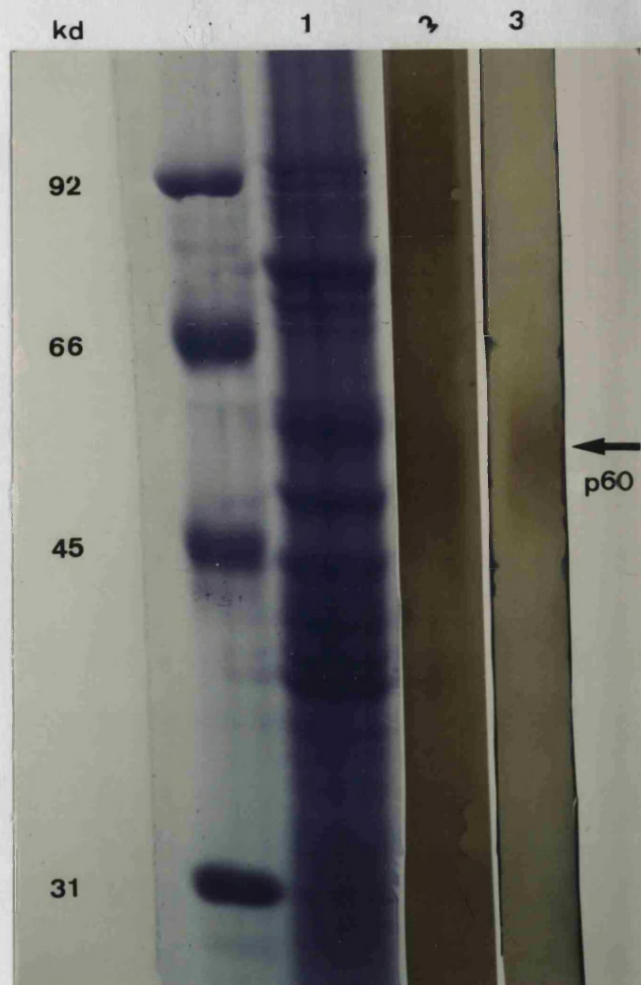


Fig. 23.- Gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico de cepa de VHS-2 aislada en nuestro laboratorio, teñido con azul de Coomassie(1) y transferencia a membrana de nitrocelulosa para efectuar enzimoimmunoanálisis con el propio suero del paciente del que se aisló la cepa(2) y con el anticuerpo monoclonal 32D9 específico de VHS-2 (3). Patron de pesos moleculares (pm).

4.9.- Aparición postinoculación de proteínas identificadas

Los anticuerpos monoclonales obtenidos detectan las proteínas específicas frente a las que reaccionan a las 20 horas post-inoculación de 100 TCID 50 de VHS, aún antes de aparecer el efecto citopático.

La detección fue realizada mediante inmunofluorescencia con las cepas utilizadas para la inmunización de ratones.

Las proteínas que reconocen los anticuerpos monoclonales 23G10 y 32D9 mediante inmunofluorescencia indirecta aparecen a las 20 horas postinoculación tanto para VHS-1 (clon 23G10) como para VHS-2 (clon 32D9), aún sin aparición del efecto citopático visible.

Posteriormente, se realizó también esta detección de proteínas, según las horas postinoculación pero con las cepas procedentes de los aislamientos víricos, detectándose también a las 20 horas postinoculación.

4.10.- Tipado de aislamientos víricos

Hemos utilizado los anticuerpos monoclonales obtenidos frente a virus **Herpes simplex 1** y **2** para tipar aislamientos víricos, utilizando inmunofluorescencia directa sobre células infectadas con dichos virus.

Se han obtenido cincuenta aislamientos de virus **Herpes simplex** a partir de 65 muestras de otros tantos pacientes. De estos 65 pacientes 50 padecían un herpes orofacial y 15 herpes genital.

La toma de muestras se realizó a partir de las lesiones herpéticas (vesícula, úlcera) con escobillón de alginato tras rotura de la vesícula con aguja, recogiendo el líquido contenido en su interior ó frotando la base de la úlcera.

Trás su obtención fue introducido en medio de transporte (Minimum Essential Medium), con 1% de suero bovino fetal y 1% de penicilina-estreptomina (10.000 UI), e inoculado en una monocapa de células Vero.

De las 65 muestras inoculadas obtuvimos 50 aislamientos víricos en células Vero.

De las muestras de localización orofacial de un 70% se aisló virus, apareciendo en un 50% focos de efecto citopático a las 24 horas, en un 16% a las 48 horas y en un 4% a las 72 horas postinoculación.

En un 66.6 por cien de las muestras de localización genital se aisló virus **Herpes simplex**. Un 40 por cien a las 24 horas y un 20 por cien a las 48 horas postinoculación y un 6.6 por cien a las 72 horas postinoculación (tabla 3).

De los 35 aislamientos de VHS a partir de las lesiones orofaciales en el 100 por cien de los mismos fué tipado como VHS-1. No aislamos ningún VHS-2 a partir de dichas lesiones.

De los 10 aislamientos de VHS a partir de las lesiones genitales, todos (100 por cien) fueron tipados como VHS-2 y ninguno como VHS-1 (tabla 4) -

Tabla 3.- Aislamiento de Herpes simplex en muestras clínicas.

Horas	Localización orofacial (N = 50)		Localización genital (N = 15)	
	Nº	%	Nº	%
24	25	50	6	40
48	8	16	3	20
72	2	4	1	6.6
Total de aislamientos	35	70	10	66.6

Tabla 4.- Tipos de Herpes simplex aislado de lesiones orofaciales y genitales.

Tipos de VHS	Aislamientos a partir de lesiones orofaciales (N = 35)		Aislamientos a partir de lesiones genitales (N = 10)	
	Nº	%	Nº	%
VHS-1	35	100	0	0
VHS-2	0	0	10	100

La forma de tipar los aislamientos fue -- tripsinizando la monocapa de células Vero infectadas cuando el efecto citopático alteraba a un 60 a 70% de las células, depositándolas después de realizar tres lavados en tampón fosfato salino (PBS) en un portaobjetos de inmunofluorescencia.

Se realizó posteriormente sobre dichos portaobjetos una IFI (apartado 3.7.2), comprobando así - la validez de los anticuerpos monoclonales obtenidos (23G10 y 32D9).

Otro modo de proceder al tipado de las -- cepas de VHS aislada a partir de lesiones de los pacientes, fue depositando una suspensión celular a -- razón de 1×10^5 células/mililitro pero en tubos --- (Sterilin) en los que había colocado previamente un cubreobjetos redondo de 12 x 12 mm.

Cuando la monocapa estaba formada, se procedió a inocular las muestras procedentes de las lesiones clínicas por adsorción.

Cuando el efecto citopático fué de un 60 a 80% se retiró el medio de crecimiento, lavándose la monocapa con PBS y fijándose con acetona fría a +4°C durante 10 minutos.

La IFI se realizó en dichos tubos, procediéndose a la lectura de los mismos, colocándo los -- cubreobjetos donde se encontraban la monocapa celular con esta hacia abajo sobre un portaobjetos en el que se había depositado una gota de glicerina tamponada - pH 8.9.

La lectura se realizó en un microscopio de epifluorescencia (Leitz) con objetivo de 40 X.

4.11.- Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales 23G10 y 32D9 sobre frotis procedente de lesiones herpéticas.

A diez pacientes además de tomarles muestras para cultivo en células Vero, se procedió a realizar una toma de muestras con un escobillón de alginato, frotando en la base de la lesión y depositándola después en cuatro pocillos de un portaobjetos de inmunofluorescencia.

En cada uno de los pocillos fue realizado un frotis con un escobillón de alginato.

Las muestras pertenecían a 9 pacientes con lesiones herpéticas recurrentes y una primoinfección. La localización fue orofacial en 9 casos, y de herpes genital en un caso.

Siete muestras se tomaron en el estadio de vesícula tras rotura de la misma, frotando en la base de la lesión y tres de las muestras fueron tomadas en el estadio de úlcera.

A partir de los portaobjetos con la frotis se realizó una inmunofluorescencia indirecta tal como se describe en el apartado 3.7.2.

La observación de las mismas en microscopio de epifluorescencia (Leitz) permitió identificar las células epiteliales fluorescentes en cuatro de los casos, tres procedentes de frotis vesicular y uno de úlcera (Fig. 24 y 25).

Las cuatro fluorescencias positivas pertenecían a lesiones de localización orofacial y fueron identificadas como VHS-1 en la inmunofluorescencia indirecta, con anticuerpos monoclonales 23G10 y 32D9.

Dos de las inmunofluorescencias no pudieron ser interpretadas, debido a la existencia de precipitados de fluorocromo.

En los diez casos el cultivo fué positivo, pudiéndose aislar virus a partir de las lesiones.

Estos virus replicados en células Vero, fueron tipificados posteriormente, identificándose los cuatro casos ya diagnosticados por inmunofluorescencia indirecta sobre las muestras procedentes de la lesión como VHS-1, corroborando así los hallazgos anteriores.

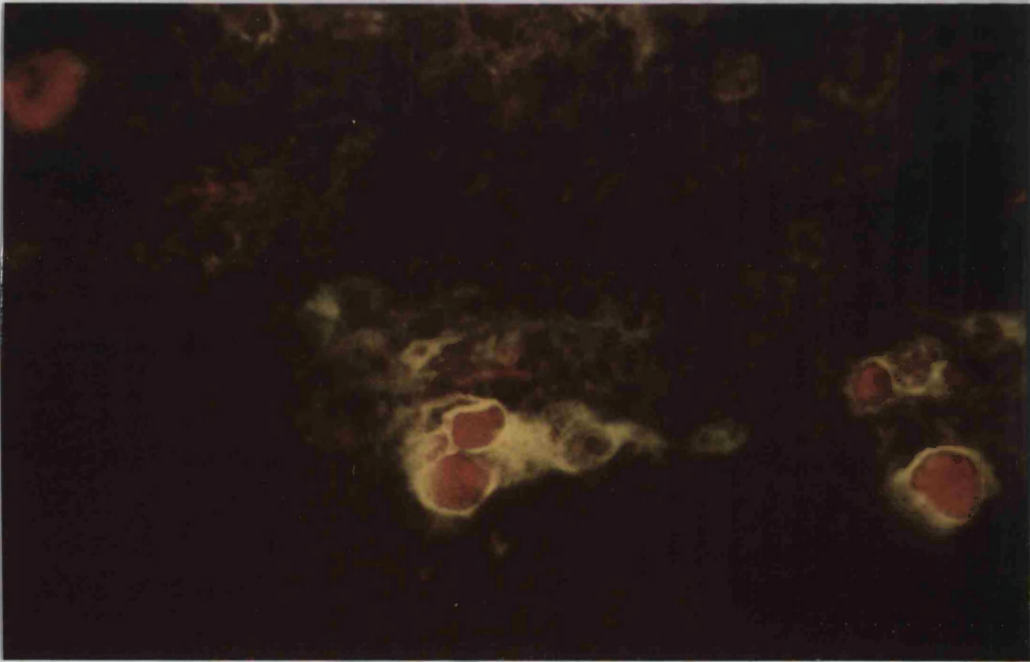


Fig 24,25.- Inmunofluorescencia directa sobre frotis de lesiones herpéticas. Obsérvense las células fluorescentes (25x).

4.12.- Capacidad neutralizante de los anticuerpos monoclonales (23G10 y 32D9)

Los anticuerpos monoclonales obtenidos -- (23G10 y 32D9) frente a VHS-1 y VHS-2 respectivamente fueron enfrentados con 100 TCID50 de una suspensión vírica de VHS-1 y VHS-2. Cada anticuerpo monoclonal se enfrentó tanto con una suspensión vírica de VHS-1, como con VHS-2 (apartado 3.13.7).

La lectura se realizó en microscopio invertido, observándose la aparición de focos de efecto -- citopático en todos los pocillos, tanto en los que se había enfrentado el anticuerpo monoclonal específico de VHS-1 (23G10) con el propio virus VHS-1, como en los pocillos donde se depositó VHS-2 y el anticuerpo monoclonal específico de una proteína de 60.000 daltons.

Ninguno de los dos anticuerpos monoclonales impedía la aparición de focos de efecto citopático -- vírico, a distintas concentraciones del mismo, de lo que se deduce que no presentan capacidad neutralizante de VHS.

4.13.- Estudio de la monoclonalidad de los anticuerpos 23G10 y 32D9

La monoclonalidad de un anticuerpo viene -- definida por la existencia de una molécula de inmunoglobulina que no produce un clon de células híbridas productoras de anticuerpos específicos frente a un -- determinante antigénico y originado dicho clon a partir de una sola célula.

La monoclonalidad de los anticuerpos mono-- clonales obtenidos fue comprobada caracterizando el -- isotipo de la inmunoglobulina a la que pertenece el -- anticuerpo monoclonal es decir enfrentando dicha inmu-- noglobulina a los distintos clones y subclases de in-- munoglobulinas y comprobando que en el sobrenadante -- del clon único tras el clonado sólo aparecía un arco de precipitado con una única subclase de inmunoglobulina IgG 2a para el anticuerpo monoclonal específico -- frente VHS-1 e IgG 2b para el anticuerpo específico -- frente a VHS-2 (Fig. 26).

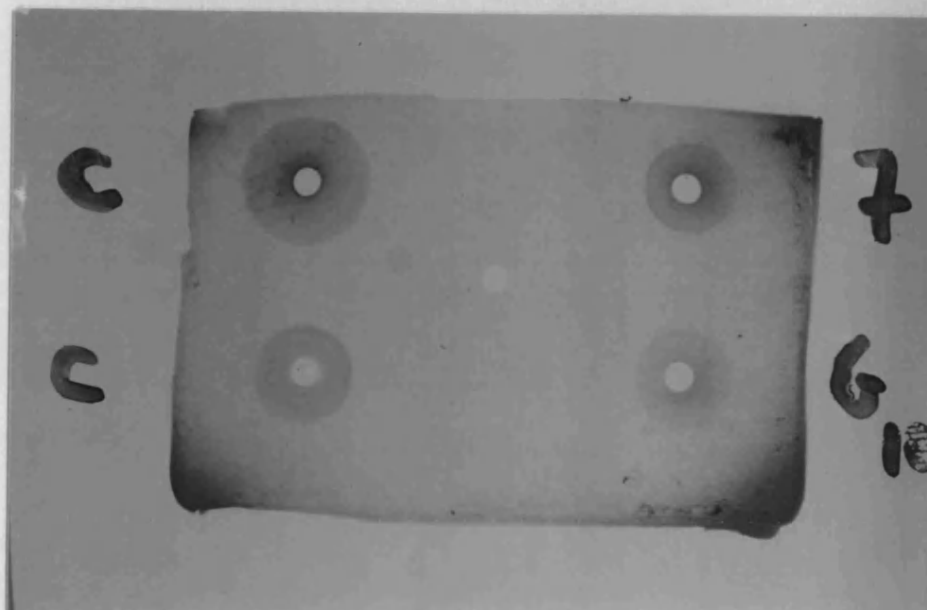
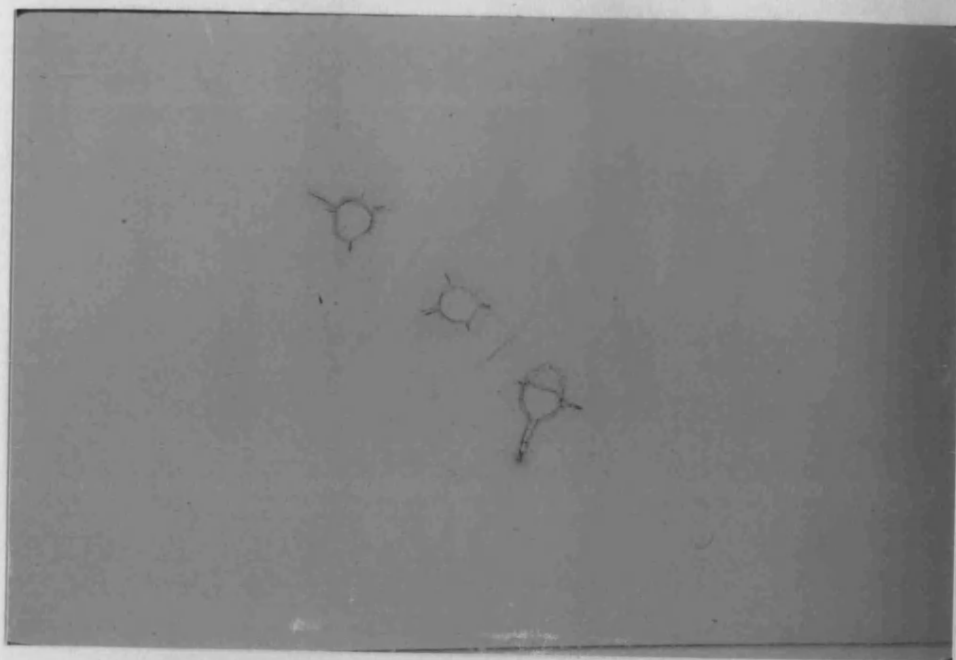


Fig. 26.A.- Estudio de monoclonalidad por inmunodifusión doble bidimensional (Ouchterlony). - Anticuerpo monoclonal 23G10 en el pocillo central. Observéense las bandas de inmunoprecipitación al enfrentarse con la anti-IgG y anti-IgG2a y la ausencia de bandas de inmunoprecipitación al enfrentarse con IgG1, IgG2b e IgG3.

B.- Inmunodifusión radial al dispensar el anticuerpo monoclonal 23G10 en placas de gel de agarosa conteniendo anti-IgG2a.

El clonado por dilución límite, permitió el aislamiento de una sola célula híbrida tras seleccionar en medio HAT en un pocillo de 200 microlitros de capacidad (Nunc).

La propagación de este clon, permitió obtener el anticuerpo monoclonal en cantidades elevadas.

4.14.- Purificación de los sobrenadantes y líquido ascítico de ratón Balb/c

La concentración de proteínas fue determinada según el método descrito por BRADFORD en el líquido ascítico y en el sobrenadante de los clones, cultivados *in vitro*, obteniéndose de 8 a 15 mg/ml en el primero, y de 0.8 a 1.2 mg/ml en el segundo.

Tanto el líquido ascítico como el sobrenadante de los clones cultivados *in vitro* fueron precipitados con sulfato amónico según el método descrito en el apartado 3.12.1.

Partiendo de 1 ml de líquido ascítico y de 10 ml de sobrenadante de los clones el precipitado fue resuspendido en 0.5 ml de tampón fosfato salino pH 7.4. El rendimiento obtenido en este paso de purificación fue de un 75%.

Los 0.5 ml resultantes fueron filtrados a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada con tampón fosfato salino pH 7.4, recogiendo fracciones de 250 microlitros.

Las fracciones correspondientes al pico de absorbancia a 280 nm fueron recogidas y liofilizadas en un único vial.

El líofo fue rehidratado en un volumen mínimo de 200 microlitros para conseguir una concentración proteica de 10 mg/ml.

Posteriormente procedimos a realizar una purificación de las inmunoglobulinas IgG, pasando la solución con los anticuerpos monoclonales por una columna de proteína A - Sepharosa siguiendo la técnica descrita en el apartado 3.12.2.2 y recogiendo fracciones de 200 microlitros.

Las fracciones correspondientes a las inmunoglobulinas IgG fueron colocadas en un vial y liofilizadas para su mejor conservación.

Con los anticuerpos monoclonales purificados se procedió a realizar un marcado con fluoresceína según el método descrito en el apartado 3.14.

4.15.- Tipado de los aislamientos víricos con los anticuerpos monoclonales obtenidos marcados con FITC.

La purificación de los anticuerpos monoclonales, mediante precipitación con sulfato amónico, -- cromatografía de Sephadex-G25 y paso posteriormente -- por columna conteniendo proteína A unida a Sepharosa CL4B, permitió su posterior marcado con isotiocianato de fluorescencia (FITC), según el protocolo descrito en el apartado 3.12.3.

Los anticuerpos monoclonales marcados (23G10 y 23D9) fueron utilizados para detectar las proteínas específicas p35 y gp60 en células Vero infectadas con las cepas procedentes de los aislamientos a partir de lesiones herpéticas, mediante inmunofluorescencia directa.

Este método, es rápido y sencillo, permite realizar la inmunofluorescencia para tipar aislamientos en una hora.

También fueron probados los anticuerpos monoclonales marcados con FITC en el diagnóstico rápido a partir de frotis de las lesiones herpéticas, pudiéndose diagnosticar y tipar simultáneamente solo tres de los 10 casos los que se había tomado muestra de la lesión y de la que había sido realizado frotis.

5.- DISCUSSION

Hemos obtenido un clon de híbridoma (23G10) productor de anticuerpos monoclonales frente a VHS-1, y otro (32D9) productor de anticuerpos monoclonales frente a VHS-2.

La obtención de estos anticuerpos monoclonales, fué precedida del desarrollo de una metodología de obtención de dichos anticuerpos monoclonales.

Para ello, intentamos seguir protocolos conocidos (GALFRE y MILSTEIN, 1981) adaptandolos a nuevas condiciones y comparando las distintas variables que pudieran modificar los resultados obtenidos.

Una vez logrado el protocolo de trabajo, -- realizamos una serie de experiencias que nos permitieron obtener los anticuerpos monoclonales deseados tipos específicos de VHS-1 y de VHS-2 con la mayor eficacia posible.

5.1.- Inmunización de los animales

Algunos estudios han comprobado de forma sistemática y modificado cada uno de los parámetros respectivamente de la metodología de inmunización, probablemente debido a que la respuesta inmunitaria es impredecible incluso en animales idénticos inmunizados con el mismo antígeno (WESTERWOUTD, 1985).

Esto dificulta comparar los resultados obtenidos con diferentes antígenos e incluso con antígenos idénticos.

Nosotros hemos utilizado un protocolo de obtención de un antígeno soluble similar al utilizado por PEREIRA (1982). Este investigador somete las células Vero infectadas con VHS-1 y/o VHS-2 a tres ciclos de sonicación.

En nuestro estudio hemos sustituido estos ciclos de sonicación, por tres ciclos de congelación-descongelación a -70°C , con buenos resultados.

Respecto a la pauta de inmunización existen muchos esquemas (DAMJANOU y KOWLES, 1983).

Sin embargo el esquema seguido por nosotros proporciona muy buenos resultados con un 100% de inmunización a las cuatro semanas.

FRENCH et al. (1986) siguen nuestro protocolo aunque con antígenos diferentes. Estos autores administran entre 50 a 100 microgramos de antígeno soluble en adyuvante completo de Freund por vía intraperitoneal durante cuatro semanas, sangrando al animal entonces para determinar la calidad y cantidad de los anticuerpos generados.

Estos autores esperan hasta que el título de anticuerpos alcanzado en la determinación haya descendido respecto a la anterior, procediendo entonces a reinocular con 100 microgramos del antígeno por vía intravenosa, efectuando la fusión tres días después.

En nuestro protocolo tras las cuatro semanas de inmunización y haber comprobado la existencia de anticuerpos en el suero de los ratones inoculados con VHS-1 o VHS-2, procedimos a utilizar dichos ratones para realizar las fusiones sin esperar a la caída en el título que señalan FRENCH et al. (1986).

Aunque estos autores prefieran fusionar animales con título elevado de anticuerpos frente al antígeno deseado y dejar los animales inmunizados hasta la caída del título, no han comprobado experimentalmente el beneficio de esta hipótesis.

Es posible, sin embargo, que la reinoculación por vía intravenosa con 100 microgramos de antígeno soluble, cuando ha descendido el título de anticuerpos, provoque una estimulación linfocitaria mayor y por lo tanto con mayor número de células blásticas.

En este sentido es conocido que el número de células blásticas determina la frecuencia de obtención de las células híbridas (STAHLI et al, 1980), comprobándose que se obtienen muy pocos híbridos cuando la fusión se realiza cuatro o cinco días después de la inoculación.

De ahí, que las fusiones se lleven a cabo al tercer día postinoculación (FRENCH et al, 1986).

En nuestro estudio todas las fusiones fueron realizadas tres días después de la reinoculación.

Una de las características más importantes de la metodología de obtención anticuerpos monoclonales, es la posibilidad de obtener reactivos específicos que reconozcan un determinante antigénico, partiendo de una mezcla antigénica.

Sin embargo, en la mayoría de los casos es recomendable utilizar un tipo de antígeno que permita obtener un número elevado de linfocitos productores de anticuerpos frente a un antígeno deseado (CAMPBELL 1986).

De ahí el interés de los resultados obtenidos tras inmunizar con el antígeno celular. Los ratones presentaban en un elevado porcentaje (80%) anticuerpos frente a los antígenos de las células Vero utilizadas para replicar el virus, debido a que la inmunización se realizó con células Vero integra infectadas con VHS-1 o VHS-2.

Sin embargo, cuando utilizamos sobrenadantes procedentes de la congelación/descongelación de las células infectadas por lo tanto partículas víricas en suspensión con pequeños restos de membranas de las células Vero infectadas, ninguno de los ratones inoculados presentó anticuerpos frente a la célula Vero sin inocular.

Todos los clones que obtuvimos fueron enfrentados no sólo con las células Vero infectadas por VHS-1 o VHS-2, sino también con células Vero sin inocular con virus VHS-1 o VHS-2 como control.

Ninguno de los clones obtenidos, producían anticuerpos frente a los antígenos existentes en las células Vero, comprobado tanto mediante inmunofluorescencia indirecta, como por Western-blot.

Debido a la elevada mortalidad que presentan nuestros ratones inoculados, inactivamos el virus antes de inocularlo mediante calor.

HOLLAND et al (1983) inocularon ratones Balb/c con 10.8 UFP de la cepa de VHS-1 (KOS321) inactivando el virus mediante exposición de luz ultravioleta durante 20 minutos a una distancia de 10 centímetros.

La vía de inoculación utilizada fué la intraperitoneal. Un 75% de los ratones inoculados por vía intraperitoneal presentaban anticuerpos frente a VHS-1 o VHS-2 y solo un 60% cuando la inoculación se realizó por vía subcutánea.

PEREIRA et al. (1982) utilizaron para inmunizar ratones frente a VHS-1 o VHS-2, la inoculación en la almohadilla plantar.

Este tipo de inoculación la consideramos - más difícil técnicamente que los otros tipos de inoculación.

La vía intravenosa no es utilizada por ninguno de los grupos que trabajan en la obtención de -- anticuerpos monoclonales frente a VHS, debido a su relativa dificultad.

5.2.- Fusión celular

Las primeras experiencias en fusión celular fueron realizadas con virus cubiertos (virus Sendai) (HARRIS y WATKINS, 1965).

Actualmente se utiliza como agente fusógeno polietilenglicol (PEG). Nosotros, valorando los resultados obtenidos hemos utilizado PEG-1.500 a una concentración del 50% en medio RPMI-1640 sin suero.

DAVIDSON et al. (1976) realizaron estudios en los que observaban los porcentajes de fusión con - polietilenglicol de distinto peso molecular, comprobando que los polietilenglicoles de pesos moleculares entre 600 y 6.000, fueron los que mayor número de células híbridas proporcionaron.

FAZERAS de St. GROTH y SCHEIDEGGER (1980) - después de realizar fusiones con PEG de distintos pesos moleculares, observaron que el PEG que en sus condiciones de trabajo les había aportado mayor número - de clones fue el PEG 4000 GK (Merk).

HOLLAND et al. (1983) obtienen anticuerpos monoclonales frente a VHS utilizando PEG 6000.

GALFRE y MILSTEIN (1982) en un artículo sobre preparación de anticuerpos monoclonales, recomiendan el uso de PEG-1500, confirmando nuestros resultados y HOLLAND et al. (1983) obtienen anticuerpos monoclonales frente a VHS-1 utilizando también PEG-1500.

NORWOOD et al (1976) informaron de la mejora considerable obtenida en las fusiones celulares - cuando disolvían el PEG en un 15% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Estos autores fusionaron fibroblastos adheridos a una superficie y no células en suspensión.

FAZEKAS de St. GROTH y SCHEIDEGGER (1980) - utilizaron DMSO en sus fusiones pero con células en suspensión, llegando a la conclusión de que la adición de DMSO no era necesaria, pues cuando las condiciones de fusión son óptimas no mejora el porcentaje de híbridos obtenidos.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por nosotros, en los que el DMSO no mejoraba los éxitos de fusión.

El mecanismo exacto de fusión no es conocido. Sin embargo, la principal función del PEG (sustancia hidrofílica) es atraer el agua libre permitiendo la aglutinación celular y la puesta en contacto de las membranas celulares.

Este fenómeno ocurre cuando las concentraciones de PEG oscilan entre un 40 y un 50 por cien (CAMPBELL, 1986).

Obtuvimos los mejores resultados postfusión cuando utilizamos PEG a una concentración del 50%.

Sin embargo, existen variaciones en la concentración óptima de PEG para las fusiones, dependiendo de la línea celular y de sus condiciones de mantenimiento, habiendo obtenido fusiones con éxito utilizando PEG al 35%.

5.3.- Distribución de las células postfusión

Los resultados obtenidos tras la distribución de las células postfusión en las placas de 24 y 96 pocillos, han sido corroborados por CAMPBELL (1986), quien también recomendó usar placas de 96 pocillos, no sólo para la clonación, sino también para la distribución postfusión.

El uso de este tipo de placas no mejora la frecuencia de fusión, es decir no es un parámetro favorecedor de la misma, sino que permite un rápido reconocimiento de los clones productores de anticuerpos específicos deseados y evita el sobrecrecimiento de aquellos clones que no interesan.

5.4.- Detección de la producción de anticuerpos monoclonales específicos

La necesidad de un método rápido de selección que permitiera una rápida identificación de los clones productores de anticuerpos específicos, nos movió a normalizar y poner a punto métodos de elección, que se complementasen entre ellos.

Los tres métodos de selección ensayados fueron el ELISA utilizando un antígeno vírico, ELISA para detectar inmunoglobulinas de ratón y la inmunofluorescencia indirecta (IFI).

El método de ELISA con antígeno vírico, --- permitió identificar rápidamente los clones productores de anticuerpos específicos.

Sin embargo, por utilizar un antígeno vírico no purificado constituido por un lisado de células infectadas, los resultados falsos positivos encontrados fueron muy elevados con respecto a otros métodos como la inmunofluorescencia indirecta y el Western-blot (53%).

El desarrollo del método de ELISA para detectar inmunoglobulinas de ratón permitió utilizarlo como método de selección, para posteriormente enfrentar aquellos sobrenadantes de clones productores de inmunoglobulinas de ratón, con células Vero infectadas por VHS-1 o VHS-2 mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI).

El método de ELISA para selección de clones productores de inmunoglobulinas tal y como lo hemos normalizado nosotros no ha podido ser referenciado en la literatura.

La utilización de este método de ELISA esta restringida al uso de células de mieloma no-productoras de inmunoglobulinas, como en nuestro caso, que utilizamos células Ag8.

Distintos autores (EISENBERG et al. 1982; VAUGHAN et al. 1985) utilizan el método de ELISA como técnica de selección de los clones productos de anticuerpos monoclonales.

Sin embargo, casi todos utilizan como antígeno proteínas ó viriones purificados, no obteniendo por ello resultados falsos positivos.

PEREIRA (1982) utiliza el método de inmunofluorescencia indirecta utilizando como antígeno de células Vero ó Hep-2 infectadas con VHS, ya sea tipo 1 ó tipo 2.

La inmunofluorescencia indirecta también es utilizada para seleccionar sus clones, y además para comprobar la distribución de las DBP (DNA binding -- proteins) y proteínas asociadas al ADN en la célula infectada dependiendo del tiempo postinoculación, definiendo así modelos ó patrones de fluorescencia.

5.5.- Identificación inmunoquímica de las proteínas - p35 y gp60 detectada por los anticuerpos monoclonales 23G10 y 32D9

La identificación inmunoquímica del antígeno frente al que reaccionan los anticuerpos monoclonales obtenidos fue realizada mediante Western-blot.

Las proteínas de VHS fueron separadas electroforéticamente en gel de poliacrilamida y transferida a una membrana de nitrocelulosa para posteriormente realizar una reacción inmunoenzimática utilizando los anticuerpos monoclonales obtenidos.

El anticuerpo monoclonal específico de VHS-1 (23G10) reacciona con una proteína de VHS-1 que tiene una movilidad electroforética que corresponde a 35.000 daltons.

Esta proteína no fue identificada como una glicoproteína por la tinción del gel de poliacrilamida con PAS (Periodic - Acid Schiff).

BRAUN et al. (1983) obtuvieron un anticuerpo monoclonal (H443) frente a cuatro antígenos de 39.000 a 46.500 daltons de peso molecular.

Estos polipéptidos reaccionaban con el anticuerpo monoclonal H443 y estaban codificados en una región del genoma que HAYWARD et al. (1975) habían descrito como zona en la que se codifica la proteína ICP35,37, y que se encuentran entre las unidades máxicas 0.32 y 0.36.

De las cuatro bandas que reaccionan con el anticuerpo monoclonal H443 la inferior comigra con ICP35, la segunda migra más rápidamente (ICP36) y las otras dos obtenidas solo en autorradiografía, a partir de los lisados de células, cuando estos fueron marcados durante mucho tiempo comigran con la denominada ICP37.

Este anticuerpo monoclonal H443 solo reacciona con estos polipéptidos pertenecientes al VHS-1.

El anticuerpo monoclonal (32G10) obtenido por nosotros que reconoce solo una banda de 35.000 daltons de peso molecular, también es específico de VHS-1.

Los polipéptidos 35.000 y 36.000 daltons se acumulan en el citoplasma, mientras que las dos bandas que corresponden a los polipéptidos de mayor peso molecular, que comigran con ICP37, se acumula en el núcleo.

Una explicación de estos resultados es que la ICP35 es un polipéptido precursor procesado rápidamente a los polipéptidos que migran más lentamente que ICP36 y que estas dos bandas son procesadas a polipéptidos, formando las otras bandas citoplásmicas y nucleares.

El anticuerpo monoclonal 32G10 solo reacciona con una banda que corresponde a 35.000 daltons de peso molecular y no en estas otras de 37.000 daltons.

Sin embargo, como señala BRAUN et al.(1983) estos dos polipéptidos solo aparecen en autorradiografía por ser un método más sensible que el Western-blot utilizado por nosotros y cuando las células se habían incubado durante muchas horas postinoculación aunque no especifican cuanto.

Nosotros utilizamos Western-blot como método de investigación inmunoquímica, que es menos sensible que la autorradiografía y las células fueron recogidas a las 16 horas postinoculación, por lo que pensamos que son estos los motivos por los que el anticuerpo monoclonal 23G10, específico de VHS-1 al igual que el H433, no reconoce en nuestras condiciones estas bandas proteicas. La inmunofluorescencia indirecta obtenida con el anticuerpo monoclonal 23G10 muestra un patrón de fluorescencia citoplásmico en célula Vero infectadas con VHS-1.

En algunas de ellas puede observarse un moteado nuclear fluorescente, apareciendo el resto del núcleo sin fluorescencia ó en negativo pudiendo pues corresponder a estos polipéptidos localizados tanto a nivel citoplásmico como nuclear.

La región del genoma donde están codificados estos polipéptidos se encuentra entre las regiones que codifican la timidina kinasa vírica y las glicoproteínas gA/B (BRAUN et al. 1983).

VAUGHAN et al. (1985) a partir de preparaciones purificadas de ADN-polimerasa de VHS-2 y VHS-1 identifican dos polipéptidos. Uno de ellos, el de mayor peso molecular (150.000 daltons) está asociado a otros polipéptidos (POWELL y PURIFOY, 1977; DERSE et al. 1982).

Uno de estos componentes polipeptídicos asociados a esta proteína de 150.000 daltons es el polipéptido denominado ICsp34.35 (POWELL y COURTNEY, 1975).

VAUGHAN et al. (1985) sugieren que estos polipéptidos actúan en la síntesis de ADN como un complejo proteico.

La purificación de este polipéptido ICSP34,35 mediante cromatografía (ADN-columna de celulosa) permitió utilizarlo para inmunizar un conejo frente a dicha proteína.

El suero del conejo reaccionaba con el polipéptido ICSP34,35 y con el polipéptido con actividad ADN-polimerasa mostrando así una reacción cruzada entre ambos polipéptidos.

VAUGHAN et al. (1985) obtuvieron tres anticuerpos monoclonales frente a ICSP34,35.

Todos estos anticuerpos monoclonales son tipo específicos, es decir solo reconocen este polipéptido en las células infectadas por VHS-2.

La proteína ICPS34,35 aparece localizada sobre todo en el núcleo aunque con el monoclonal SD1, la tinción de peroxidasa parece más citoplásmica que nuclear.

Con estos anticuerpos monoclonales que reaccionan con ICSP 34,35, VAUGHAN et al.(1985) intentaron reevaluar la asociación de este polipéptido con la ADN-polimerasa.

La elución en una columna de celulosa de las fracciones víricas conteniendo ADN-polimerasa y el polipéptido ICSP34,35 permitieron detectar la coelución de dichas proteínas.

Se desconoce la función de esta proteína, pero se supone que está ligada a la actividad exonucleasa que posee también el complejo proteico ADN-polimerasa (KNOPF, 1979).

Desconocemos si la proteína p35 identificada con el anticuerpos monoclonal 23G10 posee dicha asociación con la actividad ADN-polimerasa.

El anticuerpo monoclonal obtenido específico de VHS-2 identifica una proteína de 60.000 daltons de peso molecular que mediante tinción del gel de poli-acrilamida con PAS (Periodic - Acid Schiff) queda caracterizada como una glicoproteína.

Da lugar a un patrón de fluorescencia de membrana de células Vero infectada con VHS-2.

La movilidad electroforética que presenta dicha proteína específica la VHS-2, característica de ser una glicoproteína y el tipo de fluorescencia de membrana que aparece sobre células Vero infectadas, nos permite identificarla como la glicoproteína gD de VHS y el anticuerpo monoclonal reconocería un determinante tipoespecífico de la glicoproteína gD de VHS-2.

EISENBERG et al. (1982) con una batería de 17 monoclonales frente a la glicoproteína gD de VHS-1 (gD-1) y de VHS-2 (gD-2) demostraron basándose en las diferencias en la inmunoprecipitación y en la capacidad neutralizante, la existencia de determinantes antígenicos tipo comunes y tipo específicos, tanto en gD-1 como gD-2.

La proteína gp60 identificada por el anticuerpo monoclonal 32D9 específico de VHS-2 se encuentra situada en la membrana de las células infectadas por VHS. COHEN et al. (1978) demostraron que la gp59, ó antígeno CP-1 están situados también en la membrana envolvente del virión.

EISENBERG et al. (1979) identifican la existencia de una proteína precursora de la denominada gD, de 52.000 daltons de peso molecular en los viriones de las células infectadas por VHS, al que denominan gp52 ó pD.

El anticuerpo monoclonal (32D9) específico de un determinante tipo específico de la glicoproteína gD de VHS-2 no reacciona con este precursor de 52.000 daltons de peso molecular. Así pues es un anticuerpo dirigido frente a una parte de la molécula glicoproteica que ha sufrido la modificación de precursor a glicoproteína madura.

El anticuerpo monoclonal 178A3 (GLORIOSO et al. 1977) reconoce un determinante tipo específico de pG-2.

Un aislamiento de VHS-1 (RAWLS et al. 1984) a partir de la nariz de un sujeto con infecciones herpéticas recurrentes, fue reconocido que dicho anticuerpo monoclonal (178A3).

El estudio de la secuencia de ADN que codifica dicha glicoproteína gD de dicho aislamiento, mostró la existencia de una alteración puntual en la composición de aminoácidos. La histidina está localizada en la posición 97 de la glicoproteína gD-2.

Dicho aislamiento presentaba histidina en el lugar 97 en lugar de asparragina, que es el aminoácido que debía estar localizado allí.

De ahí que RAWLS et al. (1984) concluyan que el anticuerpo monoclonal 178A3 reconoce un epítopo localizado a este nivel de la proteína.

Nosotros en ninguno de los 40 aislamientos de VHS identificados y tipados con el anticuerpo monoclonal obtenido (32D9) en nuestro laboratorio hemos encontrado variación alguna, ni cepas que no hubieran podido ser reconocidas por dicho anticuerpo monoclonal.

Ninguno de los aislamientos identificados como VHS-1 reaccionó con el monoclonal 32D9 específico de VHS-2.

En el estudio realizado enfrentando las proteínas separadas electroforéticamente de cada una de las cepas aisladas con los sueros obtenidos de los propios pacientes, nos ha permitido identificar dichas proteínas (tanto p35 como gp60) como importantes en la reacción inmunitaria del huésped frente a VHS, tanto VHS-1, como VHS-2.

KAHLON et al. (1986) demostraron estudiando sueros de pacientes con lesiones herpéticas recurrentes mediante Western-blot en las cepas de VHS-1 y VHS-2 y no con la propia cepa aislada del mismo paciente, la existencia de anticuerpos frente al denominado por estos autores complejo p35.

Nosotros hemos observado también mediante Western-blot, que en los sueros de los sujetos con infecciones herpéticas recurrentes aparecen anticuerpos frente a dicha proteína p35, demostrable también con el anticuerpo monoclonal 23G10 sobre p35 de la cepa aislada del mismo paciente al que se le extrajo el suero.

Los mismos resultados fueron obtenidos con la glicoproteína identificada por el anticuerpo monoclonal 32D9 específico de VHS-2 y que reconoce los determinantes tipospecíficos de la glicoproteína gD de 60.000 daltons de peso molecular.

Al enfrentar las cepas aisladas de pacientes con lesiones herpéticas recurrentes con el suero de dichos pacientes mediante Western-blot, observamos la aparición de esta banda con una movilidad electroforética correspondiente a 60.000 daltons.

Esta glicoproteína tiene un papel en la respuesta inmunitaria como señalan también ROSS et al. (1985).

ROSS et al. (1985) utilizan un método de ELISA para identificar anticuerpos humanos frente a la glicoproteínas gC y gD de VHS reconocida por anticuerpos monoclonales.

Detectaron anticuerpos en el suero de pacientes capaces de bloquear dichos anticuerpos monoclonales, correlacionando dicha inhibición con una historia de infecciones herpéticas.

Estas observaciones sugieren que los lugares antigénicos en dichas glicoproteínas, son reconocidos que el huésped humano, corroborando así nuestros resultados.

5.6.- Diagnóstico y tipado de aislamientos de VHS - (VHS-1 y VHS-2) con los anticuerpos monoclonales 23G10 y 32D9

Los anticuerpos monoclonales obtenidos en nuestro laboratorio, específicos de VHS-1 (23G10) y VHS-2 (32D9) nos han permitido identificar y tipar 45 aislamientos procedentes de otros tantos pacientes que presentaban lesiones herpéticas tanto de localización orofaríngea como genital.

El método utilizado fue el aislamiento en cultivo de células Vero y su posterior identificación y tipado con los anticuerpos monoclonales 23G10 y 32D9 mediante inmunofluorescencia.

BALACHANDRAN et al. (1982) utilizaron anticuerpos monoclonales específicos de VHS-1 y VHS-2 y tipo comunes. El hibridoma 188B3 secretor de una inmunoglobulina IgG reacciona con la glicoproteína gD de VHS-1 y VHS-2.

El hibridoma 17 α A2 secreta anticuerpos IgG2a que reaccionan con un antígeno tipo específico de gE de VHS-2 y el hibridoma 17 β A3 produce anticuerpos monoclonales que reaccionan con un determinante antigénico tipo específico de la glicoproteína gD de VHS-2.

La técnica de investigación y tipado de Herpes simplex utilizada por ellos fue la inmunofluorescencia indirecta a partir de las células infectadas con los virus aislados.

GOLDSTEIN et al. (1983) obtuvieron cuatro anticuerpos monoclonales que reaccionaban con las células infectadas por virus Herpes simplex.

Uno de estos anticuerpos (3-G11) reacciona con la glicoproteína gC de peso molecular de 80 a 120.000 daltons específico de VHS-1 mientras que los otros anticuerpos, G-AG, G-E12 y G-H11 reaccionan con proteínas específicas de VHS-2 y con pesos moleculares de 140.000, 55.000 y 38.000 respectivamente.

Estos autores utilizan también la inmunofluorescencia a partir de las células infectadas con las cepas aisladas de VHS para tipar 263 cepas procedentes de diferentes aislamientos, de los cuales 76 eran de VHS-1 y 187 fueron tipadas como VHS-2.

Diecisiete de estas cepas fueron elegidas al azar para el estudio genómico con endonucleasas de restricción confirmándose en un 100% de los casos la correspondencia con el tipo de virus tipado con los anticuerpos monoclonales.

ZIEGLER et al. (1985) compararon el tipado de los aislamientos de VHS con anticuerpos monoclonales y por hibridación. Los resultados de ambos métodos concuerdan, siendo un método rápido, sensible y específico.

PEREIRA et al. (1982) utilizaron un panel de anticuerpos monoclonales frente a las glicoproteínas de VHS para serotipar 130 cepas. Según la reactividad de las cepa con este panel de 18 anticuerpos monoclonales definen tres patrones de reactividad con los anticuerpos monoclonales, mostrando su aplicación potencial a los estudios epidemiológicos de VHS.

De los resultados obtenidos con nuestros anticuerpos monoclonales puede deducirse que son adecuados para tipar VHS-1 y VHS-2 a partir de cultivos celulares inoculados con cepas o muestras y en un tiempo relativamente corto postinoculación.

No hemos encontrado ningún aislamiento de VHS que reaccione con ambos anticuerpos monoclonales, ni tampoco ninguna cepa que no reaccione con ninguno de los dos anticuerpos monoclonales. No hemos comparado la tipificación con los anticuerpos monoclonales con ningún otro método como pudiera ser un método de restricción de ADN o de hibridación, pero pensamos que es suficiente el método realizado al haber trabajado siempre con cepas de referencia admitidas por todos, y no haber encontrado ninguna cepa que presente problemas de tipado.

6.- CONCLUSIONES

La realización de este trabajo siguiendo los objetivos propuestos nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- 1.- Hemos obtenido un clon de hibridoma (23G10) productor de un anticuerpo monoclonal específico frente a una proteína del VHS-1 que presenta una movilidad electroforética correspondiente a 35.000 daltons de peso molecular (p35). Este clon ha sido obtenido al fusionar células de mieloma Ag 8 y células esplénicas de ratón Balb/c inmunizado con la cepa VR3 McIntyre de virus Herpes simplex tipo 1 (VHS-1)
- 2.- Obtuvimos un clon de hibridoma (32D9) productor de un anticuerpo monoclonal específico frente a una proteína de VHS-2 con movilidad electroforética correspondiente a 60.000 daltons de peso molecular (P60). Este clon ha sido obtenido al fusionar células de mieloma Ag8 y células esplénicas de ratón Balb/c inmunizado con la cepa MS-1 de virus Herpes simplex tipo 2 (VHS-2)
- 3.- La proteína p35 no es una glicoproteína, mientras si lo es la proteína p60, como se comprobó al efectuar la tinción de PAS (ácido periódico de Schiff) del gel de poliacrilamida con las proteínas separadas electroforéticamente.
- 4.- Las proteínas descritas p35 y p60 son específicas de VHS 1 y VHS-2 respectivamente, ya que cada una de ellas puede detectarse solo en los extractos de células infectadas con cada uno de los dos tipos de virus respectivos al enfrentar las proteínas separadas electroforéticamente con los anticuerpos monoclonales 23G10 y 32D9. Estos anticuerpos reconocen por ello determinantes tipo específicos de dichos virus.
- 5.- Las proteínas citadas no aparecen en otros virus de la familia Herpesviridae (Citomegalovirus, virus Varicella-Zoster y virus de Epstein-Barr), al no haberse encontrado reacciones de los anticuerpos monoclonales citados mediante inmunofluorescencia indirecta ó Western-blot respectivamente con células infectadas por ellos ó con extractos proteicos de tales células separados electroforéticamente en gel de poliacrilamida.

- 6.- Las proteínas p35 y p60 no participan en la infectividad del virus ya que los anticuerpos monoclonales respectivos frente a cada uno de ellas no poseen capacidad neutralizante de los VHS-1 ó VHS-2.
- 7.- Las proteínas p35 y p60 se expresan en la membrana de las células Vero, pudiendo ser identificadas a las veinte horas postinoculación de 100 TCID50 de VHS-1 ó VHS-2 en tales células, aún antes de aparecer el efecto citopático vírico, lo que permite detectar y tipar los aislamientos víricos precozmente.
- 8.- Los anticuerpos monoclonales 23G10 y 32D9 corresponden respectivamente a las clases IgG2a e IgG2b, como pudo demostrarse por las pruebas de inmunoprecipitación realizadas.
- 9.- Los anticuerpos monoclonales obtenidos 23G10 y 32D9 permiten diferenciar rápidamente aislamientos de VHS mediante inmunofluorescencia indirecta a partir de los cultivos procedentes de muestras clínicas de pacientes con lesiones herpéticas. No hemos obtenido ningún aislamiento de VHS que presente reacción cruzada con ambos anticuerpos monoclonales, ni ningún aislamiento de VHS que no reaccione con ninguno de ambos anticuerpos monoclonales.
- 10.- La dosis mínima vírica de ambas cepas de VHS (VHS-1 VR3 Mc Intyre y VHS-2 MS-1) inoculada a los ratones Balb/c para inmunizarlos es importante, observándose que existe una dosis mínima de 10.5 UFP/mililitro con la que la inmunización conseguida es óptima en relación con la mortalidad provocada a los ratones a dicha concentración.

- 11.- La mejor vía de inoculación de las cepas de virus utilizadas, al comparar la mortalidad provocada y el porcentaje de ratones inmunizados obtenidos es la vía intraperitoneal, ya que con esta pauta de inmunización se obtiene mayor supervivencia de los ratones inoculados y el porcentaje de animales inmunizados es del 75% .
- 12.- La distribución de células postfusión debe realizarse en placas de pocillos de 200 microlitros de capacidad, ya que de esta forma puede reducirse en siete días el tiempo necesario para detectar los clones productores de los anticuerpos específicos, con respecto al tiempo requerido cuando son utilizadas placas de pocillos de 2 ml de capacidad.
- 13.- Hemos desarrollado un método ELISA-directo muy útil para detectar inicialmente los clones productores de anticuerpos, fijando directamente a las fases sólidas diluciones en tampón carbonato de sobrenadantes de pocillos de cultivo de los clones y revelando su fijación y por lo tanto su existencia con una antiinmunoglobulina anti-ratón marcada con peroxidasa.
- 14.- La inmunofluorescencia indirecta con células infectadas con VHS-1 y VHS-2 como antígeno para detectar los clones productores de un anticuerpo monoclonal específico es un método útil y específico, cuando las células son recogidas en condiciones adecuadas y que corresponden a 16 horas postinoculación de cultivo en una monocapa de 80 centímetros cuadrados inoculada con 100 TCID₅₀.
- 15.- Los anticuerpos monoclonales obtenidos pueden purificarse por precipitación con sulfato amónico y cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-25, pudiendo conservarse a -70°C, liofilizados ó en solución salina tamponada pH 7.2 a +4°C sin pérdida de su actividad.

7.- BIBLIOGRAFIA

- ACKERMANN, M., BRAUN, D.K., PEREIRA, L., ROIZMAN, B. 1984. Characterization of HSV-1 proteins 0.4 and 27 with monoclonal antibodies. *J. Virol.* 52: 108-118.

- ADLER, R., GLORIOSO, J.C., COSSMAN, J. LEVINE, M. - 1978. Possible role of Fc receptors on cells infected and transformed by herpesvirus escape from immune cytotoxicity. *Infect. Immun* 21: 442-447

- ALBERTS, B.M., BARRY, J., BEDINGER, T., FORMOSA, T. JONGENEEL, C.V., KREUZER, K.N. 1982. Studies on DNA replication in the bacteriophage Φ in vitro system. *Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol.* 47: 655-688

- ARVIN, A.M., KOROPCHAK, C.M., YEAGER, S., PEREIRA, L. 1983. Detection of type-specific antibody to Herpes Simplex virus type 1 by RIA with Herpes Simplex Virus type 1 glycoprotein C purified with monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 40: 184-189.

- BALACHANDRAN, N., HARNUSG, D., KILLINGTON, R.A., BACCHETTI, S., RAWLS, W.E. 1981. Monoclonal antibodies to two glycoproteins of Herpes Simplex virus Type 2. *J. Virol.* 39: 438-446.

- BALACHANDRAN, N., FRAME, B., CHERNESKY, H., KRAISELBERG, E., KOURI, Y., GARCIA, D., LAVERY, C., RAWLS, W.E. 1982. Identification and typing of Herpes Simplex viruses with monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 16: 205-208.

- BALACHANDRAN, N., HARNISH, D., RAWLS, W.E., BACCHETTI, S. 1982. Glycoproteins of Herpes Simplex virus type 2 as defined by monoclonal antibodies. *J. Virol.* 44: 344-355.

- BALACHANDRAN, N., BACCHETTI, S., RAWLS, W.E. 1982. Protection against lethal challenge of Balb/c mice by passive transfer of monoclonal antibodies to five glycoproteins of Herpes simplex virus type 2. *Infect. Immun.* 37: 1132-1137.

- BALACHANDRAN, N., HUTT - FLETCHER, L.M. 1985. Synthesis and processing of glycoprotein gG of Herpes simplex virus type 2. *J. Virol.* 54: 825-832.

- BARON, S., WORTHINGTON, J., WILLIAMS, J., GAINES 1975. Post exposure serum prophylaxis of neonatal Herpes simplex virus infection of mice. *Nature*, 261: 505-506.

- BAUCKE, R., SPEAR, P.G. 1979. Membrane proteins - specified by Herpes simplex viruses. V. Identification of an Fc-binding glycoprotein. *J. Virol.* 32: 779-789.

- BAZIN, H. 1981. Les Anticoups Monoclonaux. *Louvain Med.* 100: 3-8.

- BEELEY, J.G. Glycoprotein and proteoglycan laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Vol. 16. Elsevier Science Publishers Amsterdam 1985.

- BEN-PORAT, T., KAPLAN, A.S. 1972. Studies on the biogenesis of herpesvirus envelope. *Nature*, 235: 165-166.

- BERNSTEIN, D.I., LOVETT, M.A., BRYSON, J.J. 1984. The effects of acyclovir on antibody response to Herpes simplex virus in primary genital herpetic infections. *J. Infect. Dis.* 150: 7-13.

- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein - utilizing the principle of protein -dye binding. *- Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- BRAUN, D.K., PEREIRA, L., NORRILD, ROIZMAN, 1983. Application of denatured, electrophoretically separated, and immobilized lysates of Herpes Simplex virus-infected cells for detection of monoclonal antibodies for studies of the properties of viral proteins. *J. Virol.* 46: 103-112.

- BROWN, W.R.A., BARCLAY, A.N., SUNDERLAND, C.A., WILLIAMS, A.F. 1981. Identification of a glycophorin-like molecule at the cell surface of rat thymocytes Nature 289: 456-460

- BUCHMAN, T.G., ROIZMAN, B., ADAMS, G., STOVER, B.H. 1978. Restriction endonuclease fingerprinting of Herpes simplex virus DNA: a novel epidemiological tool applied to a nosocomial outbreak. J. Infect. Dis. 138: 488-498.

- BUCKMASTER, E.A., CRANAGE, M.P., McLEAN, C.S., COOMAS, R.R.A., MINSON, A. 1984. The use of monoclonal antibodies to differentiate isolates of Herpes simplex types 1 and 2 by neutralization and reverse passive haemagglutination tests. J. Med. Virol. 13: 193-202.

- BUCKMASTER, E.A., GOMPERS, V., MINSON, A. 1984. Characterisation and physical mapping of an HSV-1 glycoprotein of approximately 115 x 10.3 molecular weight. Virology, 139: 408-413.

- BURNET, F.M. The clonal selection theory of acquired immunity. Vanderbilt Univ. Press. 1959.

- BURNS, W.H., BILLUPS, L.C., NOTKINS, A.L. 1975. Thymus dependence of viral antigens. Nature. 256: 654-656

- CABRAL, G.A., COURTNEY, R.J., SCHAFFER, P.A., MARIANO-CABRAL, F. 1980. Ultrastructural characterization of an early, nonstructural polypeptide of Herpes simplex virus type 1. J. Virol. 33: 1192-1198.

- CAMPADELLI-FIUME, G., POLETTI, L., DALL, F., SERAFINI-CESSI, F. 1982. Infectivity and glycoprotein processing of Herpes simplex virus type 1 grown in a ricin-resistant cell line deficient in N-Acetylglicosaminyl transferasa I. J. Virol. 43:1061-1071.

- CAMPBELL, A.M. Monoclonal antibody technology. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier Science Publishers. Amsterdam 1986.

- CARROLL, R.B., LAGER, L., DULBECCO, R. 1974. Simian virus 40 T antigen binds to DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 3754-3757

- CENTIFANTO, Y.M., LITTLE, J.M., KAUFMAN, H.E. 1970. The relationship between virus chemotherapy, secretory antibody formation and recurrent herpetic disease. Ann. N.Y. Acad. Sci. 173: 649-655.

- COHEN, D.M., SCHAFFER, P.A. 1980. Two distinct loci confer resistance to acycloguanosine in Herpes simplex virus type 1. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 2265-2269.

- COHEN, G.H., KATZE, M., HYDREAN-STERN, C., EISENBERG, R.J. 1978. Type-common CP-1 antigen of Herpes simplex virus is associated with a 59.000 molecular weight envelope glycoprotein. J. Virol. 27:172-181.

- COHEN, G.H., LONG, D., MATTHEWS, J.T., MAY, M., EISENBERG, R. 1983. Glycopeptides of the type-common glycoproteins gD of herpes simplex virus types 1 and 2 J. Virol. 46: 679-689.

- COHEN, G.H., PONCE DE LEON, M., NICHOLS, C. 1972. Isolation of a Herpes simplex virus specific antigenic fraction which stimulates the production of neutralizing antibody. J. Virol. 10: 1021-1030.

- COHEN, E., LONG, D., EISENBERG, R.J. 1980. Synthesis and processing of glycoproteins gD and gC of Herpes simplex virus type 1. J. Virol. 36: 429-439.

- COLEMAN, R.M., PEREIRA, L., BAILEY, P.D., DONDERO, D., WICKLIFE, C., NAHMIAS, A.J. 1983. Determination of Herpes simplex virus type - specific antibodies by Enzyme - Linked Immunosorbent Assay. J. Clin. Microbiol. 18: 287-291.

- COREY, L., REEVES, W.C., HOLMES, K.K. 1978. Cellular immune response in genital Herpes simplex virus infection. N. Engl. J. Med. 299: 986-991.

- COSTA, J., YEE, C., NAKAMURA, y RABSON, A. 1978. - Characteristics of the Fc receptor induced by Herpes simplex virus. Intervirology 10: 32-39.

- COSTA, J., RABSON, A.S., YEE, C., TRALKA, T.S. - 1977. Immunoglobulin binding to Herpes simplex virus induced Fc receptors inhibits virus growth. - Nature 269: 251-252.

- COSTA, J.C. y RABSON, A.S. 1975. Role of Fc receptors in Herpes simplex virus infection. Lancet. I: 77-78.

- COURTNEY, R.J., BENYESH-MELNICK. 1974. Isolation - and characterization of a large molecular weight - polypeptide of Herpes simplex virus type 1. Virology 62: 539-551.

- DAMJANOV, I., KNOWLES, B.B. 1983. Biology of disease. Monoclonal antibodies and tumor - associated - antigens. Lab. Invest. 48: 510-525

- DARLINGTON, R.W., MOSS, L.H. 1968. Herpesvirus envelopment. J. Virol. 2: 48-55.

- DAVIDSON, R.L., O'MALLEY, K.A., WHEELER, T.B. 1976. Polyethylene glycol-induced mammalian cell hybridization: Effect of polyethylene glycol molecular weight and concentration. Somatic. Cell. Genetics, 2: 271-280.

- DERSE, D., BASTOW, K.F., CHENG, Y.C. 1982. Characterization of the DNA polymerases induced by a - group of Herpes simplex type 1 variants selected for growth in the presence of phosphonoformic -- acid. J. Biol. Chem. 257: 10251-10260.

- DIX, R.D., PEREIRA, L., BARINGER, J.D. 1981. Use of monoclonal antibody directed against Herpes Simplex virus glycoproteins to protect mice against acute - virus induced neurological disease. Infect. Immun. 34: 192-199.

- DIXON, R.A.F., SCHAFFER, P.A. 1980. Fine structure mapping and functional analysis of temperatura sensitive mutants in the gene encoding the Herpes simplex virus type 1 immediate early protein VP 175. - J. Virol. 36: 189-203

- DOWDLE, W.R. 1967. Association of antigenic type of Herpes simplex hominis with site of viral recovery. J. Immunol. 99: 974-976.

- DREW, W.L., RAWLS, W.E. Herpes simplex viruses. En: Manual of Clinical Microbiology. LENETTE, E.H., - BALOWS, A., HAUSLER, W., SHADOMY, H.J. Fourth Edition. American Society for Microbiology. 1985. pp. 705-710.

- EBERLE, R., COURTNEY, R.J. 1980. gA and gB glycoproteins of Herpes simplex virus type 1: two forms of a single polypeptide. J. Virol. 36: 665-675.

- EBERLE, R., COURTNEY, R.J. 1980. Preparation and - characterization of specific antisera to individual glycoprotein antigens including the major glycoprotein region of Herpes simplex virus type 1. J. Virol. 35: 902-917.

- EBERLE, R., COURTNEY, R.J. 1982. Multimeric forms - of Herpes Simplex virus types 2 glycoproteins. J. - Virol. 41: 348-351

- EISENBERG, R.J., HYDREAN-STERN, C., COHEN G.H. 1979. Structural analysis of precursors and product forms of type-common envelope glycoprotein D(CP-1 antigen) of Herpes simplex virus type 1. J. Virol. 31: 608-620.

- EISENBERG, R., COURTNEY, R. 1982. Purification of glycoprotein gD of Herpes Simplex virus types 1 and 2 by use of monoclonal antibody. J. Virol. 41: 1099-1104.
- EISENBERG, R.J., PONCE DE LEON, M., COHEN, G.H. 1980. Comparative structural analysis of glycoprotein gD of Herpes simplex virus type 1 and 2. J. Virol. 35: 428-435.
- EISENBERG, R.J., LONG, D., PEREIRA, L. 1982. Effect of monoclonal antibodies on limited proteolysis of native glycoprotein gD of Herpes Simplex Type 1. J. Virol. 41: 478-488.
- EJERCITO, P.M., KIEFF, E.D., ROIZMAN, B. 1968. Characterization of Herpes simplex virus strains differing in their effects on social behavior of infected cells. J. Gen. Virol. 2: 357-362

- FAZEKAS de St. GROTHS, SCHEIDEGGER, D. 1980. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics J. Immunol. Meths. 35: 1-21

- FIFE, K.H., COREY, L. Viral agents: Herpes simplex virus, Cytomegalovirus and Hepatitis A and B. HOLMES, K.K., McGRAW-HILL-BOOK COMPANY. En Sexually transmitted diseases. 1984. pp. 856-874.

- FITHIAN, E., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., RUTENFELD, M., FENOGLIO, C., EDELSON, R. 1981. Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. Proc. Nat. Acad. Sc. 78: 2541-2544.

- FRANKE, W.W. 1974. Structure and biochemistry of the nuclear envelope. Inst. Rov. Cytol. Suppl. 4: 71-236.

- FRENCH, D., FISCHBERG, E., BUHL, S., SCHARFF, M. 1986. The production of more useful monoclonal antibodies. I. Modifications of the basic technology. Immunology Today 7: 344-346

- FRENKEL, N., JACOB, R.J., HONESS, R.W., HAYWARD, G. S., LOCKER, H., ROIZMAN, B. 1975. Anatomy of Herpes simplex virus DNA, III. Characterization of defective DNA molecular and biological properties of virus populations containing them. J. Virol. 16: 153-167.

- FUJINAMI, R.S., OLDSTONE, M.B.A. 1979. Antiviral agent reacting on the plasma membrane alters measles virus expression inside the cell. Nature, 279: 525-530.

- GALFRE, G., MILSTEIN, C. 1981. Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures. Methods in Enzimology. Vol. 73. pp. 3-40.

- GIBSON, W., ROIZMAN, B. 1972. Proteins specified by Herpes simplex virus VIII. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2. J. Virol. 10: 1044-1052

- GIBSON, W., ROIZMAN, B. 1974. Proteins specified by Herpes simplex virus X. Staining and radiolabelling of capsid and virion proteins in polyacrylamide gels. J. Virol. 13: 155-163
- GLORIOSO, J.C., SMITH, J.W. 1977. Immune interactions with cells infected with Herpes simplex virus: antibodies to radioiodinated surface antigens. J. Immunol. 118: 114-126.
- GOLDSTEIN, L.C., COREY, L., McDOUGALL, J.K. 1983. Monoclonal antibodies to Herpes simplex viruses: Use in antigenic typing and rapid diagnosis. J. Infect. Dis. 147: 829-837.
- GRAHAM, F.L., VAN DER EB, A.J. (1973). A new method for the assay of the infectivity of Adenovirus 5 DNA. Virology 52: 456-467.
- GREEN, J.A., YEH, T.J., OVERALL, J.C. 1981. Sequential production of IFN-alfa and immune-specific IFN-gamma by human mononuclear leukocytes exposed to Herpes simplex virus. J. Immunol. 127: 1191-1196.
- GREEN, M.T., COURTNEY, R.J., DUNKEL, E.C. 1981. Detection of an immediate early Herpes simplex virus type 1 polypeptide in trigeminal ganglia from latently infected animals. Infect. Immun. 37: 987-992.
- HAFFEY, M.L., SPEAR, P.G. (1980). Alterations in glycoprotein gB specified by mutants and their partial revertants in Herpes simplex virus type 1 and relationship to other mutant phenotypes. J. Virol. 35: 114-118
- HARRIS, J.R. 1978. The biochemistry and ultrastructure of the nuclear envelope. Biochem. Biophys Acta. 515: 55-104.
- HARRIS, H., WATKINS, J.F. 1965. Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. Nature. 205: 640-646

- HAY, R.T., HAY, J. 1980. Properties of herpesvirus induced "immediate - early" polypeptides. *Virology*. 104: 230-234

- HAYWARD, G.S., FRENKEL, N., ROIZMAN, B. 1975. Anatomy of Herpes simplex virus DNA: strain differences and heterogeneity in the locations of restriction endonuclease cleavage sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 1768-1772.

- HEIFETZ, A., KEENAN, R.W., ELBEIN, A.D. 1979. Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc: -dolichylphosphate GlcNAc-1 phosphate transferase. *Biochemistry*. 18: 2186-2192.

- HEINE, J.W., SPEAR, P.G., ROIZMAN, B. 1972. The proteins specified by Herpes simplex virus. VI. Viral protein in the plasma membrane. *J. Virol.* 9: 431-439.

- HOLMES, K.V., DOLLER, E.W., STURMAN, L.S. 1981. Tunicamycin resistant glycosylation of a coronavirus glycoprotein: demonstration of a novel type of viral glycoprotein. *Virology*. 115: 334-344

- HOLLAND, T.C., MARLIN, S.D., LEVINE, M., GLORIOSO, 1983. Antigenic variants of HSV selected with glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *J. Virol.* 45: 672-682.

- HOMA, F.L., PURIFOY, D.J.M., GLORIOSO, J.C., LEVINE, M. 1986. Molecular basis of the glycoprotein - C-Negative phenotypes of Herpes simplex virus type 1 mutants selected with a virus - neutralizing monoclonal antibody. *J. Virol.* 58: 281-289.

- HONESS, R.W., ROIZMAN, B. 1974. Regulation of Herpesvirus macromolar synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of phase groups of viral proteins. *J. Virol.* 114: 8-9.

- HONESS, R.W., ROIZMAN, B. 1975. Proteins specified by Herpes simplex virus. XIII. Glycosylation of viral polypeptides. *J. Virol.* 16: 1308-1326.

- HUBBARD, S.C., IVATT, R.J. 1981. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 555-583.

- JENNINGS, S.R., RICE, P.L., PAN, S., KNOWLES, B.B., TEVETHIA, S.S. 1984. Recognition of Herpes simplex virus antigen on the surface of mouse cells of the H-2b haplotype by virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 132: 475-481.

- JOHNSON, D.C., SCHLESINGER, M.J. 1980. Vesicular stomatitis virus and Sindbis virus glycoproteins transport to the cell surface inhibited by ionophores. *Virology.* 103: 407-424.

- JOHNSON, D.C., SPEAR, P.G. 1982. Monensin inhibits the processing of Herpes simplex virus glycoproteins their transport to the cell surface, and egress of virions from infected cells. *J. Virol.* 43: 1102-1112.

- JOHNSON, D.C., SPEAR, P.G. 1983. O-linked oligosaccharides are acquired by Herpes simplex glycoproteins in the Golgi apparatus. *Cell* 32: 987-997.

- JOHNSON, D.C., SMILEY, J.R. 1985. Intracellular transport of Herpes simplex virus gD occurs more rapidly in uninfected cells than in infected cells. *J. Virol.* 54: 682-689.

- KAHLON, J., LAKEMAN, F.D., ACKERMANN, M., WHITLEY, R.J. 1986. Human antibody response to Herpes simplex virus-specific polypeptides after primary and recurrent infection. *J. Clin. Microbiol.* 23: 725-730.

- KAPOOR, A.K., NASH, A.A., WILDY, P. 1982. Pathogenesis of Herpes simplex virus in B-cell suppressed mice: the relative roles of cell mediated and humoral immunity. *J. Gen. Virol.* 61: 127-131.

- KELLER, R., PEITCHELL, R., GOLDMAN, J.N., GOLDMAN, J.N., GOLDMAN, M. 1976. An IgG-Fc receptor induced in cytomegalovirus-infected human fibroblasts. J. Immunol. 116: 772-772.

- KNOPF, K.W. 1979. Properties of Herpes simplex virus DNA polymerase and characterisation of its associated exonuclease activity. Eur. J. Biochem. 98: 231-244.

- KNIPE, D.M., LODISH, H.F. y BALTIMORE, D. 1977. Localization of two cellular forms of the vesicular stomatitis viral glycoprotein. J. Virol. 21: 1121-1127.

- KNOWLES, R.W., PERSON, S. 1976. Effects of 2-deoxyglucose, glucosamine and mannose on cell fusion and the glycoproteins of Herpes simplex virus. J. Virol 18: 644-651

- KOHL, S. 1985. Herpes simplex virus immunology: Problems, progress and promises. J. Infect Dis 152: 435-440

- KÖHLER, G., MILSTEIN, C. 1975. Continuous cultures of fixed cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-497.

- KRISTENSSON, K., LUCKE, E., SJOSTRAND, X. 1971. Spread of Herpes simplex virus in peripheral nerves. Acta Neuropathol. 17: 44-53.

- LAWMAN, M.J.P., ROUSE, B.T., COURTNEY, R.J., WALKER D. 1980. Cell-mediated immunity against Herpes simplex. Induction of cytotoxic T lymphocytes. Infect. Immun. 27: 133-139.

- LEACH, B.S., COLLAWN, J.F., FISH, W.W. 1980. Behavior of glycopeptides with empirical molecular weight estimation methods. 1. In sodium dodecyl sulfate. Biochemistry. 19: 5734-5741

- LEE, G.T.Y., PARA, H.F., SPEAR, P. 1982. Location of the structural genes for glycoproteins gD and gE and for other polypeptides in the σ component of Herpes simplex virus types 1 DNA. J. Virol. 43: 41-49.

- LEE, C.K., KNIPE, D.M. 1985. An immunoassay for the study of DNA-binding activities of Herpes simplex virus protein ICP8. J. Virol. 54: 731-738

- LEHNER, T., WILTOM, J.M.A., SHILLITOE, E.J. 1975. Immunological basis for latency, recurrences, and putative oncogenicity of Herpes simplex virus. Lancet. II: 60-62.

- LEHMANN-GRUBE, F., ASSMANN, U., LOLIGER, L., MOSKOPHIDIS, D., LOHLER, J. 1985. Mechanism of recovery from acute virus infection. I. Role of T-lymphocytes in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from spleens of mice. J. Immunol. 134: 608-615.

- LEIDER, W., MAGOFFIN, R.L., LENNETTE, E.H., LEARNARDS, R. 1965. Herpes simplex virus encephalitis. Its possible association with reactivated latent infection. N. Engl. J. Med. 273: 341-347.

- LEVITAN, D.B., BLOUGH, H.A. 1976. Preliminary biochemical characterization of the factor (s) responsible for Herpesvirus - induced exogenous fusion J. Virol. 18: 1081-1087.

- LITTLE, S.P., JOFRE, J.T., COURTNEY, R.D., SCHAEFFER P.A. 1981. A virion associated glycoprotein essential for infectivity of Herpes simplex virus type 1 Virology 115: 149-159

- LONSDALE, D.M., BROWN, S.M., SUBAK-SHARPE, J.H., WARREN, K.G., KOPROSNKI, H. 1979. The polypeptide and DNA restriction profiles of spontaneous isolated of Herpes simplex virus type 1 from explants of human trigeminal, superior cervical and vagus ganglia. J. Gen. Virol. 43: 151-171.

- LOPEZ, C. Mediated immune response to Herpesvirus - infections. En: Human immunity to viruses. ENNIS, - F.A. eds. Academic Press. 1983. pp. 1-65

- LOVBORG, V. Monoclonal antibodies: Production and - maintenance. William Heinemann Medical Books Ltd. - London. 1982. pp. 1-65.

- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phe-- nol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

- LUKA, J., SIEGERT, W., KLEIN, G. 1977. Solubiliza-- tion of the Epstein-Barr virus - determined nuclear antigen and its characterization as a DNA - Binding protein. J. Virol. 22: 1-8

- MACKEM, S., ROIZMAN, B. 1980. Regulation of Herpes virus macromolecular synthesis. Transcription initiation sites and domains of γ genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 12: 7122-7129

- MANSEVIRGI, R., SPEAR, P.G., BUCHAN, A. 1977. Cell fusion induced by Herpes simplex virus is promoted and suppressed by different viral glycoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 3913-3917.

- MARLIN, S.D., HOLLAND, T.C., LEVINE, M., GLORIOSO, J.C. 1985. Epitopes of Herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC localized in two distinct antigenic sites. J. Virol. 53: 128-136.

- MARSDEN, H.S., STOW, N.D., PRESTON, V.G., TIMBURY, M.C., WILKIE, N.M. 1978. Physical mapping of Herpes simplex virus - induced polypeptides. J. Virol. 28: 624-642.

- MARSDEN, H.S., BUCKMASTER, A., PAIFREYMAN, W., HOPE R.G., MINSON, A.C. 1984. Characterization of the 92,000 daltons glycoprotein induced by Herpes simplex virus type 2. J. Virol. 50: 547-554.

- MARTINEZ, D., LYNCH, R.J., MEEKER, J.B., FIELD, A.K. 1980. Macrophage dependence of polyriboinosinic acid-polyribocytidic acid-induced resistance to Herpes simplex virus infection in mice. Infect. Immun. 28: 147-153.

- MATTHEWS, R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. Intervirology. 17: 47-51.

- MCKENDALL, R., KLASSEN, T., BARINGER, J. 1979. Host defenses in Herpes simplex infections of the nervous system, effect of antibody on disease and viral spread. Infect. Immun. 23: 305-311.

- MCKENDALL, R.R. 1980. Comparative neurovirulence and latency of HSV-1 and HSV-2 following footpad inoculation in mice. J. Med. Virol. 5: 25-32.

- McLEAN, C.S., BUCKMASTER, E.A., HANCOCK, D., BUCHAN A., FULLER, A., MINSON, A. 1982. Monoclonal antibodies to three non-glycosylated antigens of Herpes simplex virus type 2. *J. Gen. Virol.* 63: 297-305.

- METZ GARO, R.S., BOROWITZ, J.M., JONES, N.H., DOWELL, B.L. 1981. Distribution of common acute lymphoblastic leukaemia antigen in non-haematopoietic tissues. *J. Exp. Med.* 154: 1254-1294

- MIDDLETON, M.H., REYES, G.R., CIUFO, D.M., BUCHAN, A., MACNAB, J.C.M., HAYWARD, G.S. 1982. Expression of cloned Herpesvirus genes. I. Detection of nuclear antigens from Herpes Simplex virus type 2 inverted repeat regions in transfected mouse cells. *J. Virol.* 43: 1091-1101.

- MORSE, L.S., PEREIRA, L., ROIZMAN, B., SCHAFFER, P.A. 1978. Anatomy of Herpes simplex (HSV) DNA. X. Mapping of viral genes by analysis of polypeptides and functions specified by HSV-1 x HSV-2 recombinants. *J. Virol.* 26: 389-410.

- NAHMIAS, A.J., NAIB, Z.M., JOSEY, W.E., CLEPPER, A.C. 1967. Genital Herpes simplex infection: virologic and cytologic studies. *Obstet. Gynecol.* 29: 395-400.

- NAKAMURA, Y., COSTA, J., TRALKA, T.S., YEE, C.L., RABSON, A.S. 1978. Properties of the cell surface Fc-receptor induced by Herpes simplex virus. *J. Immunol.* 121: 726-730.

- NASH, A.A., PHELAN, J., WILDY, P. 1981. Cell-mediated immunity in Herpes simplex virus-infected mice: H-2 mapping of the delayed-type hypersensitivity response and the antiviral T cell response. *J. Immunol.* 126: 1260-1262.

- NASH, A.A., WILDY, P. Immunity in relation to the pathogenesis of Herpes simplex virus. In: *Human immunity to viruses.* Academic Press. 1983. pp. 179-192.

- NILHEDEN, E., JEANSSON, S., VAHLNE, A. 1983. Typing of *Herpes simplex* virus by an Enzyme - Linked Immunosorbent Assay with monoclonal antibodies. *J.Clin. Microbiol.* 17: 677-680.

- NORRILD, B. 1980. Immunochemistry of *Herpes simplex* virus glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol.* 90: 67-106.

- NORRILD, B., PEDERSON, B. 1982. Effect of Tunicamycin on the synthesis of *Herpes simplex* virus type 1 glycoproteins and their expression on the cell surface. *J. Virol.* 43: 395-402

- NORRIELD, B., SHORE, S.L., NAHMIAS, A.J. 1979. *Herpes simplex* virus glycoproteins participation of individual *Herpes simplex* virus glycoprotein antigens immunocytolysis and their correlation with previously identified glycoprotein. *J. Virol.* 32: 741-748.

- NORWOOD, T.H., ZEIGLER, C.J., MARTIN, 1976. Dimethyl sulfoxide enhances PEG mediated somatic cell fusion. *Somatic Cell Genetics.* 2: 263-270.

- OAKES, J.E. 1975. Invasion of the central nervous system by *Herpes simplex* type 1 after subcutaneous inoculation of immunosuppressed mice. *J. Infect. Dis.* 131: 51-56.

- OAKES, J.E., ROSMOND-HORNBEAK, H. 1978. Antibody mediated recovery from subcutaneous *Herpes simplex* virus type 2 infection. *Infect. Immun.* 21: 489-495.

- OAKES, J.E., LAUSCH, R.N. 1981. Role of Fc fragments in antibody-mediated recovery from ocular and subcutaneous *Herpes simplex* virus infections. *Infect. Immun.* 33: 109-114.

- OAKES, J.E., LAUSCH, R.M. 1984. Monoclonal antibodies suppress replication of *Herpes simplex* virus type 1 in trigeminal ganglia. *J. Virol.* 51: 656-661.

- O'HARE, P., HAYWARD, G.S. 1985. Evidence for a direct role for both the 175.000 and 110.000 molecular-weight immediate-early proteins of Herpes simplex virus in the transactivation of delayed - early promoters. J. Virol. 53: 751-760

- OLOFSSON, S., KHANNA, B., LYCKE, E. 1980. Altered kinetic properties of sialyl and galactosyl transferases associated with Herpes simplex virus infection of GMK and BHK cells. J. Gen. Virol. 47: 1-9.

- PARA, M.F., BAUCKE, R.B., SPEAR, P.G. 1980. Immunoglobulin G (Fc) - binding receptors on virions of Herpes simplex virus type 1 and transfer of these receptors to the cell surface by infection. J. Virol. 34: 512-520.

- PARA, M.F., GOLDSTEIN, L., SPEAR, P. 1982. Limitarities and differences in the Fc-binding glycoprotein (gE) of Herpes Simplex virus type 1 and 2 and tentative mapping of the viral gene for this glycoprotein. J. Virol. 41: 137-144.

- PARA, M.F., BAUCKE, R.B., SPEAR, P.G. 1982. Glycoprotein gE of Herpes simplex Virus type 1: Effects anti-gE virion infectivity and on virus - induced - Fc binding receptors. J. Virol. 41: 129-136.

- PARA, M.F., ZEZULAK, K.M., CONLEY, A.J., WEINBERGER, M., SNITLER, K., SPEAR, P.G. 1983. Use of monoclonal antibodies against two 75.000 -molecular weight glycoproteins specified by Herpes simplex virus type 2 in glycoprotein identification and gene mapping. J. Virol. 45: 1223-1227.

- PELLET, P.E., BIGGIN, M.D., BARRELL, B., ROIZMAN, B. 1985. Epstein-Barr virus genome may encode a protein showing significant aminoacid and predicted secondary structure honology with glycoprotein B of Herpes simplex virus 1. J. Virol. 56: 807-823.

- PELLET, P.E., KOUSOULAS, K.G., PEREIRA, L. ROIZMAN, B. 1985, Anatomy of the Herpes simplex 1 strain F - glycoprotein B gene: primary sequence and predicted protein structure of the wild type and of monoclonal antibody - resistant mutants. J. Virol. 53: 243-253.

- PEREIRA, L., DONDERO, D.V., GALLO, D., WOODIE, J.D. 1982. Serological analysis of Herpes simplex viruses 1 and 2 with monoclonal antibodies. Infect. Immun. (1).

- PEREIRA, L., CASSAI, E., HONESS, R.W., ROIZMAN, B., TERNI, M., NAHMIAS, A. 1976. Variability in the structural polypeptide of Herpes simplex virus 1 strains: potential application in molecular epidemiology. Infect. Immun. 13: 211-220.

- PEREIRA, L., DONDERO, D., NORRIELD, B., ROIZMAN, B. 1981. Differential immunologic and electrophoretic properties of glycoprotein gA and gB of HSV-2 produced in Hep-2 and Vero cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 5202-5206.

- PEREIRA, L., DONDERO, D., ROIZMAN, B. 1982. Herpes simplex virus glycoproteins gA/B: Evidence that the infected vero cell products compap and arise by proteolysis. J. Virol. 44: 88-97.

- PEREIRA, L., DONDERO, D.V., GALLO, D., DEVLIN, V., WOODIE, J.D. 1982. Serological analysis of Herpes simplex virus types 1 y 2 with monoclonal antibodies. Infect. Immun. 35: 363-367.

- PEREIRA, L., KLASSEN, T., BARINGER, J.R. 1980. Type common and type-specific monoclonal antibody to Herpes Simplex Virus Type 1. Infect. Immun. 29:724-732.

- PEREIRA, L. Monoclonal antibodies to Herpes simplex viruses 1 and 2. In: Monoclonal hybridoma antibodies: techniques and applications. C.R.C. Press. 1984. pp. 119-138.

- PERSSON, S.K., KOUSULAS, K.C., KNOWES, R.W., BRAD, G.S., HOLLAND, T.C., KELLER, P.H., WARNER, S.C. 1982. Glycoprotein processing in mutants of HSV-1 that induce cell fusion. *Virology* 117: 293-306.

- PERSSON, R.Y., BACHETTI, S., SMILEY, J.R. 1985. Cells that constitutively express the Herpes simplex virus immediate - early protein ICP4 allow efficient activation of viral delayed - early genes in trans. *J. Virol* 54: 414-421

- PETERSON, E., SCHIMIDT, O.W., GOLDSTEIN, L.C., NOWINSKI, R.C., COREY, C. 1983. Typing of clinical Herpes simplex virus isolates with mouse monoclonal antibodies to Herpes Simplex virus types 1 and 2: Comparison with type-specific rabbit antisera and restriction endonuclease analysis of viral DNA. *J. Clin. Microbiol.* 17: 92-96.

- PIZENMASER, K., JUNG, H., STARZINSKI-POWITZ, A., ROLLINGHOFF, M., WAGNER, H. 1977. The role of T cells in anti-Herpes simplex virus immunity. I. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 119: 939-944.

- PIZER, L.I., COHEN, G.H., EISENBERG, R.J. 1980. Effect of tunicamycin on Herpes simplex virus glycoproteins and infectious virus production. *J. Virol.* 34: 142-153.

- PLAEGER - MARSHALL, S., SMITH, J.W. 1978. Inhibition of mitogen -and antigen- induced lymphocyte blastogenesis by Herpes simplex virus. *J. Infect Dis* 138: 506-511

- PLIKAYTIS, B.D., CARLONE, G.M., EDMONDS, P., MAYER, L.W. 1986. Robust estimation of standard curves for protein molecular weight and linear-duplex DNA base-pair number after gel electrophoresis. *Anal. Biochem* 152: 346-364.

- PONCE DE LEON, M., MESSLE, M., COHEN, G.H. 1973. Separation of Herpes simplex virus-induced antigens by Concanavalin A affinity chromatography. *J. Virol* 12: 766-774.

- POTTER, M. 1972. Immunoglobulin producing tumor and myeloma proteins of mice. *Physiol. Rev.* 52: 631-719.

- POWELL, K.L. y COURTNEY, R.J. 1975. Nonstructural proteins of Herpes simplex virus type 2 infected Hep 2 cells. *Virology* 66: 217-228.

- POWELL, K.L. y WATSON, D.M. 1975. Some structural antigens of Herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 29: 167-178.

- POWELL, K., PURSFUY, D. 1977. Nonstructural proteins of Herpes simplex virus I. Purification of the induced DNA polymerase. *J. Virol.* 24: 618-626.

- PRESTON, V.G., COATES, J.A.V., RIXON, F.J. 1983. Identification and characterization of a Herpes simplex virus gene product required for encapsidation of virus DNA. *J. Virol.* 45: 1056-1064.

- RABSON, A.R., WHITING, D.A., ANDERSON, R., GLOVER, A., KOORNHOF, H.J. 1977. Depressed neutrophil motility in patients with recurrent Herpes simplex virus infections: in vitro restoration with levamisole. J. Infect. Dis. 135: 113-116.

- RAHMAN, A.A., TESCUNER, M., SETHI, K.K., BRANOSS, H. (1976). Appearance of IgG (Fc) receptor on cultured human fibroblasts infected with human Cytomegalovirus. J. Immunol. 117: 253-258.

- RAPP, F., WIGDHAHL, B. Herpesvirus target considerations for the design of antiviral agents. In: De Clerq, E., WALKER, R.T. eds. Targets for the design of antiviral agents. New York. Plenum Press. 1984. pp. 29-60.

- RATTRAY, M.C., PETERMAN, G.M. ALTMAN, L.C., COREY, L., HOLMES, K.K. 1980. Lymphocyte - derived chemotactic factor synthesis in initial genital herpesvirus infection: correlation with lymphocyte transformation. Infect Immun. 30: 110-116.

- RAWLS, W.E., BALACHANDRAN, N., SISSON, G., WATSON, R.J. 1984. Localization of a type specific antigenic site on Herpes simplex virus type 2 glycoprotein D. J. Virol. 51: 263-265.

- REED, C.L., COHEN, G.H., RAPP, F. 1975. Detection of a virus specific antigen on the surface of Herpes simplex virus transformed cells. J. Virol. 15: 668-670.

- REICHMAN, R.C. Herpes simplex viruses. In: Textbook of human virology. Belshe, R.E. eds. Massachusetts. 1985. pp. 811-828.

- RICHMAN, D.D., BUCKMASTER, A., BELL, S., HODGMAN, C., MINSON, A.C. 1986. Identification of a new glycoprotein for Herpes simplex virus type 1 and genetic mapping of the gene that codes for it. J. Virol 57: 647-655.

- ROANE, P.R., ROIZMAN, B. 1964. Studies of the determinant antigens of viable cells. II. Demonstration of altered antigenic reactivity of Hep-2 cells infected with Herpes simplex virus. *Virology*. 22: 1-8.

- ROIZMAN, B., SPRING, S.B. Alteration in immunologic specificity of cells infected with cytolytic viruses. In J.J. Tcentin (ed). *Proceedings of the Conference on Gross Reacting Antigens and Neoantigens.* - The Williams and Williams G., Baltimore. 1967. pp. - 85-96.

- ROIZMAN, B., FURLONG, D. The replication of Herpes virus. In: Fraenkel-Courat, H., Wagners, R. R. eds. *Comprehensive virologic. Reproduction DNA animal viruses.* New York. Plenum Press. 1974. pp. 229-403.

- ROIZMAN, B. 1979. The structure and isomerization of Herpes simplex virus genome. *Cell* 16: 481-494.

- ROIZMAN, B. The family Herpesviridae. In: Fraenkel-Courat, Wagner, R.R. eds. *The Herpes viruses* New York. Plenum Press. 1982. pp. 1-23.

- ROIZMAN, B., NORRILD, B., CHAN, C., PEREIRA, L. - 1984. Identification and preliminary mapping with monoclonal antibodies of a Herpes simplex virus 2 glycoprotein lacking a known type 1 counterpart *Virology*, 133: 242-247.

- ROSS, C., GLORIOSO, J., SACKS, S., CAVERY, C., - RAWLS, W.E. 1985. Competitive inhibition by human sera of mouse monoclonal antibody binding to glycoproteins C and D of Herpes simplex virus types 1 - and 2. *J. Virol.* 54: 851-855.

- RUYECHAN, W.T., MORSE, L.S., KNIPE, M., ROIZMAN, B. 1979. Molecular genetics of Herpes simplex virus. II Mapping of the major viral glycoproteins and the genetic loci specifying the social behavior of infected cells. *J. Virol.* 29: 677-697.

- RUYECHAN, W.R., CHYTIL, A., FISHER, C.M. 1986. In vitro characterization of a thermolabile Herpes simplex virus DNA - binding protein. J. Virol. 59: 31-36.

- SAN MIGUEL, J.F., GONZALEZ, M., CABALLERO, M.D., HERNANDEZ, F. 1984. Anticuerpos monoclonales en Medicina. Medicine 60: 3814-3819.

- SARMIENTO, M., HARREY, M., SPEAR, P.G. 1979. Membrane proteins specified by Herpes simplex viruses. III Role of glycoprotein VP7 (B2) in virion infectivity. J. Virol. 29: 1149-1158.

- SEIGNEURIN, J.M. DESGRANGES, G., SEUGNEURIN, D. 1983. Herpes simplex virus glycoprotein D. Human monoclonal antibody produced by bone marrow cell line Science. 221: 173-175.

- SEKIZAWA, T., OPENSHAW, H., WOHLLENBER, G., NOTKINS, A.L. 1980. Latency of Herpes simplex virus in absence of neutralizing antibody: model of reactivation. Science. 210: 1026-1028.

- SETH, P., RAWLS, E. 1974. Antigenic differences between isolates of Herpes virus type 2. Intervirology 3: 1-14.

- SETHI, K.K., STROEHMANN, I., BRANDIS, H. 1980. Human T-cell cultures from virus-sensitized donors can mediate virus-specific and HLA-restricted cell lysis. Nature, 286: 718-720.

- SHELDRICK, P., BERTHELOT, N. Inverted repetitions in the chromosome of Herpes simplex virus. New York Acad. Press. 1973. pp. 1-25.

- SHERIDAN, J.F., BECK, M., AURELIAN, L., RADOWSKY, M. 1985. Immunity to Herpes simplex virus: virus reactivation modulates lymphokines activity. J. Infect. Dis. 152.

- SHILLITOE, E.J., WILTON, J.M.A., LEHNER, T. 1977. - Sequential changes in cell-mediated immune responses to Herpes simplex virus after recurrent herpetic infection in humans. Infect. Immun. 18: 130-137.

- SHORE, S.L., STEVENS, J.G., COOK, M.L. 1976. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity to target cells infected with type 1 and type 2 Herpes simplex viruses. J. Immunol. 116 : 194.

- SHOWALTER, S.D., ZWEIG, M., HAMPAR, B. 1981. Monoclonal antibodies to Herpes simplex virus type 1 proteins, including the immediate early protein ICP4. Infect. Immun. 34: 684-692.

- SMILEY, J.R., SWAN, H., PATER, M.M., PATER, A., HALPERN, M.E. 1983. Positive control of the Herpes simplex virus thymidine kinase gene requires upstream DNA sequences. J. Virol. 47: 301-310.

- SPEAR, P.G., ROIZMAN, B. 1972. Protein specified by Herpes simplex virus. V. Purification and structural proteins of the herpes virus. J. Virol. 9: 431-439

- SPEAR, P. 1976. Membrane Proteins Specified by Herpes simplex viruses: I. Identification of four glycoprotein precursors and their products in type 1 infected cell. J. Virol. 17: 991-1008.

- SPRING, S.B., ROIZMAN, B., SCHWARTZ, J. 1968. Herpes simplex virus products in productive and abortive infection. II Electron microscope and immunology evidence for failure of virus envelopment as of abortive infection. J. Virol. 2: 384-392.

- SRINIVAS, R.V., BALACHANDRAN, N., ALONSO-CAPLEN, F.V., COMPANS, R.W. 1986. Expression of Herpes simplex virus glycoproteins in polarized epithelial cells. J. Virol. 58: 689-693.

- STAHLI, C., STAEHELIN, T., MIGGIANO, V., SHMIDT, -
HARING, P. 1980. High frequency of antigen-specific hybridomas: dependence on immunization parameters and prediction by spleen cells analysis. *J. Immunol Methods*. 32: 297-304.

- STEVENS, J.G., COOK, M.L. 1974. Maintenance of latent herpetic infection and apparent role for antiviral IgG. *J. Immunol*. 113: 1685-1693.

- SUMMERS, W.P., WAGNER, M., SUMMERS, W.C. 1975. Possible peptide chain termination mutants in thymidine Kinase gene of a mammalian virus, Herpes simplex virus. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 72: 4081-4084.

- SWAIN, M.A., PEET, R.A., GALLOWAY, D.A. 1985. Characterization of the gene encoding Herpes simplex virus type 2 glycoprotein C and comparison with the type 1 counterpart. *J. Virol*. 53: 561-569.

- THONG, Y.H., VINCENT, M.M., HENSEN, S.A., FUCCILLO, D.A., ROLA-PLESZCZYNSKI, M., BELLANTI, J.A. 1975. Depressed specific cell mediated immunity to Herpes simplex virus type 1 in patients with recurrent herpes labialis. *Infect. Immun*. 12: 76-80.

- TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 76: 4350-4354.

- UCHIDA, N., SMILOWITZ, H., TANZER, M.L. 1979. Monovalent ionophores inhibit secretion of procollagen and fibronectin from cultured fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 76: 1868-1872.

- VAUGHAN, P.J., BANKS, L.M., PURIFOY, D.J.M., POWELL K.L. 1984. Interactions between Herpes simplex virus DNA binding proteins. *J. Gen. Virol*. 65: 2033-2041.

- VAUGHAN, P.J., PURIFOY, D.J.M., POWELL, K.L. 1985. DNA binding protein associated with Herpes simplex virus DNA polymerase. J. Virol. 53: 501-508.

- VOLPI, A., LAKEMAN, A.D., PEREIRA, L. 1983. Monoclonal antibodies for rapid diagnosis and typing of genital Herpes during pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 146: 813-815.

- WARNKE, R.A., GATTER, K.C., MASON, D.Y. 1983. Monoclonal antibodies as diagnostic reagents. En - THOMPSON, R.A., ROSE, N.R. (eds). Recent advances - in clinical immunology N^o 3 Edimburgh, Churchill, - Livingstone. 1983. pp. 163-186.

- WATKINS, J.F., 1964. Adsoption of sensitied sheep - erythrocytes to Hela cells infected with Herpes sim - plex virus. Nature. 202: 1364-1365.

- WATSON, D.H., SHEDOEN, W.I.H., TETSUKA, E.T., WIL-- DY, P., BOURGAUX-RAMOISY, D., GOLD, E. 1966. Virus specific antigens in mammalian cells infected with Herpes simplex virus. Immunology 11: 399-408.

- WEINBERG, M.A., PORTNOY, J.D., CLEENER, B., HUBSCH-- MAN, S., LEGACE-SIMARD, J., RABINOVITCH, N., REMER, Z., MENDELSON, J. 1985. Viral inhibition of lympho-- cyte proliferative responsiviness in patients suffe-- ring from recurrent lesions caused by Herpes sim-- plex virus. J. Infect. Dis. 152.

- WENSKE, E.A., BRATTON, M.V., COURTNEY, R.J. 1982. - Endo-B-N-acetylglucosaminidase senistivity of pre-- cursors to Herpes simplex virus type 1 glycopro-- teins gB and gC. J. Virol. 44: 241-248.

- WENSKE, E.A., COURTNEY, R.J. 1983. Glycosylation of Herpes simplex virus type 1 gG in the presence of - tunicamycin. J. Virol. 46: 241-248.

- WESTERWOUTD, R.J. 1985. Improved fusion methods IV Technical aspects. J. Immunol. Methods. 77: 181-196

- WESTMORELAND, D. 1978. Herpes simplex virus type-1 and human lymphocytes: virus expression and the response to infection of adult and foetal cells. J. Gen. Virol. 40: 559-575.

- WESTMORELAND, D. WATKINS, J.E. (1974). The IgG receptors induced by herpes simplex virus: studies using radioiodinated IgG. J. Gen. Virol. 24: 167-178.

- WILDY, P. 1985. Herpes viruses: a background. Br. Med. Bull. 41: 339-344.

- WINKTOR, T.J., KOPROWSKI, H. 1978. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization detection of antigenic variants. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 3938-3943.

- WOOD, J.N., HUDSON, L., JESSELL, T.M. (1982). A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and Trypanosoma cruzi parasites. Nature. 296: 34-38

- YASUDA, J. y MILGROM, F. (1968). Hemadsorption by Herpes simplex infected cell cultures. Int. Arch. Allergy 33: 151-170.

- YEDWELL, J.W., WEBSTER, R.G., GERHARD, W.V. 1979. Antigenic variation in three distinct determinants of and Influenza type A haemagglutinin molecule. Nature 279: 246-250.

- ZAWATZKY, R., HILFENHAUS, J., MARCUCCI, F., KIRCHNER, H. 1981. Experimental infection of inbred mice with Herpes simplex virus type 1. Investigation of humoral and cellular immunity and of interferon induction. J. Gen. Virol. 53: 31-38.

- ZEZULAK, K.M., SPEAR, P.G. 1983. Characterization of Herpes simplex virus type 2 75.000 molecular weight glycoprotein antigenically related to Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C. J. Virol. 47: 553-562.

- ZEZULAK, K.M., SPEAR, P.G. 1984. Mapping of the structural gene for the Herpes simplex virus type 2 counterpart of Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C and identification of a type 2 mutant which does not express this glycoprotein. J. Virol. 49: 741-747.

- ZIEGLER, T., HUKKNEN, V., ARSTILA, P., AUVINEN, P., JALAVA, A., HYYPIA, T. 1985. Typing of Herpes simplex virus isolates with monoclonal antibodies and by nucleic acid spot hybridization. J. Virol. Methods. 12: 169-177.

- ZISMAN, B., HIRSCH, M.S., ALLISON, A.C. 1970. Selective effects of anti-macrophage serum of Herpes virus infection of young adult mice. J. Immunol. 104: 1155-1119.

- ZWEIG, M., HEILMAN, C.J., RABIN, H., HAMPAR, B. 1980. Shared antigenic determinants between two distinct classes of proteins in cells infected with Herpes simplex virus. J. Virol. 35: 644-652.

- ZWEIG, M., SHOWALTER, S.D., SIMMS, D.J., HAMPAR, B. 1984. Antibodies to a synthetic oligopeptide that react with Herpes simplex virus type 1 and 2 glycoprotein C. J. Virol. 51: 430-436.