

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA POBLACIONAL
DEL HERPES SIMPLEX VIRUS TIPO1

NACARÍ JARAMILLO DONIUSH

Madrid, 2010.

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA,
SALUD PÚBLICA Y MICROBIOLOGÍA**

**FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA POBLACIONAL
DEL HERPES SIMPLEX VIRUS TIPO1**

Memoria de la Tesis para optar al grado de Doctor en Microbiología presentada por:

NACARÍ JARAMILLO DONIUSH

Directores de Tesis:

IGNACIO GADEA GIRONÉS

Profesor Asociado del Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

ENRIQUE TABARÉS LÓPEZ

Catedrático de Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

Este trabajo ha sido financiado en parte por Proyecto de investigación en tecnologías y ciencias de la salud de la Comunidad de Madrid. Nº GR/SAL/0413/2004.

Título: Estudio de la variabilidad poblacional y existencia de cuasiespecies en el virus Herpes simplex tipo 1.

A mis abuelos

A Jochen

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores los Doctores Enrique Tabarés López e Ignacio Gadea Gironés.

A Enrique por abrimme las puertas de su laboratorio y permitirme trabajar dentro de su equipo de investigadores, por los invaluable conocimientos y experiencia que ha sabido transmitirme.

A Ignacio por la confianza que depositó en mí al permitirme llevar a cabo este estudio. Por todo su tiempo y dedicación durante las interminables revisiones, sin las cuales no hubiera sido posible la elaboración de este trabajo.

A las sugerencias metodológicas del Doctor Esteban Domingo quien aportó recomendaciones sobre su redacción.

A los amigos y compañeros del Departamento siempre dispuestos a cooperar, Bea, Alejita, Silvia, Adriana, Juanjo, la recordada Sole, a la Doctora María de Jesús, a Carmen M y Carmen N, a Milagros y Marigel, todos maestros del trabajo bien hecho sin dejar de mantener día a día una atmosfera de camaradería, alegre, distendida y de bullicioso trabajo, con mayor énfasis quiero agradecer a Anita su amistad, comprensión y colaboración incondicional.

También agradezco al Doctor Juan Antonio Vargas y a su excelente equipo de trabajo, que me recibió con los brazos abiertos y cuya desinteresada colaboración fue decisiva para el desarrollo de la etapa de Suficiencia Investigadora en mis estudios de Doctorado.

A todas las personas que he conocido durante mis estudios y que han formado parte de mis vivencias, han enriquecido mi vida y me han enseñado a apreciar la diversidad encantadora de este gran país.

Un reconocimiento a aquellos Docentes de la Universidad de Panamá que con su dedicada labor han servido de ejemplo y guía para mi superación profesional, en especial a las Doctoras Nora de Moreno y Argentina Ying que despertaron en mi un creciente interés por el estudio de la Microbiología y que constantemente me han alentado en la culminación de este proyecto.

A los Profesores del Departamento de Enfermedades Transmisibles y Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria que me brindaron su apoyo incondicional en especial al Dr. Rolando Jaramillo Vásquez y José Eduardo Calzada.

A mi querida familia, a mis padres, a mis hermanos y sobrinos, a Jochen, que siempre han estado presente.



John Tenniel

*"Now, here, you see, it takes all the running you can do to keep in the same place"
Through the looking glass and what Alice found there
Lewis Carroll*

RESUMEN

RESUMEN

La variabilidad genética del virus herpes simplex tipo 1 se ha estudiado mediante la aplicación de un cuello de botella genético consistente en la obtención de clones víricos a través de diez pases sucesivos en placa de 23 clones procedentes de una población representada por la cepa de referencia F. Tras la realización de los pases sucesivos pudimos observar que dos clones, de un total de veintitrés, no fueron capaces de alcanzar el último pase en placa en células 143tk⁻. Estos clones al ser inoculados en condiciones iguales en una línea celular diferente (células Vero) demuestran un notable incremento en su capacidad de producir infección. En el presente estudio investigamos los posibles cambios en la secuencia de varios genes comparando los “clones parentales” o clones 1, con los “clones transferidos” o clones 10, así como el estudio de las posibles modificaciones en la neurovirulencia de los clones transferidos en un modelo animal en ratón. No se encontró ningún cambio en las secuencias de la región Exo III de la DNA polimerasa entre ambas poblaciones. Con respecto a los genes de la glicoproteína gD y la timidina kinasa, se detectaron cambios en las secuencias en clones virales, pertenecientes a los clones transferidos, con respecto a los clones parentales. Asimismo, los clones transferidos de las series que no mantuvieron su viabilidad hasta el décimo pase mostraron una neurovirulencia disminuida con respecto a los clones finales de otras series y con respecto a la población original.

ABSTRACT

ABSTRACT

Genetic variability of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) has been studied by subjecting 23 biological clones of the virus to 10 plaque-to-plaque transfer, followed by sequence analysis of three genomic regions belonging to DNA polymerase, thymidine kinase and glycoprotein gD genes. Two out of a total of twenty three clones did not survive to the last transfer. Several nucleotide substitutions were detected in the TK and gD genes, but not in the DNA polymerase gene. Assuming a uniform distribution of mutations along the genome, the average rate of fixation of mutations was of 1.64×10^{-5} per nucleotide and transfer, or 1.08 mutations per viral genome and transfer, a value which is 10-fold lower than that obtained for some RNA viruses. The biological behaviour of clones subjected to plaque to plaque transfers was studied using a mice model for HSV-1 neurovirulence. Four bottlenecked populations had lost neurovirulence for mice, as compared with the corresponding initial clones. One of the clones that did not survive the total ten plaque-to-plaque passages, displayed a 30 -fold lower mouse neurovirulence than the parental strain. These results equate HSV-1 with highly variable RNA viruses regarding the accumulation of mutations and the biological effects of bottleneck passages. Implications for the evolution of complex DNA viruses are discussed.

INDICE

1. Introducción	1
1.1. Herpes Simplex Virus	1
1.1.1. Características y clasificación	1
1.1.2. Estructura y genoma viral.....	2
1.2. Variabilidad Genética de los Microorganismos	3
1.2.1. Importancia práctica y evolutiva	3
1.2.2. Mutaciones espontáneas en los microorganismos.....	4
1.2.3. Teoría de las cuasiespecies.....	5
1.2.4. Trinquete de Müller.....	5
1.2.5. Variabilidad en el HSV	7
1.3. Estudio Genético	11
1.3.1. Región Exo III de la DNA Polimerasa	11
1.3.1.1. Mecanismos y factores que contribuyen a la fidelidad durante la replicación del DNA	11
1.3.1.2. Polimerasas de DNA y actividad exonucleasa.....	12
1.3.1.3. Actividad exonucleasa en HSV-1.....	12
1.3.2. Gen de la Glicoproteína D	16
1.3.2.1. Características y estructura	16
1.3.2.2. Actividad biológica	18
1.3.2.2.1. Restricción o interferencia de la superinfección.....	20
1.3.2.2.2. Actividad fusogénica.....	20
1.3.2.2.3. Bloqueo de la apoptosis	20
1.3.2.3 Receptores celulares	21
1.3.3. Gen de la Timidina Kinasa	21
1.3.3.1. Actividad biológica y características.....	21
1.3.3.2. Centro activo.....	22

1.3.3.3. Variantes de TK en HSV	23
2. Hipótesis y Objetivos	24
2.1. Hipótesis	24
2.2. Objetivos	24
2.2.1. Objetivo general	24
2.2.2. Objetivos específicos	25
3. Materiales y Métodos	26
3.1. Reactivos	26
3.2. Líneas Celulares y Cultivo	27
3.3. Cepa Viral	27
3.4. Pases Sucesivos para la Obtención de las Poblaciones Víricas.....	27
3.4.1. Definición de las poblaciones virales del estudio.....	27
3.4.2. Pases sucesivos en células 143tk ⁻	28
3.4.3. Titulación de los clones obtenidos en los pases sucesivo.....	30
3.4.3.1. Estudio estadístico.....	31
3.4.4. Controles	31
3.4.4.1. Control de células.....	31
3.4.4.2. Control positivo	32
3.5. Aislamiento de DNA.....	33
3.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	34
3.6.1. Región Exo III de la DNA polimerasa.....	34
3.6.1.1. Iniciadores.....	34
3.6.1.2. Programa para la amplificación	35
3.6.1.3. Determinación de la concentración óptima de Mg	35
3.6.2. Gen de la glicoproteína D.....	36
3.6.2.1. Iniciadores.....	36
3.6.2.2. Programa para la amplificación	36

3.6.2.3. Determinación de la concentración óptima de Mg	36
3.6.3. Gen de la timidina kinasa	37
3.6.3.1. Iniciadores.....	37
3.6.3.2. Programa para la amplificación	38
3.6.3.3. Determinación de la concentración óptima de Mg	38
3.6.4. Reamplificación	38
3.7. Purificación de los Productos de la Amplificación	39
3.8. Secuenciación y Análisis de DNA	40
3.9. Estudio de la Neurovirulencia en el Modelo Murino.....	40
3.9.1. Titulación de los Clones	40
3.9.2. Ensayo Biológico	40
4. Resultados.....	42
4.1. Resultados de la Clonación	42
4.1.1. Poblaciones del estudio	42
4.2. Caracterización de la Actividad Biológica de los Clones en Cultivos Celulares.....	43
4.2.1. Series clonales en que no se detectan cambios durante el proceso de pases sucesivos	45
4.2.2. Series clonales en que se detecta disminución en su capacidad de infectar células 143tk ⁻	45
4.2.3. Serie clonal donde se detecta incremento en su capacidad de infectar células.....	45
4.2.4. Inoculación de clones en células 143 tk ⁻ y células Vero	45
4.2.5. Comprobación del efecto del agar en la pérdida de la infectividad de los clones en cultivos celulares	49
4.3. Resultados de la Amplificación.....	50
4.3.1. Región Exo III de la DNA polimerasa.....	50
4.3.2. Gen de la glicoproteína D.....	51

4.3.3. Gen de la Timidina kinasa.....	52
4.4. Resultados de la Secuenciación	53
4.4.1. Análisis de las secuencias obtenidas.....	53
4.4.2. Frecuencias y Tasas de Mutaciones espontáneas obtenidas	54
4.5. Actividad Biológica de los Clones en Cultivos Celulares	55
4.6. Ensayo Biológico	58
4.6.1. Determinación de la neurovirulencia en el modelo murino	58
5. Discusión.....	60
5.1. Aplicación del Cuello de Botella	
Genético a una Población de HSV-1	60
5.2. Variabilidad en las Características	
de los Focos de Infección de los Clones.....	61
5.3. Variaciones en la Capacidad de Infectar Células	64
5.4. Desarrollo de Infección en Diferentes Líneas Celulares	
de las Series Clonales en que Disminuyó la Infectividad.....	66
5.5. Mutaciones	69
5.5.1. Región Exo III de la DNA polimerasa	71
5.5.2. Gen de la glicoproteína D	73
5.5.3. Gen de la timidina kinasa	76
5.6. Efecto de la Aplicación del Cuello de Botella	
Sobre la Neurovirulencia en el Modelo Murino	80
5.7. Consideraciones Finales	82
6. Conclusiones.....	85
7. Bibliografía.....	87

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1	Estructura y genoma de HSV.....	2
Figura 2	Secuencia que codifica para la Polimerasa de DNA del HSV-1 en relación con los segmentos Exo motifs	13
Figura 3	Secuencias homologas de la Exo III motif que son comunes entre diversas polimerasas.....	15
Figura 4	Modelo de la estructura de la gD que muestra las cuatro regiones funcionales.....	17
Figura 5	Serie de interacciones que se suceden entre la envoltura viral y la membrana celular durante la entrada del HSV-1 a la célula	19
Figura 6	Micro platos de poliestireno con fondo plano de 6 pozos de 35mm de diámetro. Utilizados para la obtención de los clones virales a partir del crecimiento de focos aislados.....	28
Figura 7	Mono capa de Células 143 tk ⁻ al 50% de confluencia.....	29
Figura 8	Efecto cito pático producido por el HSV-1 a las 48 h.....	30
Figura 9	Control negativo de células 48h (10x).....	32
Figura 10	Control negativo de células 48h (20x).....	32
Figura 11	Control negativo de células 72h (10x).....	32
Figura 12	Control negativo de células 72h (20x).....	32
Figura 13	Control positivo de células 24 h (10x).....	33
Figura 14	Control positivo de células 24 h (20x).....	33

Figura 15	Fragmento amplificado de la región Exo III del gen de la DNA polimerasa e iniciadores empleados.....	34
Figura 16	Electroforesis de la curva de Magnesio para la amplificación del segmento Exo III de la DNA pol.....	35
Figura 17	Fragmento amplificado del gen de la glicoproteína gD e iniciadores empleados: gD11 y gD12.....	36
Figura 18	Electroforesis de la curva de Mg para la amplificación del segmento de la gD.....	37
Figura 19	Fragmento amplificado del gen de la TK e iniciadores : HTK6D y HTK6R. Se aprecia la secuencia del sitio activo	37
Figura 20	Electroforesis de la curva de Mg para la amplificación de la Timidina kinasa	38
Figura 21	Purificación de los productos de la amplificación previo a la secuenciación	39
Figura 22	Diagrama de los clones víricos obtenidos.....	42
Figura 23	Análisis estadístico de la evolución del título viral de todas las series durante el proceso de clonación.....	44
Figura 24	Denominación asignada a los clones durante el ensayo de pases en dos líneas celulares simultáneamente 143tk- y Vero.....	46
Figura 25	Comparación entre focos de infección producidos por virus clonales de la serie N.....	47
Figura 26	Comparación entre focos de infección producidos por virus clonales de la serie M.....	48
Figura 27	Electroforesis de los resultados de amplificación, reamplificación y purificación para la región Exo III de la DNA polimerasa.....	50

Figura 28	Electroforesis de los resultados de la amplificación, reamplificación y purificación para el gen de la gD.....	51
Figura 29	Electroforesis de los resultados de la amplificación, reamplificación y purificación para el gen de la timidina kinasa.....	52
Figura 30	Diferencias en el crecimiento de cuatro clones finales comparados con la cepa F o población original durante la titulación en células Vero.....	57
Figura 31	Diagrama comparativo de la secuencia amplificada para la región Exo III de la DNA polimerasa entre las correspondientes secuencias de cepas publicadas y los clones estudiados.....	72
Figura 32	Diagrama comparativo de la secuencia amplificada para el gen de la gD entre las correspondientes secuencias de cepas publicadas y los clones estudiados.....	74
Figura 33	Diagrama comparativo de la secuencia amplificada para el gen timidina kinasa entre las correspondientes secuencias de cepas publicadas y los clones estudiados.....	79

TABLAS

Tabla 1	Tasas de las Mutaciones espontáneas en microorganismos con genomas de distinto tamaño.....	4
Tabla 2	Resultados de la Inoculación de clones en dos líneas celulares sin adición de agar.....	49
Tabla 3	Caracterización de las variaciones encontradas en la región de los genes estudiados.....	53
Tabla 4	Frecuencia de Mutaciones obtenidas.....	55
Tabla 5	Resultados de la titulación por el método de dosis infecciosa 50 en cultivos de tejido de clones finales o transferidos.....	56
Tabla 6	Resultados del ensayo biológico en ratones CD1.....	58
Tabla 7	Tasas de acumulación de mutaciones en diferentes genomas víricos sometidos a pases sucesivos.....	70

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. HERPES SIMPLEX VIRUS

1.1.1. Características y clasificación.

El herpes simplex virus (HSV) humano ejemplifica uno de los microorganismos patógenos más exitosos conocidos, ha desarrollado mecanismos altamente sofisticados que lo capacitan para mantenerse infectando a su hospedador durante todo lo largo de su vida (Ward y Roizman, 1994), esto puede lograrlo mediante uno de los aspectos más fascinantes de su biología, su capacidad de establecer un estado de latencia en la neurona (Weir, 2001).

Las infecciones por este agente se describen entre las más frecuentes en los humanos. Se han identificado dos tipos del virus: el tipo 1 que usualmente causa enfermedad oro labial y el tipo 2 que ha sido asociado más frecuentemente con infecciones genitales y neonatales. Generalmente, el virus causa enfermedad banal, que es controlada por el hospedador; sin embargo, en ocasiones la enfermedad puede ser grave, como en el caso de neonatos, con afectación del sistema nervioso central, y en los pacientes inmunocomprometidos, en los cuales es causa importante de morbilidad (Whitley, 2002). Se conoce que el microorganismo se distribuye mundialmente, no presenta variación estacionaria y, salvo condiciones experimentales, sólo infecta a la especie humana. La infección productiva se caracteriza por la formación de lesiones vesiculares en el epitelio mucoso, seguido de la invasión del virus a las neuronas sensoriales, con el establecimiento de la infección latente, que puede durar toda la vida. La reactivación del virus latente tiene como resultado la recurrencia en la presentación de lesiones, generalmente adyacentes al sitio donde se verificó la infección primaria (Whitley y Roizman, 2001).

El Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV) le da su denominación formal como *herpes virus humano 1* (*human herpes virus 1*), cuyo acrónimo corresponde a HHV-1, y lo ubica como especie en la clasificación dentro del

género *Simplexvirus* de la subfamilia de los *Alphaherpesvirinae*, familia *Herpesviridae*. (ICTVdB, 2006).

1.1.2. Estructura y genoma viral.

La partícula viral madura tiene un diámetro de entre 150-200 nm y está conformada por las siguientes estructuras: el core, que contienen el DNA vírico, es una cápside de simetría cúbica icosaédrica; por fuera de la cápside se encuentra una capa de proteínas virales denominada tegumento y una unidad de membrana (doble capa lipídica) como envoltura, en la que se encuentra glicoproteína víricas formando espículas (Taylor et al., 2002) (Figura 1).

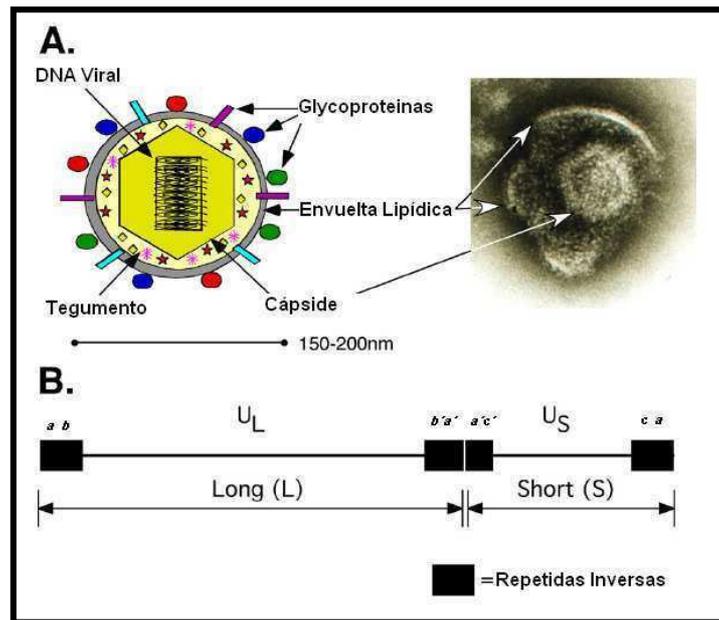


Figura 1. Estructura y genoma de HSV. Adaptado de Taylor et al., 2002.

El virión del HSV (A) está compuesto por: (1) cadena doble de DNA estrechamente empaquetada; (2) Cápside de simetría cúbica; (3) una capa de proteínas virales denominada tegumento; (4) la envoltura compuesta por una membrana lipídica de la cual sobresalen glicoproteínas virales. Los cuales se observan en el diagrama y en la microfotografía electrónica en la parte superior izquierda y derecha respectivamente. El genoma del HSV (B) se organiza en dos componentes "long" (L), largo y "short" (S), corto. Cada componente contiene una región única (U) flanqueadas por regiones repetitivas inversas (ab, b'a'; a'c'; ca), ambas se unen para generar un genoma total de aproximadamente 150 000 pares de bases.

Los estudios a nivel genético y molecular del virus muestran que su genoma consiste en una doble cadena de DNA de 150 kb con estructura lineal, que contiene dos segmentos unidos de manera covalente designados como segmento largo (L) y segmento corto (S). Cada segmento contiene una secuencia única que se encuentra flanqueada por pares de secuencias repetidas inversas. La secuencia completa del HSV-1 cepa 17 consta de 152 260 pares de bases, cuyo contenido de guanina y citosina se considera alto y corresponde al 68.3% en G + C (McGeoch et al., 1985; 1988).

Se ha determinado que las regiones repetidas inversas internas del virus que se encuentran flanqueando los componentes L y S no poseen una función fisiológica específica, o que, en cualquier caso, sus funciones pueden ser satisfechas en otras formas dentro del genoma de HSV-1. Este hecho fue demostrado a través del desarrollo de un virus recombinante denominado [HSV-1F (I358)] al cual, le fueron suprimidas las regiones repetidas inversas internas, manteniéndose viable sin mostrar pérdida en su capacidad replicativa (Poffenberger et al., 1983).

Después de haber sido conocida la estructura genética de este virus, HHV ha sido objeto de modificaciones por ingeniería genética para su uso en el desarrollo de vacunas y de terapia génica (Ward y Roizman, 1994; Whitley y Roizman, 2001).

1.2. VARIABILIDAD GENÉTICA DE LOS MICROORGANISMOS.

1.2.1. Importancia práctica y evolutiva.

El polimorfismo genético, tanto del hospedador humano como del microorganismo, determinan que se produzca o no la enfermedad luego de un encuentro entre ambos, así como también la severidad de la misma (Terhune et al., 1998). La diversidad genética es una de las más importantes características de los organismos vivos y se considera una de las bases de la evolución. En los últimos años las técnicas de biología molecular han permitido el estudio genético detallado de muchos aislados víricos así como, de cepas de referencia. Ello trajo consigo la observación de una alta heterogeneidad genética entre las poblaciones de virus RNA, las cuales han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista genético poblacional. Por otro lado el

desarrollo de dichas técnicas también ha traído consigo gran interés en cuanto a la diversidad genética poblacional en los virus de DNA (Rojas et al., 1993).

1.2.2. Mutaciones espontáneas en los microorganismos.

En 1969 Drake plantea que la tasa de mutaciones espontáneas en una especie consiste en el cálculo del promedio de muchas tasas en diferentes sitios del genoma y debe reflejar todos los cambios hallados en las secuencias de DNA de los sitios estudiados, según Drake la tasa resulta muy representativa para realizar comparaciones entre especies. Drake hace una clara diferenciación en las tres formas en que puede expresarse la tasa de mutaciones espontáneas: por pares de base por replicación; por pares de bases por genoma y la tasa total; también planteó que la tasa de mutaciones espontáneas por pares de bases es inversamente proporcional al tamaño del genoma indicando así que a menor tamaño del genoma mayor tasa de mutación. Esto sugiere entonces, que la disminución en la tasa de mutación en organismos más complejos puede estar regulada por mecanismos que disminuyan la tasa de errores y una creciente sofisticación en los sistemas de reparación (Drake, 1969). Se observan en la **Tabla 1** tasas de mutación para microorganismos con tamaños de genomas distintos (Drake, 1991).

Organism	Genome size, bp	Target	Mutation rate	
			Per bp (μ_{bp})	Per genome (μ_g)
Bacteriophage M13	6.41×10^3	<i>lacZa</i>	7.2×10^{-7}	0.0046
Bacteriophage λ	4.85×10^4	<i>cI</i>	7.7×10^{-8}	0.0038
Bacteriophage T2	1.60×10^5	<i>rII</i>	2.7×10^{-8}	0.0043
Bacteriophage T4	1.66×10^5	<i>rII</i>	2.0×10^{-8}	0.0033
<i>E. coli</i>	4.70×10^6	<i>lacI</i>	4.1×10^{-10}	0.0019
			6.9×10^{-10}	0.0033
<i>S. cerevisiae</i>	1.38×10^7	<i>hisGDCBHAFE</i>	5.1×10^{-10}	0.0024
		<i>URA3</i>	2.8×10^{-10}	0.0038
		<i>SUP4</i>	(7.9×10^{-9})	(0.11)
		<i>CAN1</i>	1.7×10^{-10}	0.0024
<i>N. crassa</i>	4.19×10^7	<i>ad-JAB</i>	4.5×10^{-11}	0.0019
		<i>mtr</i>	(4.6×10^{-10})	(0.019)
			1.0×10^{-10}	0.0042
		Median excluding outliers		0.0033
		Arithmetic mean excluding outliers		0.0033
		Geometric mean excluding outliers		0.0031

Tabla 1. Tasas de las Mutaciones espontáneas en microorganismos con tamaños de genomas distintos. Tomado de Drake, J. W. 1991

1.2.3. Teoría de las cuasiespecies

Las cuasiespecies son distribuciones dinámicas y complejas de replicones los cuales no son idénticos aunque están muy relacionadas entre sí. Existen diferencias importantes entre el concepto teórico de *cuasiespecies* formulado originalmente por Eigen y colaboradores y las *cuasiespecies* virales reales. Una de las diferencias más significativas consiste en que un estado de equilibrio constante en la distribución de los genomas es muy difícil de lograr en una población viral que infecta a un organismo complejo o inclusive un cultivo celular. Este estado de equilibrio se encuentra perturbado por constantes cambios en el micro ambiente del organismo infectado donde tiene lugar la replicación viral, así como de las fluctuaciones en el número de la población viral. A pesar de estas diferencias, el enfoque de los virus como poblaciones de distribución dinámica y compleja en el cual cada genoma individualmente sólo cuenta con una existencia fugaz, ha sido de gran utilidad para el entendimiento del comportamiento viral en los organismos infectados (Domingo y Holland, 1997).

1.2.4. Trinquete de Müller

El Trinquete de Müller se considera un concepto de gran importancia en el estudio de la genética poblacional. Predice que en una pequeña población de microorganismos asexuales la ausencia de recombinación unida a una alta tasa de mutación producirá, eventualmente, una catástrofe genética debido a la acumulación irreversible de mutaciones deletéreas. Por el contrario la recombinación sexual actuaría reparando el daño genético de tal manera que se podría detener o revertir el efecto deletéreo de tales mutaciones (Müller, 1964; Duarte et al, 1992; Yuste et al., 1999).

Pruebas realizadas para verificar esta hipótesis, hechas en modelos de simulación computarizados, sustentan el mecanismo de trinquete formulado por Müller (Felsenstein, 1974).

Uno de los primeros estudios realizados para comprobar la operación del mecanismo de trinquete de Müller en una población viral lo realiza Chao con el bacteriófago $\phi 6$. Su modelo experimental consistió en la aplicación del cuello de

botella genético a 20 “clones parentales” originados a partir del mismo bacteriófago, cada uno de los clones constituyó una serie clonal la cual sufrió 40 ciclos de crecimiento lo que dio origen a una población final denominada por Chao como “clones transferidos”. Al comparar ambas poblaciones en su *fitness* (capacidad de producir progenie infecciosa), la población final mostró una disminución significativa (Chao, 1990).

Se considera que el mecanismo del trinquete podría tener significativas implicaciones en cuanto a variabilidad en la severidad de la enfermedad en el curso de brotes epidémicos virales. Eventos del tipo cuello de botella genético ocurren, muy probablemente, durante el ciclo vital de los virus con diferentes intensidades. Algunos ejemplos son la transmisión vía aerosol desde un hospedador infectado a un hospedador susceptible, la activación de una célula que albergue a un provirus u otra forma en estado de reposo de un genoma viral latente o las transiciones cíclicas entre hospedadores mamíferos y artrópodos durante los ciclos de los arbovirus (Domingo y Holland, 1997).

En condiciones de laboratorio la transferencia viral a través de pases seriados de focos aislados excluye la posibilidad de optimización competitiva de las cuasiespecies. Este diseño experimental resulta en la acentuación del efecto deletéreo del trinquete de Müller.

En los virus RNA los eventos del tipo cuello de botella genético repetidos, semejantes a los pases sucesivos, se espera que causen una desviación progresiva de la secuencia consenso original o inicial, lo cual es debido a su estructura poblacional de *cuasiespecies* (Domingo et. al., 1996).

En el presente estudio se aplicó el cuello de botella genético al HSV-1, como ejemplo de virus DNA, de manera similar al modelo experimental de Chao (1990). Se practicaron pases sucesivos a 23 clones originados a partir de la Cepa F del HSV-1 éstos constituyeron los “clones parentales”. Cada clon padre da origen a una serie clonal, la cual luego de 10 ciclos de crecimiento dio origen a los “clones transferidos”.

1.2.5. Variabilidad en el HSV.

Se ha demostrado que una misma cepa de HSV presenta diferencias en su patogenicidad en distintas cepas de ratones, los cuales mostraron diferente susceptibilidad al virus luego de la inoculación intraperitoneal (López, 1975).

Diversos estudios sugieren que el polimorfismo que existe entre las poblaciones de HSV-1 se observa a nivel de ciertas propiedades biológicas tales como: neurovirulencia, habilidad de establecer y recuperarse del estado de latencia, o la habilidad de establecer una respuesta inmune en el hospedador. Sin embargo, estos aspectos han sido muy poco estudiados de una manera sistemática. Por otro lado, se ha prestado muy poca atención al estudio del polimorfismo interno del HSV-1 a nivel de poblaciones individuales, y al problema de la estructura genética de las poblaciones virales y su evolución en condiciones particulares de presión selectiva. Lo cual es una cuestión importante, tanto desde el punto de vista teórico, como por sus implicaciones prácticas y clínicas, debido a que el HSV-1 es capaz de infectar más de un tipo celular en el organismo y, al parecer, es muy probable que surjan diferentes variantes virales en el curso de una infección (Epstein et al., 1990).

Se ha logrado documentar que cepas de HSV-1 no relacionadas epidemiológicamente poseen polimorfismo en sus patrones de enzimas de restricción (Hayward et al., 1975). Entre los primeros estudios que describen la presentación de cambios en una población de HSV y la aparición de variantes virales se encuentran los reportados por Hoggan y Roizman en 1959, ellos encontraron que luego de realizar pases continuos del virus en células FC emergió una variante viral que se caracterizaba por la producción de gran cantidad de células gigantes multinucleadas.

A este respecto, algunos investigadores observaron que la mayoría de los cultivos de virus herpes simplex se componen de poblaciones virales capaces de producir dos o tres tipos de efectos citopáticos distintos, lo cual los llevó a suponer que los cambios observados podrían ser el resultado de un proceso de selección dentro de la población (Gray et al., 1958; Scott y McLeod, 1959; Scott et al., 1961).

Posteriormente se comunica la aparición de una variante viral que surge a partir de un cultivo persistente del virus, esta variante presenta cambios bien definidos en

características tales como: su neutralización frente a antisueros y su capacidad de inmunizar ratones. Los investigadores atribuyen estos cambios a un proceso de selección verificado dentro de la población viral originalmente introducida en los cultivos del cual surge una de las variantes (Hinze y Walker, 1961).

Basados en todas estas observaciones, Ejercito y colaboradores llevan a cabo un estudio que involucra un número de 33 diferentes cepas y aislados de pacientes provenientes de diversos laboratorios, con el fin de caracterizarlas según su efecto en el comportamiento social de las células infectadas, agruparlas según sus semejanzas y escoger un prototipo de cada grupo para compararlas con otros parámetros. Los aislados virales y cepas estudiadas fueron segregadas en los siguientes cuatro grupos: (1) cepas que causan un redondeamiento de las células mas no adhesión ni fusión, (2) cepas que causan agregados de células redondeadas, (3) cepas que causan una adhesión muy marcada de células infectadas y redondeadas, y (4) cepas que causan policariocitosis. Al comparar las alteraciones que se presentaban en el comportamiento social de las células infectadas encontraron que coincidían invariablemente con el cambio en otros parámetros relacionados con las propiedades en la superficie de virus, como lo son la antigenicidad y la densidad de flotación (Ejercito et al., 1968).

Estas variaciones en el virus pueden atribuirse a cambios en la estructura de la envoltura del virión. Se ha descrito que la partícula viral obtiene los antígenos virales, así como, sus determinantes antigénicos directamente de la célula infectada durante su egreso de la misma (Epstein, 1962).

En 1970 Terni y Roizman comunican el aislamiento de dos variantes de herpes simplex en lesiones recurrentes y simultáneas en labio y muslo de un mismo paciente, estas variantes aisladas mostraron diferencias en cuanto a su especificidad inmunológica, su habilidad para multiplicarse en células HEp-2 y en su efecto en el comportamiento social de las células infectadas, o dicho en otras palabras, su efecto citopático. Al comparar la variante aislada de la lesión recurrente en muslo de este paciente, con el aislamiento de otro paciente proveniente también de una lesión recurrente localizada en la misma zona anatómica, los investigadores determinan que ambos aislados mostraron características similares, lo cual los llevó a pensar que muy

probablemente, en el transcurso de numerosas erupciones, surgió una variante que resultó ser la mejor adaptada para sobrevivir en las condiciones fisiológicas que brindan los tejidos en dicha región anatómica (Terni y Roizman, 1970).

Por otra parte, Cassai y colaboradores publica la selección de dos variantes a partir de un cultivo de herpes simplex virus tipo 1, estas variantes resultaron significativamente diferentes, tanto en sus características biológicas, como bioquímicas (Cassai et al., 1975).

Más tarde, en base a importantes diferencias halladas en la virulencia del HSV, se realiza una categorización de las variantes observadas de la siguiente forma: (i) variantes entre tipos (intertípica), (ii) variantes entre cepas dentro de un tipo (intercepa) y (iii) variantes dentro de una misma cepa (intracepa) (Dix, et al., 1983).

Rojas y colaboradores estudiaron la diversidad genética de los virus HSV-1 y HSV-2, mediante el análisis del genoma de aislados víricos con endonucleasas de restricción, encontrándose que el HSV-1 presenta mayor heterogeneidad genética que el HSV-2 (Rojas et al., 1993). Posteriormente, otro estudio al respecto donde se aplica por primera vez el *Rnase A mismatch cleavage method* en una población de virus de DNA confirma los resultados obtenidos por Rojas en 1993, ya que se observa que el gen de la timidina kinasa resulta más heterogéneo que el de la glicoproteína B para ambos subtipos del HSV y que HSV-1 es más heterogéneo que HSV-2 en ambos genes. Además, el estudio encuentra estabilidad genética en la distribución grupal en una parte de la población viral estudiada, para ambos genes. Sin embargo, para otra parte de la población se observaron dramáticos cambios en su distribución, lo cual, según consideraciones de los investigadores, podría ser el resultado de eventos de recombinación en la población viral o la fijación de mutaciones promovidas por diferencias en los factores de presión selectiva (Rojas et al., 1995a).

Aplicando la misma técnica en el análisis genético de los aislados de lesiones recurrentes de HSV-1 fueron detectadas ligeras diferencias dentro de los patrones de la glicoproteína B entre las muestras originales y las de las sucesivas reactivaciones, lo cual sugiere una heterogeneidad genética entre la población de HSV-1 que se encuentra en estado de latencia (Rojas et al., 1995b).

En la experimentación con modelos animales se comunican interesantes resultados en cuanto a la presencia de heterogeneidad dentro de una población de HSV-1 en términos de variaciones que presenta en cuanto a patogenicidad y demuestra que se verifica selección *in vivo* de partículas virales neurotrópicas (Montgomery et al., 1989). Estos resultados sugieren que las divergencias obtenidas en HSV-1 *in vivo* probablemente son influenciadas por fenómenos como recombinación, estado de latencia viral, episodios de selección inmunológica, así como la co-evolución del virus con su hospedador (Rojas et al., 1995b).

Bower y colaboradores publican un estudio donde demostraron el aislamiento de dos variantes del virus, provenientes de un neonato que sufrió una diseminación fatal de la infección, los investigadores documentaron la presentación de dos variantes intracepa del virus, que se diferenciaban significativamente en el tamaño de los focos que producían, y otras características importantes, como su tropismo por diferentes tejidos (Bower et al., 1999).

La relevancia del fenómeno de variabilidad en el HSV-1 se incrementa gradualmente entre la comunidad médica y científica debido a que los hallazgos observados hacen inferir que existe un gran número de variantes circulando entre la población humana (Terhune et al., 1998). Lo que se aprecia en la presentación de comunicaciones donde las poblaciones estudiadas son cada vez mayores y en períodos de tiempo más prolongados. Según aportan Kimberlin y colaboradores, a pesar de los avances en las terapias antivirales, la morbilidad y mortalidad por infecciones del HSV humano se mantiene inaceptablemente alta, y concluyen además, que las formas de presentación de la enfermedad en neonatos se han ido modificando en el transcurso de los años, de manera que, en la actualidad, entre un 17% al 31% de los neonatos enfermos no presentan, ni desarrollan vesículas cutáneas, lesiones que se consideraban características de la enfermedad (Kimberlin et al., 2001).

En otro estudio donde se analizan los casos de pacientes entre enero de 1994 y diciembre de 2005, se evidencia la aparición de “formas atípicas de la enfermedad por HSV que afectan el sistema nervioso central en niños” (Elbers et al., 2007). El estudio no deja lugar a duda de la relevancia de HSV como agente etiológico en la presentación de encefalitis agudas en niños, donde fue responsable del 5% de los casos, y en el que la

aparición de secuelas neurológicas se observó en el 63% de los enfermos, así como, de la importancia del estudio del fenómeno de variabilidad observado en este microorganismo.

Rekabdar y colaboradores en estudios de variabilidad genética en HSV-1, detectan mutaciones en el gen de la gG en 3 de un total de 11 aislados clínicos estudiados, las cuales resultaban en cambios en los aminoácidos (Rekabdar et al., 1999). Más tarde, en otro estudio donde se incluyeron 105 aislados, los mismos autores detectaron dos variables genéticas por secuenciación de la parte inmuno dominante del gen de la gG (Rekabdar et al., 2002).

Se han comunicado mutaciones dentro del locus de la DNA Polimerasa (*Pol*) en diferentes variantes del HSV-1 cepa KOS, las cuales le confieren resistencia frente a diversos fármacos antivirales, como el ácido fosfonoacético, acyclovir, y la vidarabina (Coen et al., 1984).

El estudio de la variabilidad genética en el HSV resulta de importancia para el entendimiento del desarrollo de la patogenicidad y se ha incrementado con el reconocimiento de que este microorganismo viral puede ser utilizado como vector en el desarrollo de terapias y profilaxis génicas (Ward y Roizman, 1994).

1.3. ESTUDIO GENÉTICO

1.3.1. Región Exo III de la DNA polimerasa

1.3.1.1. Mecanismos y factores que contribuyen a la fidelidad durante la replicación del DNA.

Actualmente persiste el interés por los mecanismos que mantienen la fidelidad durante el proceso de copia de DNA, esto se debe a que el balance entre la correcta e incorrecta síntesis de DNA es materia de gran relevancia biológica. La síntesis de DNA con alta fidelidad redundaría en beneficio del mantenimiento de la información genética durante muchas generaciones y evita mutaciones que podrían iniciar y promover enfermedades tales como el cáncer y las alteraciones neurodegenerativas. Por otro lado,

una baja fidelidad en la síntesis de DNA resulta en beneficio del proceso de evolución de especies, en la generación de diversidad, la cual conlleva al incremento de la supervivencia de los virus y otros microorganismos, al ser sujetos a cambios en su medio ambiente, y para el desarrollo de un sistema inmune adecuado (Kunkel, 2004).

Existe evidencia de, al menos, tres mecanismos cuyo objetivo es asegurar fidelidad durante el proceso de replicación del DNA: 1) mecanismo de prevención de errores, el cual mejora la iteración entre pares de bases y es mediado por la enzima polimerasa; 2) mecanismo de corrección de error o corrector de pruebas, que actúa mediante la hidrólisis preferencial de los nucleótidos mal apareados durante la polimerización y 3) corrección de apareamiento, que actúa por escisión endonucleolítica post sintética de los nucleótidos incorrectamente incorporados (Kunkel et al., 1981).

1.3.1.2. Polimerasas de DNA y actividad exonucleasa

Múltiples polimerasas de DNA se conocen, la mayoría de las cuales han sido descubiertas en los últimos años, entre ellas existen diversas diferencias una de las más importantes es la que se observa en la fidelidad.

Un factor decisivo en ello es la presencia de actividad exonucleasa de corrección de prueba ya sea de manera intrínseca o codificada por un gen separado, entre las polimerasas que poseen intrínsecamente actividad correctora de prueba se encuentran las polimerasas de la familia A (Ej. T7 Pol), familia B (Ej. T4 Pol, Pol δ , Pol ϵ) y familia C (Ej. *E. coli* I). La importancia de la actividad correctora de prueba se demuestra al comparar las tasas de error en la síntesis entre polimerasas con actividad correctora de prueba con sus correspondientes polimerasas defectivas (Kunkel, 2004).

1.3.1.3. Actividad exonucleasa en HSV-1

Los virus pertenecientes a la familia *Herpesviridae* codifican de manera muy conservada la subunidad catalítica de DNA Polimerasa, que forma parte de la familia de las polimerasas B (Knopf, 1998).

El gen que codifica la enzima DNA polimerasa se ubica en la posición 30 de la región única larga, UL30 del genoma del HSV-1 (McGeoch et al., 1988).

Estas polimerasas poseen intrínsecamente actividad 3´-5´exonucleasa (Spicer et al., 1988) la cual se encuentran localizadas en las regiones que se indican en la **Figura 2** según su alineamiento con la secuencia de la polimerasa de DNA I (*E. coli*) y contienen 3 regiones *motiffs* muy conservado denominadas Exo I, Exo II, Exo III (Larder, et al., 1987; Bernard et al., 1989; Baker y Hall, 1998).

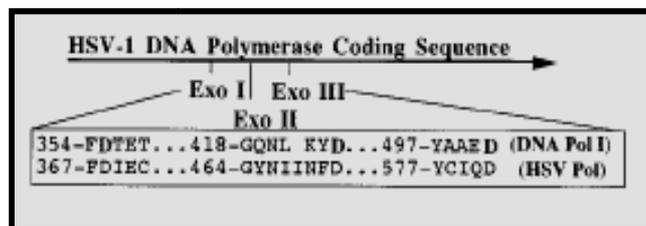


Figura 2. Secuencia que codifica para la Polimerasa de DNA del HSV-1 en relación con los segmentos Exo "motiffs".

Adaptado de Baker y Hall, 1998.

Dentro del cuadro se indican las secuencias de los Exo "motiffs" para HSV-1 (HSV Pol) alineadas junto con sus secuencias análogas de la polimerasa de DNA de la *Echerichia coli* (DNA Pol 1). Los números indican el amino ácido que ocupa la posición N-terminal en cada secuencia.

Se ha observado que organismos nucleasas deficientes exhiben tasas elevadas de mutaciones espontáneas, lo cual indica que su actividad controla la producción de mutaciones in vivo (Morrison y Sugino, 1994; Simon et al., 1991).

Los tres segmentos se consideran segmentos conservados dentro de las polimerasas de DNA, tanto eucariotas como procariotas, e incluyendo la HSV polimerasa, se denominan en su conjunto Exo *motiffs* (Bernard et al, 1989).

Como se muestra en la **Figura 3**, los segmentos pueden ser alineados con sus correspondientes homólogos entre varias polimerasas de DNA, y se observa dentro de

la región Exo III la presencia de aminoácidos altamente conservados (Hwang et al., 1997).

Se ha comunicado que la selectividad del nucleótido es el mayor factor para lograr una alta fidelidad, ella es controlada fundamentalmente a nivel del incremento de la afinidad por el nucleótido correcto *versus* nucleótido incorrecto. Y que el efecto de la actividad Exo en la fidelidad se debe al incremento de la posibilidad de escisión y reparación de nucleótidos mal incorporados durante la síntesis de DNA en presencia del UL42 *processivity factor* (Song et al., 2004).

En su estudio, Hwang y colaboradores producen dos mutantes de Exo III para HSV, mutantes denominados Y7 y YD12, en los que se modifican los dos aminoácidos altamente conservados y sugieren, en base a los resultados obtenidos, que estas mutaciones no son letales para la replicación viral mas se observó afectación en el tamaño de los focos que produjeron, además concluyen que la actividad 3'-5' exonucleasa contribuye de manera sustancial en la fidelidad durante la replicación del DNA demostrando un incremento en la frecuencia de mutaciones de entre 20 hasta 80 veces. También determinaron que en estos mutantes se producía un incremento de la aparición de HSV resistentes a ganciclovir durante la replicación (Hwang et al., 1997).

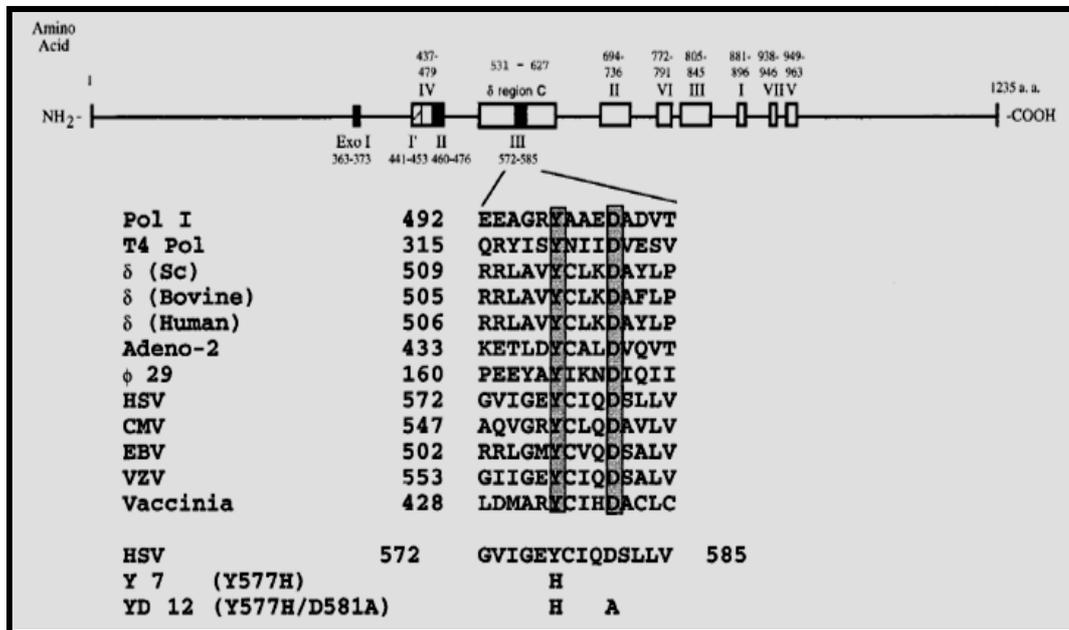


Figura 3. Secuencias homólogas de la Exo III motif que son comunes entre diversas polimerasas. Tomado de Hwang et al, 1997.

La línea superior esquematiza el polipéptido de la Polimerasa de DNA de HSV y se observan las regiones de las secuencias similares entre otras polimerasas. Las regiones del I al VIII y la δ región C. que coincide con el Exo II *motif* se muestran como recuadros claros; Las Exo I, II y III *motiffs* se muestran como recuadros oscuros; el segmento Exo I', que originalmente se le denominó como Exo I también se muestra en recuadro oscuro. La numeración sobre la línea se refiere a los aminoácidos (a.a) de la Polimerasa de HSV. Bajo la línea se observan alineadas diversas secuencias de la región Exo III de diversas polimerasas de DNA incluida la del virus HSV. Los números indican los aminoácidos. Los aminoácidos altamente conservados se observan sombreados. En el extremo inferior se indican los dos mutantes de HSV, Y7 y YD12 creados por Hwang et al. para su estudio. En el diagrama se incluyen las siguientes polimerasas de DNA: *E. coli* Pol I (Pol I), bacteriófago T4 Pol, polimerasa δ de *Saccharomyces cerevisiae* [δ (Sc)], polimerasa δ humana [δ (Human)], Polimerasa δ bovina [δ (bovine)], Adenovirus tipo-2 (Adeno-2), bacteriófago φ 29, HSV, Citomegalovirus humano (CMV), Epstein-Barr (EBV), virus de la varicella-zoster (VZV), y virus vaccinia.

Actualmente se considera que posee gran potencial para ser utilizada como blanco en la terapia antiviral (Whitley y Roizman, 2001).

Más tarde se reconoce el gen de la holoenzima de polimerasa UL42 como factor indispensable para el mantenimiento de la fidelidad durante la síntesis de DNA en la replicación del HSV-1, el cual contribuye actuando como barrera cinética que se activa al producirse una incorporación errada de nucleótido, generando que se dispare la actividad correctora de prueba de la 3'-5' exonucleasa, postulando así que la disminución en la frecuencia de mutaciones espontáneas durante el proceso de replicación viral in vivo del HSV-1 se logra mediante la conjunción de ambos factores (Song et al., 2004).

Se conoce que diversos mecanismos se encuentran involucrados en la prevención de mutaciones durante la replicación de DNA, se considera que uno de los más importantes es el de corrección de prueba que realizan las 3'-5' exonucleasas asociadas a las polimerasas de DNA. En el presente estudio se investigó, por secuenciación, la aparición de mutaciones espontáneas en un fragmento de la región Exo III de la polimerasa de DNA, comparando dos poblaciones clonales del herpes virus humano 1.

1.3.2. Gen de la glicoproteína D

1.3.2.1. Características y estructura

La glicoproteína D es una de las 11 glicoproteínas de membrana codificadas por el virus que han sido identificadas en la envoltura del HSV (Chiang et al., 1994; Connolly et al., 2003). Se reconocen como glicoproteínas esenciales para la entrada del virus a células permisivas las glicoproteínas gD, gB, gC, gH y gL (Connolly et al., 2003; Jogger et al., 2004).

El gen que codifica la glicoproteína D se ubica en la sexta posición de la región única corta, US6 y codifica para 394 aminoácidos (Watson et al., 1982). Se ha determinado que existe una gran similitud intertípica entre las glicoproteínas D de los virus HSV-1 y HSV-2 aunque se ha demostrado que no son idénticas (Cohen, 1980). Sin embargo aparenta ser altamente conservada entre ambos virus así como también funcionalmente similares (Eisemberg et al., 1980).

La función biológica de la glicoproteína D es altamente dependiente de su estructura, que, a su vez, depende de que se mantengan intactas las uniones disulfuro que mantienen su conformación nativa. Las uniones disulfuro se forman de la unión entre seis cisteínas: C1 (aa 66), unida a C5 (aa 184) C2 (aa 106) unida a C6 (aa 202), y C3 (aa 118) unida a C4 (aa 106). Estas uniones son críticas para el mantenimiento de la estructura espacial **Figura 4**. Se ha observado que la presencia de mutaciones en estas posiciones produce un inadecuado plegamiento con la consecuente disfuncionalidad de la proteína (Long et al., 1992).

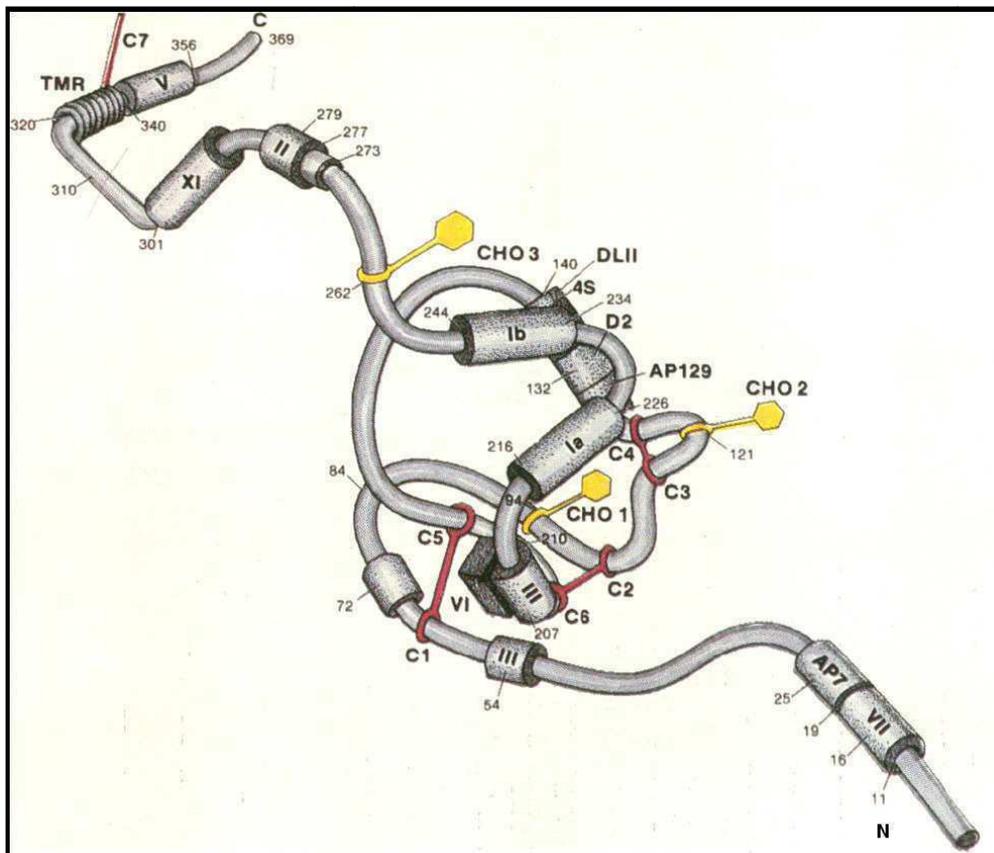


Figura 4. Modelo de la estructura de la gD que muestra las cuatro regiones funcionales.
Adaptado de Long et al, 1992.

Muestra la forma espacial que adopta la gD en su plegamiento. Entre las regiones N terminal y la C terminal se observan los epitopos VII (aminoácidos del 11 al 19), II (aa 273 al 279), XI (aa 284 al 301) y V (aa 340 al 356). Entre ellos se encuentran seis cisteínas (en rojo) formando tres uniones disulfuro: C1 (aa 66), unido a C5 (aa 184) C2 (aa 106) unido a C6 (aa 202), y C3 (aa 118) unido a C4 (aa 106). Estas uniones son críticas para el mantenimiento de la estructura en plegamiento.

1.3.2.2. Actividad biológica

La infección celular por un virus requiere que se verifique una secuencia de interacciones entre ambas, lo cual tiene como consecuencia la entrada, desnudamiento y desensamblaje viral para el inicio de la replicación dentro de la célula huésped. La entrada del virus a la célula ocurre a través de una serie de interacciones reguladas a nivel molecular entre componentes de la envoltura, el tegumento y la nucleocápside viral con la superficie de una célula susceptible (Fuller y Lee, 1992).

Fuller y Lee proponen un modelo de entrada de HSV-1 (**Figura 5**), el cual se logra a través de múltiples interacciones que disparan cambios en el virión, que da como resultado una fusión con la membrana, y el consecuente desnudamiento de la nucleocápside. Ellos determinaron que la gD media la adhesión estable y diseñaron un modelo detallado en las siguientes fases: (a) adhesión inicial, es la primera interacción entre célula y HSV-1 y permite el encuentro entre ambas, están implicadas otras glicoproteínas como la gC y la gB y por parte de la célula está involucrado el heparán sulfato, un receptor que se encuentra comúnmente en la superficie celular, que sirve como receptor de baja afinidad para otros muchos ligandos; (b) adhesión estable: es indispensable para que se desencadene la fusión de la envoltura del virus con la membrana celular, y es mediada por la gD principalmente, ya que en experimentos con virus defectivos, o utilizando anticuerpos neutralizantes, el virus luego de la adhesión inicial no fue capaz de desencadenar los subsiguientes eventos necesarios para la infección celular; (c) iniciación de la fusión: conlleva la iniciación de un puente de fusión con la reorganización en los componentes de la envoltura y tegumento del virión que lo incorporan a la célula como una estructura extracelular, se verifica la desestabilización de la capas lipídicas virales y celulares las cuales se reorganizan para permitir una unión con la subsiguiente movilización de la nucleocápside desde el centro de la molécula viral hacia la célula; (d) expansión del puente de unión: se extiende significativamente la fusión entre los componentes virales y la membrana celular con la condensación del tegumento y la envoltura; (e) liberación de la nucleocápside: este paso completa la penetración a la célula y pone a salvo al virus de ser expuesto a cualquier proceso de inactivación extracelular.

La hipótesis que envuelve dos tipos de adhesiones para el HSV-1 provee una serie de ventajas para la supervivencia del virus, ya que le permite la utilización de diferentes receptores celulares. La comprensión de las interacciones específicas entre las glicoproteínas del HSV-1 y los componentes celulares puede ser la fuente de un mayor entendimiento de los determinantes del tropismo de los herpesvirus (Fuller y Lee, 1992). Para que se complete la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática celular se requieren, en adición a la gD, un conjunto de glicoproteínas como son la gH, gB y gL (Zhou et al., 2003).

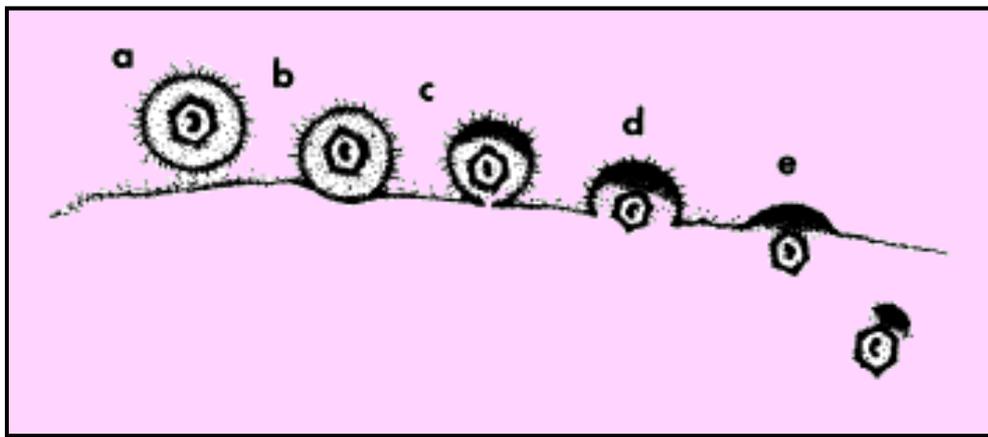


Figura 5. Serie de interacciones que se suceden entre la envoltura viral y la membrana celular durante de la entrada del HSV-1 a la célula, propuesto por Fuller and Lee, 1992.

(a) Adhesión Inicial; (b) adhesión estable; (c) iniciación de la fusión; (d) expansión del puente de fusión; (e) liberación de la nucleocápside.

Más tarde se demostró que el HSV-1 se adhiere inicialmente a la superficie celular a través de la unión de la gC a proteoglicanos: heparan sulfato (heparan sulfate proteoglycans [HSPG]), en sus experimentos determinaron que esta adhesión inicial permitía la unión de la gD a otro receptor celular distinto a HSPG, lo cual comprobaron al observar que en células tratadas con heparinasa se reducía la formación de uniones celulares con la gC mas no se afectaron la uniones con la gD. También observaron que al utilizar líneas celulares deficientes en HSPG tales como las gro2C y

las sog9 las uniones celulares con la gC se redujeron significativamente, sin embargo las uniones celulares a gD no se perturbaron (Tal-Singer et al., 1995).

Las diferentes funciones biológicas de la gD son llevadas a cabo por diferentes dominios dentro de la proteína (Cochi et al., 2004; Zago et al., 2004)

1.3.2.2.1. Restricción o interferencia de la superinfección.

La glicoproteína D restringe o interfiere con la superinfección. Esta actividad biológica posee gran importancia ya que previniendo la reinfección de células previamente infectadas se evita la disminución en la producción de virus infeccioso y también la reducción en su capacidad de diseminarse por los tejidos. Se piensa que la habilidad de la gD de secuestrar los receptores celulares durante su interacción con ellos es lo que evita que se produzca la superinfección celular (Campadelli-Fiume et al., 1990; Brandimarti et al., 1994).

1.3.2.2.2. Actividad fusogénica

La actividad fusogénica de la gD ha sido demostrada experimentalmente mediante la observación que células infectadas que expresan bajos niveles de gD no sufren la policariocitosis espontánea y que, la presencia de anticuerpos específicos frente a gD inhibe la fusión célula-célula que generan las variantes virales que producen sincitios (Zhou y Roizman, 2002).

1.3.2.2.3. Bloqueo de la apoptosis.

El bloqueo de la apoptosis en células infectadas requiere de moléculas monoméricas intactas de gD (Zhou y Roizman, 2002), se ha planteado que esta molécula es capaz de interaccionar con el receptor de manosa-6-fosfato (mannose 6 phosphate) que se encuentra en el compartimiento endosomal tardío, generado por exocitosis viral, para bloquear la liberación de enzimas lisosomales (Zhou et al., 2003).

Las propiedades inmunológicas de la glicoproteína D han generado gran interés en el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación para el control de enfermedades por HSV y otros patógenos complejos. En los estudios ha demostrado capacidad de

promover una respuesta inmune protectora (Langenberg et al., 1995; Domingo et al., 2003).

1.3.2.3. Receptores celulares

Se han descrito tres clases de moléculas de superficie celular que pueden servir como receptores de gD. Estas incluyen HVEM (Montgomery et al., 1996; Whitbeck et al., 1997; Connolly et al., 2002) también denominado HveA, que es miembro de la superfamilia de los receptores de factor de necrosis tumoral (Whitbeck et al., 2001); la nectina-1 también denominada HveC (Geraghty et al., 1998; Connolly et al., 2005); y la nectina-2 o HveB (Warner et al., 1998), ambas miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas; y un sitio especial de la molécula de heparan sulfato que es generada específicamente por 3-O-sulfotransferasas (Yoon et al., 2003). La unión de la gD viral a alguno de estos receptores celulares dispara el proceso de fusión de membranas que se requiere para la entrada viral (Terry-Allison et al., 2001).

Se conoce que la gD cumple con funciones biológicas esenciales para el virus, las cuales pueden afectarse en presencia de mutaciones que modifiquen la configuración de la proteína y alteren sus propiedades bioquímicas. Este estudio pretende determinar por secuenciación la presentación de mutaciones en un segmento del gen que se verifiquen en una población luego de realizar diez pases sucesivos, que representen un cuello de botella genético.

1.3.3. Gen de la timidina kinasa

1.3.3.1. Actividad biológica y características.

Entre las enzimas que son codificadas por el HSV se encuentra la deoxipirimidina kinasa, que fosforila tanto a la deoxitimidina como a la deoxycitidina (Campione-Piccardo et al., 1979). El gen que codifica para esta enzima denominada timidina kinasa (TK) del HSV-1 se ubica en la posición 23 de la región única larga del genoma del HSV-1, contiene 376 codones y debido a que el producto traducido del gen no es indispensable para la instauración de la infección celular productiva se considera

un gen no esencial (McKnight et al., 1980; Wagner et al., 1981). La timidina kinasa se encuentra entre las proteínas cuya principal función es controlar el metabolismo del ácido nucleico y actualmente se utiliza como diana en la terapia antiviral (Whitley y Roizman, 2001).

La timidina kinasa cataliza la fosforilación de la deoxitimidina (dT) a deoxitimidina monofosfato (dTMP) en presencia de ATP y Mg^{2+} , se considera una enzima altamente conservada que se encuentra en casi todos los organismos, significativamente en la mayoría de los virus de DNA, entre ellos los de la Familia *Herpesviridae*; en el HSV-1 podría ser esencial para su supervivencia bajo condiciones de presión selectiva (Wurth et al., 2001). Por otra parte también se ha documentado la importancia de la actividad TK en el HSV para el desarrollo de funciones tales como su patogenicidad (Efstathiou et al., 1989), y en la reactivación del virus en estado de latencia (Coen et al., 1989).

El gen resulta de especial interés ya que juega un importante papel en el modo de acción de varios análogos de nucleósidos que actúan como potentes inhibidores de la replicación viral (Darby et al., 1986).

1.3.3.2. Centro activo

El gen que codifica para la TK posee tres dominios conservados: “*the nucleotide binding pocket*” portador de la unión a nucleótido, “*the ATP binding site*” (Brown et al., 1995); “*the thymidine binding site*” sitio de unión a timidina (nucleósido) Y un tercer dominio separado, que en la configuración espacial probablemente interacciona entre ambos (Darby et al., 1986; Nugier et al, 1991).

El estudio de las lesiones observadas en mutantes de TK del HVS-1 demostró la presencia de alteraciones bioquímicas en su actividad enzimática y llevó a los investigadores a postular que la interacción colaborativa entre tres distintas regiones del polipéptido, codificadas por estos dominios conservados, es requerida para que se verifique la correcta actividad enzimática y, en su conjunto, se denominan “centro activo” (Darby et al., 1986).

1.3.3.3. Variantes de TK en HSV

Se conoce que los aislados del HSV, sean provenientes de pacientes o de cultivos celulares, conforman poblaciones heterogéneas y contienen variantes de TK preexistentes los cuales presentan resistencia a drogas, reportadas en el orden de entre seis a ocho mutantes por 10^4 virus formadores de placa (Parrish and Harrington, 1982; Sarisky et al., 2000).

La variabilidad del gen de la TK del HSV ha sido estudiada a través de sus mutantes por diversas razones tales como: (i) la emergencia de cepas, tanto en pacientes como *in vitro*, que son resistentes a análogos de nucleósidos anti herpéticos TK dependientes; (ii) desarrollo de ensayos con mutaciones en aminoácidos específicos dentro del gen de la TK para revelar su función sobre el sustrato o el sitio de unión de la enzima y para revelar otras características de la enzima; (iii) se han introducido mutaciones en el gen de la TK para diseñar e identificar mutantes con una habilidad mejorada de fosforilar análogos de nucleósidos anti herpéticos, lo cual podría ser útil como oncolítico; (iv) TK parece un gen importante con respecto a la diferente patogenicidad que presenta el HSV-1 según la vía de inoculación (Becker et al., 1986).

Hemos comparado la variabilidad genética que se presenta entre las poblaciones inicial y final partiendo de la cepa F del HSV-1, mediante la amplificación y secuenciación de una región del dominio de unión a ATP del gen de la TK tras aplicar pases sucesivos que actúan como cuello de botella genético.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

La variabilidad genética que presentan los microorganismos patógenos reviste gran importancia clínica y evolutiva. Características de la enfermedad tales como su gravedad y la respuesta al tratamiento están sujetas a las características genéticas de la población que logra instaurar la infección. Se ha postulado que durante el ciclo vital de los virus en la naturaleza ocurren, muy probablemente y con diferente intensidad eventos del tipo cuello de botella genético, lo cual jugaría un papel en la selección de una parte de la población viral. Estos eventos pueden ser también importantes en la historia de la infección causada por HSV-1, así como de la aparición de diferentes fenómenos adaptativos.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo general

El análisis del efecto de la “aplicación de un cuello de botella genético” sobre una población de virus herpes simples tipo 1: Comprobar si el “Trinquete de Muller” actúa sobre el virus herpes simplex tipo 1, ejemplo de virus DNA, de forma similar a lo que ocurre con los virus RNA; alterando la adaptación a los cultivos celulares y otras propiedades biológicas, como la neurovirulencia en un modelo animal.

2.2.2. Objetivos específicos

1. Obtención y comparación de los “clones parentales” o clones 1 y los “clones transferidos” o clones 10, procedentes de una población viral representada por la cepa F de HSV-1, mediante la aplicación de un cuello de botella genético consistente en la realización de 10 pases sucesivos a 23 “clones parentales” derivados de dicha población original.
2. Estudiar las mutaciones que se presentan en la secuencia del gen de la glicoproteína gD como gen esencial para la replicación viral tras la aplicación del cuello de botella genético.
3. Estudiar las mutaciones que se presentan en la secuencia del gen de la TK como gen viral no esencial tras la aplicación del cuello de botella genético.
4. Estudiar las mutaciones que se presentan, tras la aplicación del cuello de botella genético, en la secuencia de la Región Exo III de la DNA polimerasa por su actividad correctora de prueba e importancia en la fidelidad durante la replicación viral.
5. Observar los efectos que se producen al aplicar el cuello de botella genético con respecto a la capacidad de producción de progenie infecciosa (fitness) en una línea celular determinada.
6. Observar los efectos biológicos que se producen al aplicar el cuello de botella genético con respecto a la virulencia de los “clones transferidos” o progenie en un ensayo biológico en ratones.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS

Aislamiento de ADN Lisis: tampón de lisis 4x cada ml contiene: Tris 1M pH 7 250 μ l , H₂O 250 μ l y SDS CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na al 20% 500 μ l; espermatozoos de salmón como DNA *carrier* 2 μ g/ml (Sigma-Aldrich); EDTA 0,2M f 10mM; Proteinasa K 200 μ g/ml. Fenolización: Acetato sódico 3M CH₃COONa (Sigma-Aldrich); Fenol C₆H₅OH (grado molecular Sigma-Aldrich); Cloroformo CHCl₃ (Sigma-Aldrich); Alcohol isoamílico (Sigma-Aldrich); Fenol : cloroformo : isoamílico (25:24:1); Cloroformo isoamílico (24:1). Precipitación: Etanol absoluto CH₃CH₂OH (grado molecular Sigma-Aldrich). Lavado: Etanol al 70% C₂H₅OH (Sigma-Aldrich). Resuspensión: TE que corresponde a solución de Tris 10 mM y EDTA 1mM a pH 7.5.

Reacción en Cadena de la Polimerasa : enzima *HotStartTaq* ADN polimerasa forma modificada de la enzima recombinante 94-kDa, originalmente aislada a partir de *Thermus aquaticus*, clonada en *E. coli* (Deoxynucleoside-triphosphate:DNA deoxynucleotidyltransferase, EC 2.7.7.7) QIAGEN Companies; soluciones: tampón a concentración 10x: Tris Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, MgCl₂ 15 mM; solución Q a concentración 5x; solución MgCl₂ 25 mM; QIAGEN Companies ; H₂O [miliQ] ; dNTPs 10mM con un contenido de 2.5 mM de cada uno de los siguientes : dATP, dCTP, dGTP, y dTTP GeneAmp® (Applied Biosystems).

Electroforesis: Agarosa SeA Kem®LE agarose (FMC); Bromuro de etidio (Sigma); Marcador de peso molecular de 1 Kb (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen); colorante Azul de Metileno (Panreac).

Purificación de ADN: *Montage PCR KIT, Single Sample PCR Cleanup* (MILLIPORE Corporation); TE: solución de Tris 10 mM y EDTA 1mM a pH 7.5.

3.2. LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO

Los pases sucesivos para la obtención de las poblaciones víricas se realizaron en la línea celular 143 (ATCC CRL 8303), células procedentes de osteosarcoma humano, derivado de la línea R970-5 transformadas por el virus del sarcoma murino de Kirsten (Rhim et al., 1975) y seleccionadas por Bromodesoxiuridina (Bachetti y Graham, 1979), por lo cual son células deficientes para la actividad TK. El procedimiento de titulación del virus y una serie de pases sucesivos que se realizaron con el objetivo de comparar morfológicamente los focos, se realizó en células Vero (ATCC CCL 81), línea celular procedente de células epiteliales de riñón de mono verde africano adulto.

Se cultivaron las células en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) (GIBCO *Invitrogen Corporation*), suplementado con un 5% de suero fetal de ternera (STF). El medio se suplementó con 100 UI/ml de penicilina, 0,05 mg/ml de estreptomina, 0,05mg/ml de sulfato de gentamicina y 1µg/ml de anfotericina B. Tamponado con bicarbonato al 0,15% y HEPES 15mM. Las células se cultivaron a una temperatura de incubación de 37° C en presencia de CO₂ al 5% en frascos Falcon de 25, 75 y 150 cm² de superficie.

3.3. CEPA VIRAL

Para la obtención de las poblaciones virales del estudio así como para los controles positivos se utilizó el HSV-1 Cepa F de referencia (Ejercito et al., 1968).

3.4. PASES SUCESIVOS PARA LA OBTENCIÓN DE LAS POBLACIONES VÍRICAS

3.4.1. Definición de las poblaciones virales del estudio

En el presente estudio se aplicó el cuello de botella a 23 clones originados a partir de la Cepa F del HSV-1, éstos constituyeron los clones parentales. Cada clon parental da origen a una serie clonal, la cual luego de 10 pases sucesivos dio origen a los clones transferidos (Chao, 1990).

3.4.2. Pases sucesivos en células 143tk⁻

La obtención de los clones transferidos se realizó mediante pases sucesivos de placas mediante el procedimiento descrito para los RNA virus (Escarmis et al., 1996; Lázaro et al., 2003). Se cultivaron células 143tk⁻ a concentración de 50 000 células/ml en placas de poliestireno con fondo plano de 6 pozos (**Figura 6**) en 2 ml de medio DMEM 5% STF.

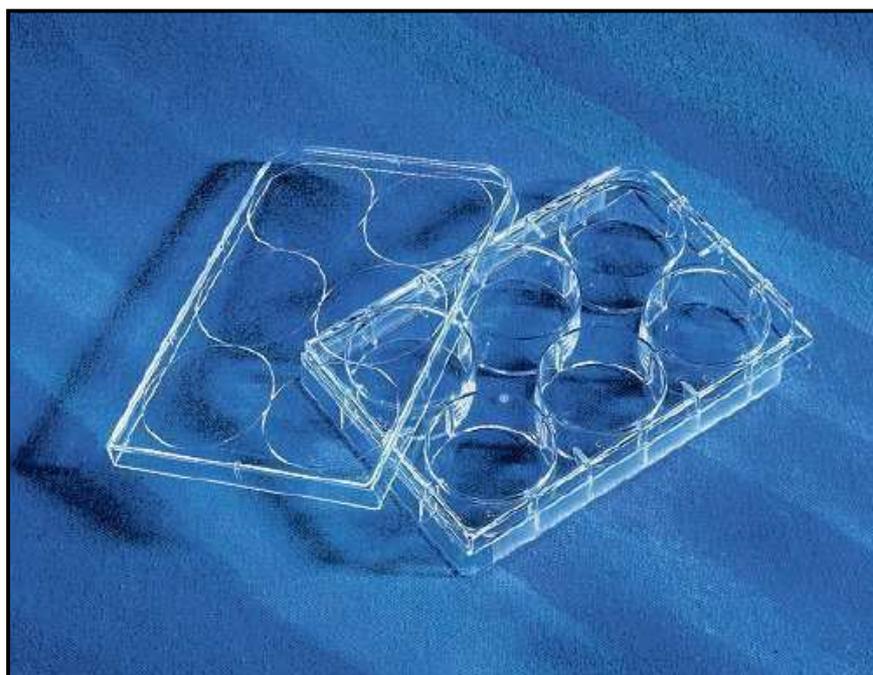


Figura 6. Micro platos de poliestireno con fondo plano de 6 pozos de 35mm de diámetro.

Utilizados para la obtención de los clones virales a partir del crecimiento de focos aislados.

Pasadas 24 horas de incubación a 37° C se obtuvo una monocapa de crecimiento celular que fue examinada al microscopio óptico (Nikon Eclipse TS100), para comprobar una confluencia de 50% (**Figura 7**). Se retiró el medio y se procedió a inocular 0,6 ml del virus problema a una dilución de 1 en 10, la adsorción se llevó a cabo mediante incubación durante 2 horas a 37°C al 5% de CO₂. Durante el período de adsorción se procedió a preparar el medio con agar con las siguientes proporciones por cada 10 ml de medio: 5 ml de DMEM 2x suplementado al 4% de STF (Suero de

ternera fetal), 0,99 ml de H₂O estéril, se equilibró pH agregando 10 µl de HCl 1N, se llevo a temperatura de 45° C. Se añadió agarosa 2% de bajo punto de fusión un volumen de 4ml (SeaPlaque GTG® agarose), fundido y equilibrado previamente a 45° C. Finalizado el período de adsorción se retiró el inóculo de las células y se añadió 3 ml del medio con agar a cada pocillo, se permite la solidificación del medio con agar dentro de la cámara y se procede a la incubación durante 48-72 horas.

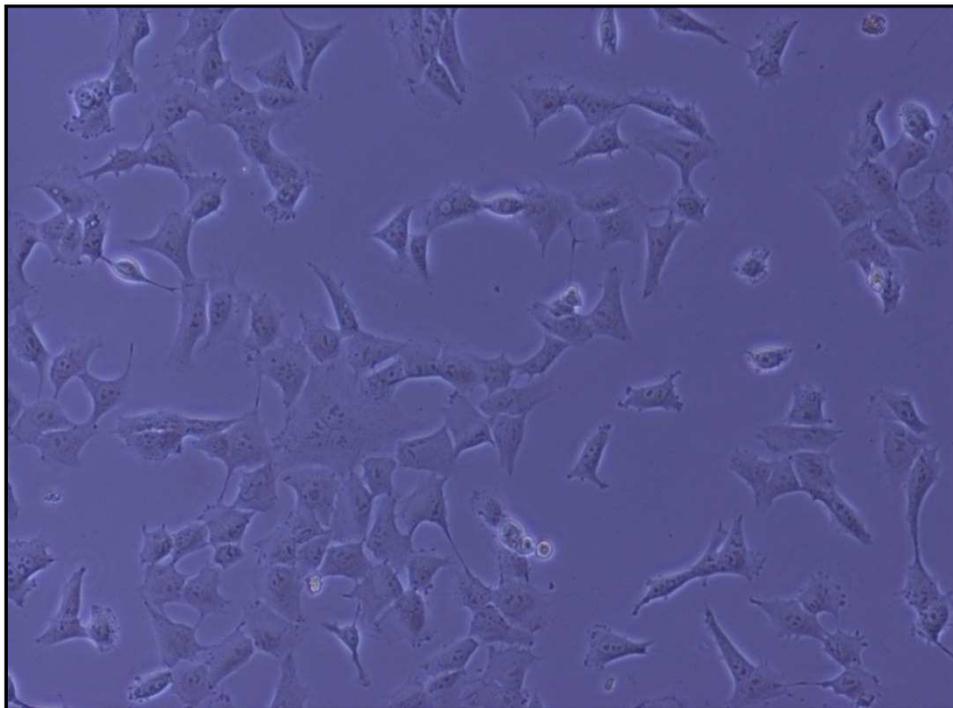


Figura 7. Mono-capa de células 143tk al 50% de confluencia (10x).

Las placas fueron observadas al microscopio óptico cada 24 horas para determinar la presencia de focos de infección viral (**Figura 8**) mediante la observación de efecto citopático CPE, el cual incluye granulación citoplásmica seguida de un agrandamiento de las células, las cuales se vuelven refráctiles y sufren una degeneración lítica, puede verificarse la formación de células gigantes multinucleadas debida a la fusión de membranas que promueve el virus y que se denominan sincitios (Whitley y Roizman, 2001). Los focos aislados de CPE se marcan convenientemente y se procede a la aspiración cuidadosa del medio que lo cubre con el fin de recuperar un

clon viral aislado. Cada clon recuperado se resuspende por duplicado en 0,5ml de medio DMEM suplementado con STF al 20% para su conservación a temperatura de -80° C.

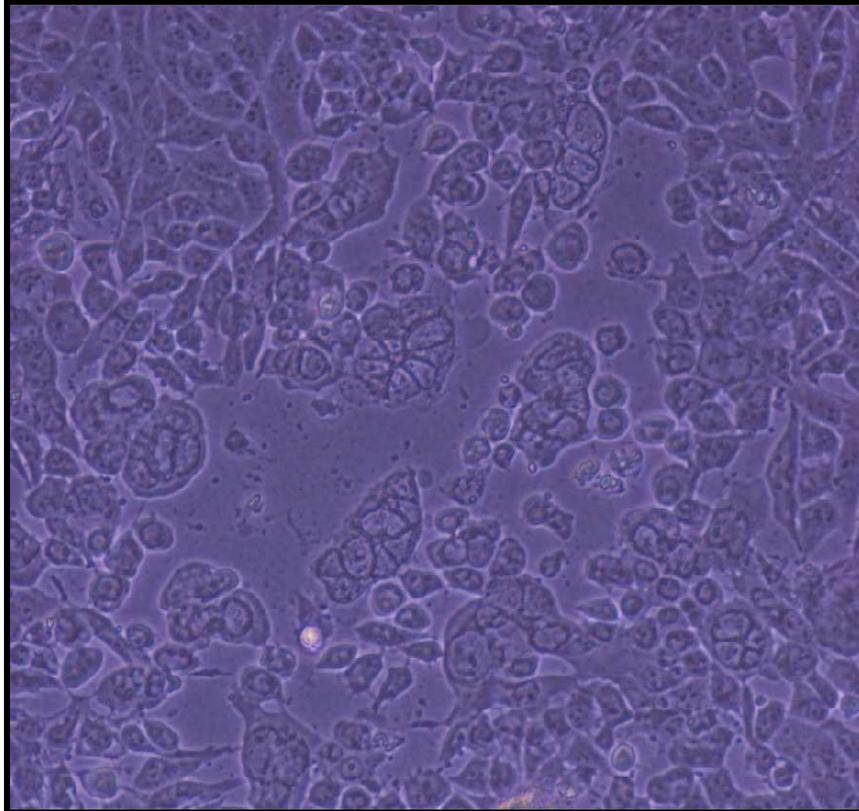


Figura 8. Efecto citopático producido por el HSV-1 a las 48 h (10x).

3.4.3. Titulación de los clones obtenidos en los pases sucesivos

La titulación viral se realizó en placas de 96 pocillos mediante diluciones seriadas de base diez (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) de cada clon obtenido a partir del tercer pase sucesivo. Los pocillos fueron sembradas con una suspensión de células Vero en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) suplementado con un 5% de suero fetal de ternera (STF), 100 UI/ml de penicilina, 0,05 mg/ml de estreptomicina, 0,05mg/ml de sulfato de gentamicina, 1 μ g/ml de anfotericina B y tamponado con bicarbonato al 0,15% y HEPES 15mM. A razón de 100 μ l del medio y 20 000 células por cada pocillo. Posteriormente, se realizó la inoculación viral con volumen de 10 μ l del clon viral al primer pocillo y se procedió a homogenizar.

Seguidamente se pasó un volumen de 10 μ l del primer pocillo al segundo y se homogenizó. Del segundo pocillo se pasó un volumen de 10 μ l al tercero se homogenizó y se descartó el mismo volumen.

Las diluciones seriadas se realizaron descartando las puntas en cada dilución. El volumen final en cada pocillo fue de 100 μ l. En cada título se incluyó un control celular sin virus. Se incubó a 37°C en atmósfera húmeda y presencia de CO₂ al 5%. La lectura se realizó a partir de las 48 horas.

3.4.3.1. Estudio estadístico.

El análisis de las medias de las titulaciones obtenidas en cada pase fueron analizadas por el método no paramétrico de Kruskal-Wallis y por el Test no paramétrico de las medianas (Kruskal y Wallis, 1952; Álvarez-Cáceres, 1995).

3.4.4. Controles.

Durante la obtención de las poblaciones virales mediante pases sucesivos se incluyeron los controles correspondientes para asegurar la validación de cada procedimiento.

3.4.4.1. Control de células

En la realización de cada pase sucesivo se incluyó un control de células, el cual consistió en un pocillo preparado con igual concentración de células al cual no se le practicó la inoculación viral (**Figuras 9, 10, 11 y 12**).

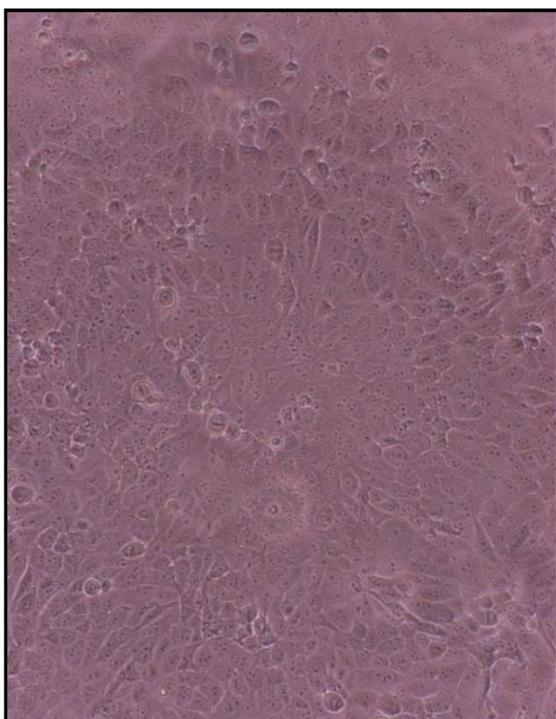


Figura 9. Control negativo 48h (10x)

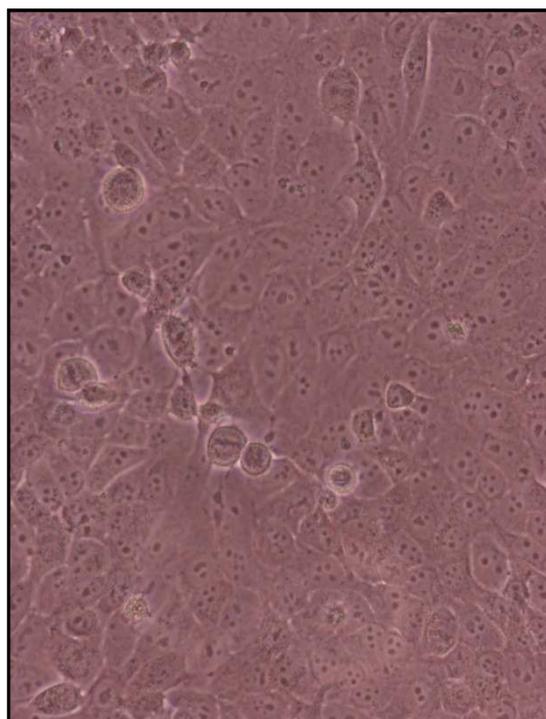


Figura 10. Control negativo 48h (20x).

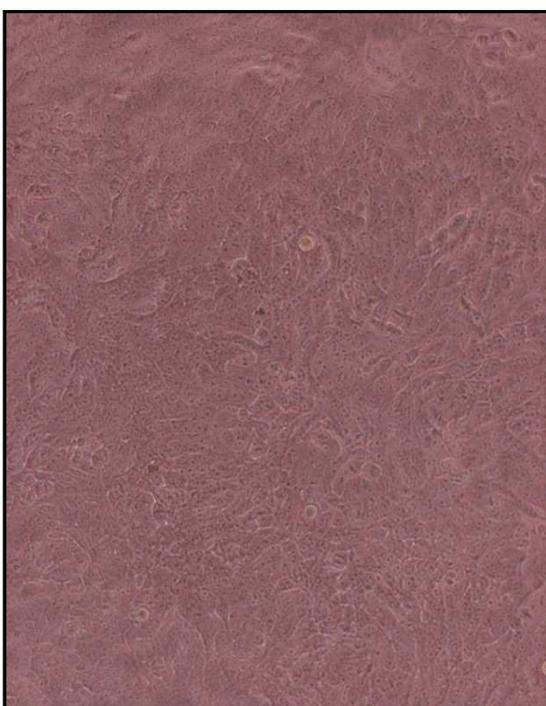


Figura 11. Control negativo 72h (10x).

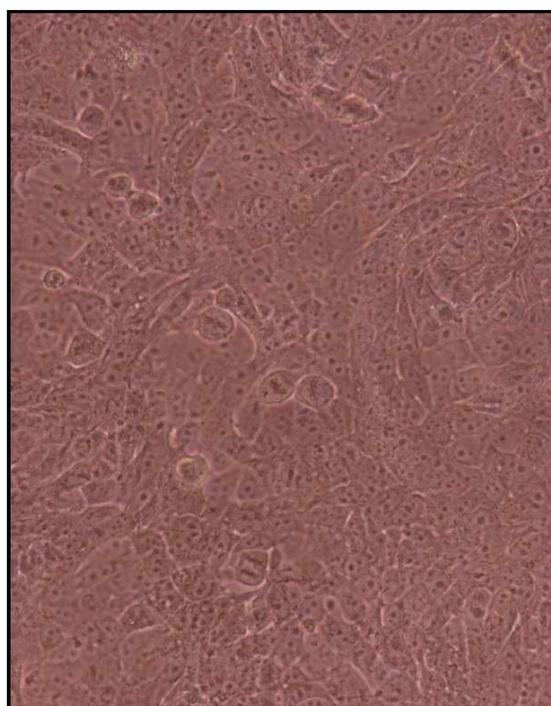


Figura 12. Control negativo 72h (20x).

3.4.4.2. Control Positivo

En la realización de cada pase sucesivo se incluyó un control positivo, el cual consistía en un pocillo preparado con igual concentración de células al cual se le inoculó una dilución del HSV-1 Cepa F de referencia (**Figuras 13 y 14**).

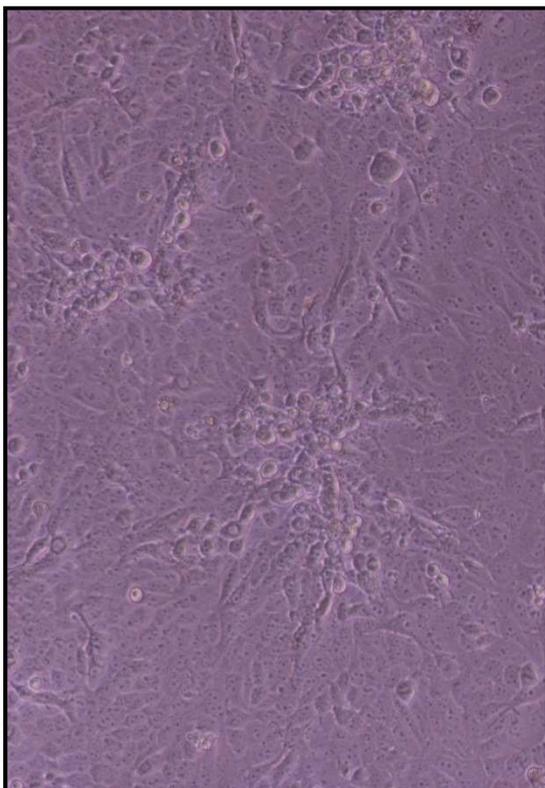


Figura 13. Control positivo 24h (10x).

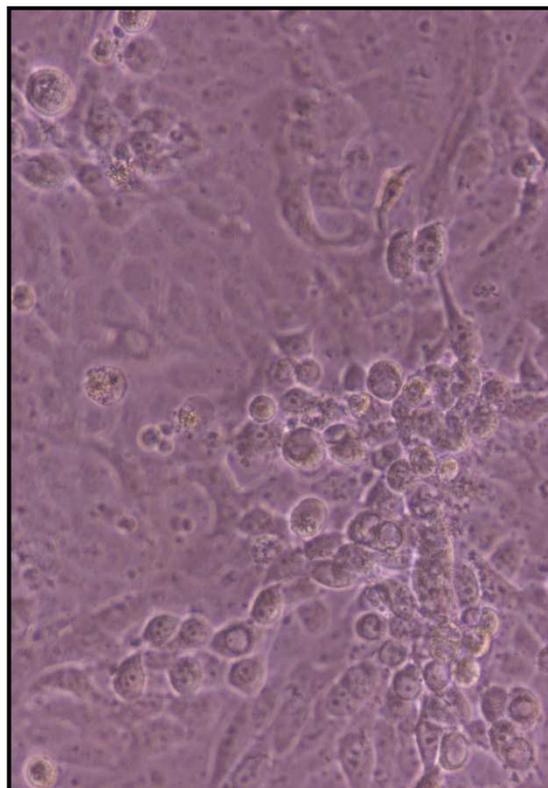


Figura 14. Control positivo 24h (20x).

3.5. AISLAMIENTO DE DNA

Se realizó el procedimiento para la extracción de DNA total por tratamiento con SDS-proteinasa (Tabarés, 1987).

3.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción de amplificación del DNA se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ l con los siguientes reactivos: 1 μ g de DNA total, 1 μ mol de cada iniciador, 200 μ mol de cada dNTP y 2 U de *HotStartTaq* DNA polimerasa, Q-Solution [1x] como aditivo que aumenta la eficiencia de la reacción (QIAGEN® products), QIAGEN PCR Buffer [1x] (QIAGEN® products). La concentración óptima de Mg^{2+} se determinó para cada uno de los genes en estudio mediante la realización de curvas de magnesio.

Se utilizó DNA de HSV-1 cepa F (Ejercito et al., 1968) como control positivo de la reacción y agua destilada como control negativo. El producto amplificado se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0,1 μ g/ml). Para comprobar el tamaño del segmento amplificado se cargó un gel con los productos de la reacción y el marcador de peso molecular de 1 Kb (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen)

3.6.1. Región Exo III de la DNA polimerasa

3.6.1.1. Iniciadores

Para el estudio de la región Exonucleasa III del gen de la DNA polimerasa de amplifiqué un segmento de 403 pb seleccionado aleatoriamente (**Figura 15**).

```

1381 ttcgtgaccg ggtacaacat catcaacttc gactggccct tcttactggc caagctgacg
1441 gacatttaca aggtcccctt ggacgggtac ggccgcatga acggccgggg cgtgtttcgc
1501 gtgtgggaca taggccagag ccacttccag aagcgcagca agataaaggt gaacggcatg
                                HS-E1 →
1561 gtgaacatcg acatgtacgg gattataaacc gacaagatca agctctcgag ctacaagctc
1621 aacgccgtgg ccgaagccgt cctgaaggac aagaagaagg acctgagcta tcgcgacatc
1681 cccgcctact acgccgcggg gcccgcgcaa cgcgggggtga tcggcgagta ctgcatacag
1741 gattccctgc tgggtgggcca gctgtttttt aagtttttgc cccatctgga gctctcggcc
1801 gtcgcgcgct tggcgggtat taacatcacc cgcacatctt acgacggcca gcagatccgc
1861 gtctttacgt gcctgtctgc cctggccgac cagaagggct ttattctgcc ggacacccag
                                ← HS-E1R
1921 gggcgattta ggggcgcccg gggggaggcg cccaagcgtc cggccgcagc cggggaggac
1981 gaggagcggc cagaggagga gggggaggac gaggacgaac gcgaggaggg cgggggagag
    
```

Figura 15 . Fragmento amplificado de la región Exo III de la DNA polimerasa.
Los iniciadores empleados fueron HS-E1 y HS-E1R

3.6.1.2. Programa para la amplificación

El programa de ciclos empleado consistió en una primera etapa de desnaturalización inicial a 95°C/10 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C/1min; anillamiento a 54°C/1min y extensión a 72°C/1min; terminando con una extensión final de a 72°C/7min.

3.6.1.3. Determinación de la concentración óptima de Mg

Se determinó como concentración óptima 1,5 mM (**Figura 16**).

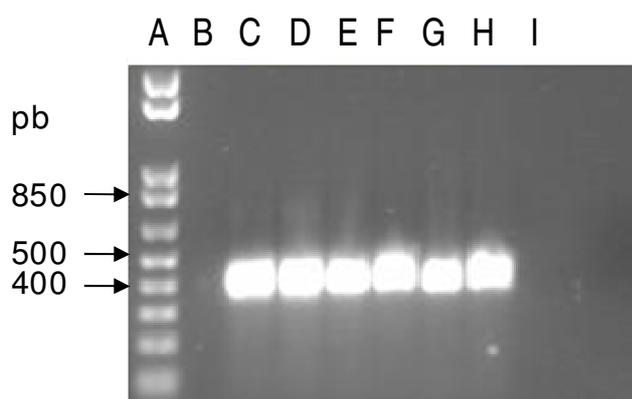


Figura 16. Electroforesis de la curva de Magnesio para la amplificación del segmento Exo III de la DNA Pol.

Se indica con letra por carril el marcador de peso molecular y las concentraciones de Magnesio utilizadas: A: marcador de peso molecular; B: canal vacío; C: 1,5 mM; D: 2 mM; E: 2,5 mM; F: 3 mM; G: 4 mM; H: 5 mM; I: control negativo.

3.6.2. Gen de la glicoproteína gD

3.6.2.1. Iniciadores

Para el estudio del gen de la glicoproteína D se amplificó un segmento del gen de 436 pb seleccionado aleatoriamente. (**Figura 17**).

```

361 accatcgctt ggtttcggat gggaggcaac tgtgctatcc ccatcacggt catggagtag
421 accgaatgct cctacaacaa gtctctgggg gcctgtccca tccgaacgca gccccgctgg
481 aactactatg acagcttcag cgccgtcagc gaggataacc tggggttcct gatgcacgcc
                                                gD11 →
541 cccgcgtttg agaccgccgg cacgtacctg cggctcgtga agataaacga ctggacggag
601 attacacagt ttatcctgga gcaccgagcc aagggtcctc gtaagtacgc cctcccgtg
661 cgcaccccc cgtcagcctg cctgtcccc caggcctacc agcagggggg gacggtggac
721 agcatcggga tgctgcccc ctccatcccc gagaaccagc gcaccgtcgc cgtatacagc
781 ttgaagatcg ccgggtggca cgggcccaag gccccataca cgagcaccct gctgcccccg
841 gagctgtcgg agacccccaa cgccacgcag ccagaactcg ccccgaaga ccccgaggat
901 tcggccctct tggaggaccc cgtggggacg gtggcgccgc aaatcccacc aaactggcac
                                                ← gD12
961 ataccgtcga tccaggagc cgcgacgect taccatcccc cggccacccc gaacaacatg
1021 ggctgatcg ccggcgcggg gggcggcagt ctctggcag cctggtcat ttgcggaatt
    
```

Figura 17 . Fragmento amplificado del gen de la glicoproteína gD.
 Los iniciadores empleados fueron gD11 y gD12.

3.6.2.2. Programa de amplificación

El programa de ciclos empleado consistió en una primera etapa de desnaturalización inicial a 94°C/10 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C/1min; anillamiento a 57°C/1min y extensión a 72°C/1min; terminando con una extensión final de a 72°C/7min.

3.6.2.3. Determinación de la concentración óptima de Mg

Se determinó como concentración óptima 1,5 mM (**Figura 18**).

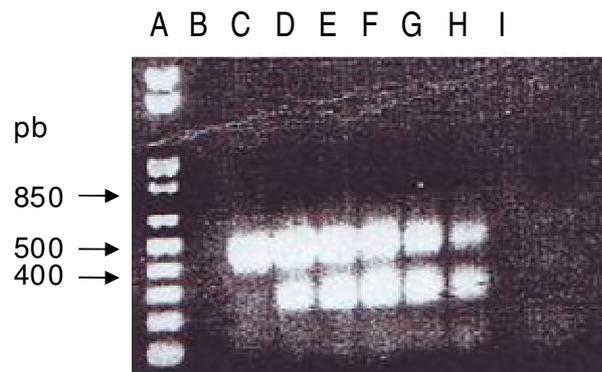


Figura 18. Electroforesis de la Curva de Mg para la amplificación del segmento de la gD. Se indica con letra por carril el marcador de peso molecular y las concentraciones de Magnesio utilizadas: A: marcador de peso molecular; B: canal vacío; C: 1,5 mM; D: 2 mM; E: 2,5 mM; F: 3 mM; G: 4 mM; H: 5 mM; I: control negativo.

3.6.3. Gen de la timidina kinasa

3.6.3.1. Iniciadores

Para el estudio del gen de la TK se amplificó un segmento de 480 pb (**Figura 19**) que contiene el sitio activo de unión a ATP (Darby et al., 1986).

```

241 cagcgtgccg cagatcttgg tggcgtgaaa ctcccgcacc tcttcggcca gcgcttgta
301 gaagcgcgta tggcttcgta ccccgccat caacacgcgt ctgcgttcga ccaggctgcg
361 cgttctcgcg gccatagcaa ccgacgtacg gcgttgcgcc ctgcgccgca gcaagaagcc
421 acggaagtcc gccccgagca gaaaatgcc acgctactgc gggtttatat agacggtccc
      HTK6D →
481 cacgggatgg ggaaaaccac caccacgcaa ctgctggtg ccctgggttc gcgcgacgat
541 atcgtctacg taccgagcc gatgacttac tggcgggtgc tgggggcttc cgagacaatc
601 gcgaacatct acaccacaca acaccgcctc gaccagggtg agatatcggc cggggacgcg
661 gcggtggtaa tgacaagcgc ccagataaca atgggcatgc cttatgccgt gaccgacgcc
721 gttctggctc tccatctcgg gggggagget gggagctcac atgccccgcc cccggcctc
781 accctcatct tcgaccgcca tcccatcgc gccctcctgt gctaccggc cgcgcggtac
841 cttatgggca gcatgacccc ccaggccgtg ctggcgttcg tggccctcat cccgccgacc
      ← HTK6R
901 ttgcccgca ccaacatcgt gcttggggcc cttccggagg acagacacat cgaccgcctg
961 gccaaacgcc agcgcgcccg cgagcggctg gacctggeta tgctggtgc gattcgcgcg
    
```

Figura 19. Fragmento amplificado del gen de la TK. Los iniciadores fueron HTK6D y HTK6R. Enmarcada en color verde se indica la secuencia del sitio activo (Darby et al., 1986).

3.6.3.2. Programa de amplificación

El programa de ciclos empleado consistió en una primera etapa de desnaturalización inicial a 95°C/10 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C/1min; anillamiento a 50°C/1min y extensión a 72°C/1min; terminando con una extensión final de a 72°C/7min.

3.6.3.3. Determinación de la concentración óptima de Mg

Se determinó como concentración óptima 2,5 mM (**Figura 20**).

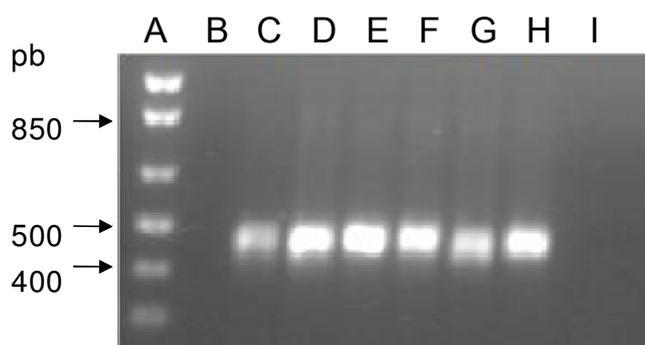


Figura 20. Se observa la Curva de Magnesio para determinar su concentración óptima para la amplificación de la timidina kinasa.

Se indica con letra por carril el marcador de peso molecular y las concentraciones de Magnesio utilizadas: A: marcador de peso molecular; B: canal vacío; C: 1,5 mM; D: 2 mM; E: 2,5 mM; F: 3 mM; G: 4 mM; H: 5 mM; I: control negativo.

3.6.4. Reamplificación

Con el fin de obtener concentraciones adecuadas para la secuenciación del DNA amplificado se practicó procedimiento de reamplificación utilizando los mismos iniciadores y programas de ciclos para cada uno de los genes estudiados.

3.7. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

Previo a la secuenciación de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo su purificación con el objetivo de eliminar todas las impurezas tales como: sales, iniciadores y dNTPs no incorporados. Para tal efecto se utilizó el sistema de filtro de membrana denominado *Montage PCR KIT, Single Sample PCR Cleanup (MILLIPORE Corporation)*.

El procedimiento se realiza insertando el tubo que posee la membrana en un vial, seguidamente se agrega al tubo una solución de TE o agua destilada que ajuste un total de 400µl junto con la muestra, sin tocar la membrana. Se centrifuga a 1000xg durante 15 min. Se separa el tubo con la membrana del vial. El ADN purificado permanece en la membrana, para recobrar el DNA purificado se introduce el tubo en un vial limpio y agregar 20 µl de TE o agua destilada, se invierte el tubo en el mismo vial y se centrifuga a 1000xg durante 2 min (**Figura 21**). Se comprueba la concentración de DNA amplificado por electroforesis en gel de agarosa.

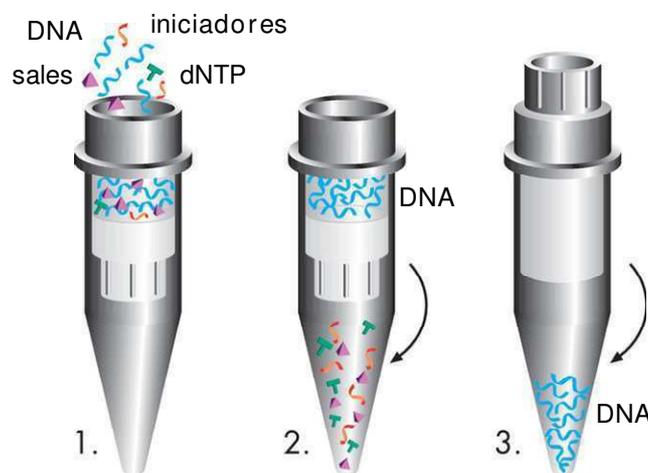


Figura 21. Purificación de los productos de la amplificación previo a la secuenciación.

- (1) Producto de la PCR cuyo contenido incluye, además del DNA amplificado, sales, iniciadores y dNTPs; (2) el ADN permanece en el tubo entre la membrana separado de los demás componentes; (3) resuspensión del DNA.

3.8. SECUENCIACIÓN Y ANALISIS DE DNA

Se realizó la secuenciación automática de los productos de la amplificación en el Departamento de Secuenciación del Servicio Inter Disciplinario de Investigación (S.I.D.I) de la Universidad Autónoma de Madrid. El análisis comparativo entre secuencias obtenidas de los clones virales estudiados se llevo a cabo utilizando el programa Gene Jockey. El análisis comparativo con secuencias de cepas de HSV-1 reportadas por otros autores se realizó por homología con el programa BLAST utilizando la base de datos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

3.9. ESTUDIO DE LA NEUROVIRULENCIA EN MODELO MURINO.

3.9.1. Titulación de los clones

La titulación de los Clones virales obtenidos se realiza por el método de Dosis Infecciosa para 50 % de los cultivos celulares (TCD₅₀). Se siembran células Vero a una concentración de 20 000 células por pocillo en un volumen de 100µl de medio en microplacas de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano. Se realizaron diluciones seriadas con factor de 10 del virus problema. Se agregó un volumen de 50µl de la correspondiente dilución a cada pocillo, este paso se realizó por cuadruplicado. Se incubó a 37° C al 5% de CO₂ durante 48 a 72 horas. Se realizó el recuento de los pocillos con focos al microscopio óptico. Cálculo de la TCD₅₀ por el método de Reed-Muench (Reed y Muench, 1938).

3.9.2. Ensayo biológico

Se practicó el ensayo biológico a la cepa de referencia HSV-1 F y a cuatro clones virales de la población final para la comparación de la neurovirulencia producida en el modelo murino. Estas cepas fueron previamente tituladas para calcular la dosis infecciosa 50% en cultivos de tejidos (TCD₅₀). Para el ensayo de la neurovirulencia, se utilizaron ratones CD1 hembras de seis semanas de vida, los cuales se mantuvieron una

semana en cuarentena. Por cada cepa se hicieron diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Se inocularon 5 ratones por cada dilución, lo que constituyo 20 ratones por cepa.

Los ratones se anestesiaron por la vía intraperitoneal mediante administración de 2mg de ketamina+0,2 mg de xylacina. Cada dilución viral se inoculó en 5 ratones a razón de 10 μ l por ratón y se administró por la vía intracraneal utilizando jeringuillas de tuberculina con aguja de 30 G. Se registró diariamente el número de animales muertos durante 3 semanas. Se analizaron los datos aplicando el método de Kärber (Kärber, 1931).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DE LA CLONACIÓN

4.1.1. Poblaciones del estudio.

Los clones iniciales o clones parentales se obtuvieron a partir de una población original representada por el HSV-1 cepa F (Ejercito et al, 1968). Se aislaron 23 clones parentales, identificados como sigue: A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1, I1, J1, K1, L1, M1, N1, O1, P1, Q1, R1, S1, T1, V1, W1 y Y1. Los clones finales o clones transferidos se obtuvieron por pases sucesivos a partir de cada clon 1 y está formada por los clones A10, B10, C10, D10, E10, F8, G10, H10, I10, J10, K10, L10, M10, N10, O10, P10, Q10, R2, S10, T10, V10, W10 y Y10 (**Figura 22**).

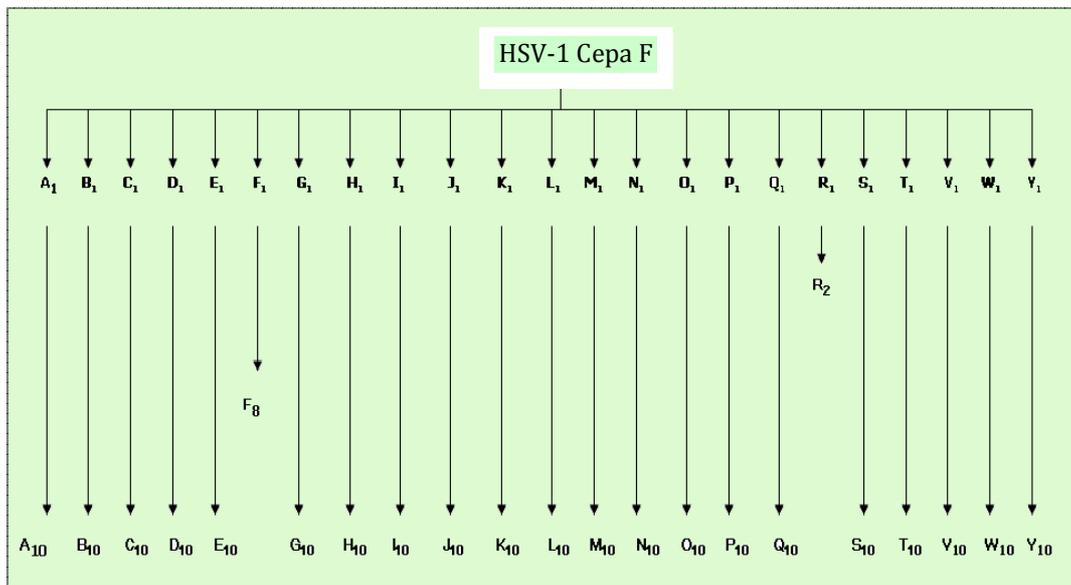


Figura. 22. Diagrama de los clones víricos obtenidos.

Se observa que a partir de la cepa de referencia, HSV-1 cepa F, se obtienen por pases sucesivos 23 clones 1, los que representan los clones iniciales o parentales, identificados como sigue: A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1, I1, J1, K1, L1, M1, N1, O1, P1, Q1, R1, S1, T1, V1, W1, Y1. Cada uno representa el primer clon de una serie identificada con una letra y fue pasado sucesivamente 9 veces hasta obtener los clones finales o transferidos (clones 10). Nótese que la serie F solo logró ser transferido hasta F8 y la serie R hasta R2. Se consideran como clones transferidos los clones A10, B10, C10, D10, E10, F8, G10, H10, I10, J10, K10, L10, M10, N10, O10, P10, Q10, R2, S10, T10, V10, W10, Y10.

Dentro de la serie clonal F encontramos que luego del octavo pase sucesivo y la obtención del clon F8 no fue posible continuar con la obtención de clones ya que no se produjeron focos a partir del clon F8 en células 143tk-. Igual situación se produjo dentro de serie clonal R, aunque de manera más temprana, ya que no se produjeron focos en los pases sucesivos a partir del clon R2. Podemos suponer que en estas dos series clonales se verificó una disminución en su capacidad de producir progenie infecciosa. Debido a que entre los clones F y R no fue posible realizar pases sucesivos hasta el clon número diez, como estaba previsto los clones F8 y R2 constituyen los clones transferidos o finales de sus series respectivas.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS CLONES EN CULTIVOS CELULARES

Durante los pases sucesivos detectamos cambios en el crecimiento del virus y cambios en la morfología de los focos de infección que produjeron. Observamos diferencias entre las series clonales con respecto a las características morfológicas de sus focos de infección tales como número, tamaño y período de incubación para la presentación de los focos.

Con el fin de comprobar de una forma cuantitativa que el cuello de botella a que habíamos sometido las diferentes series clonales tenía un efecto sobre la adaptación de ellas al cultivo celular, a partir del tercer pase, los clones obtenidos fueron titulados según el apartado 3.4.3 del capítulo Materiales y Métodos. Considerando todas las series en su conjunto, podemos observar en la **Figura 23** la evolución de las medias y medianas de las titulaciones obtenidas en los clones virales durante los pases sucesivos, a partir del tercero. La disminución progresiva de las medias de los títulos obtenidos resultó estadísticamente significativa ($P= 0,016$, Kruskal-Wallis; lo mismo que las medianas ($P= 0,014$, Test de las medianas). El efecto extremo de este fenómeno correspondió a dos series clonales, la F y la R que perdieron su capacidad de infectar a las células 143tk- antes del décimo pase.

De forma cualitativa, el cuello de botella también afecto a la velocidad de crecimiento de los clones, reflejada en el tamaño de los focos de efecto citopático; aunque no a todas las series de la misma manera.

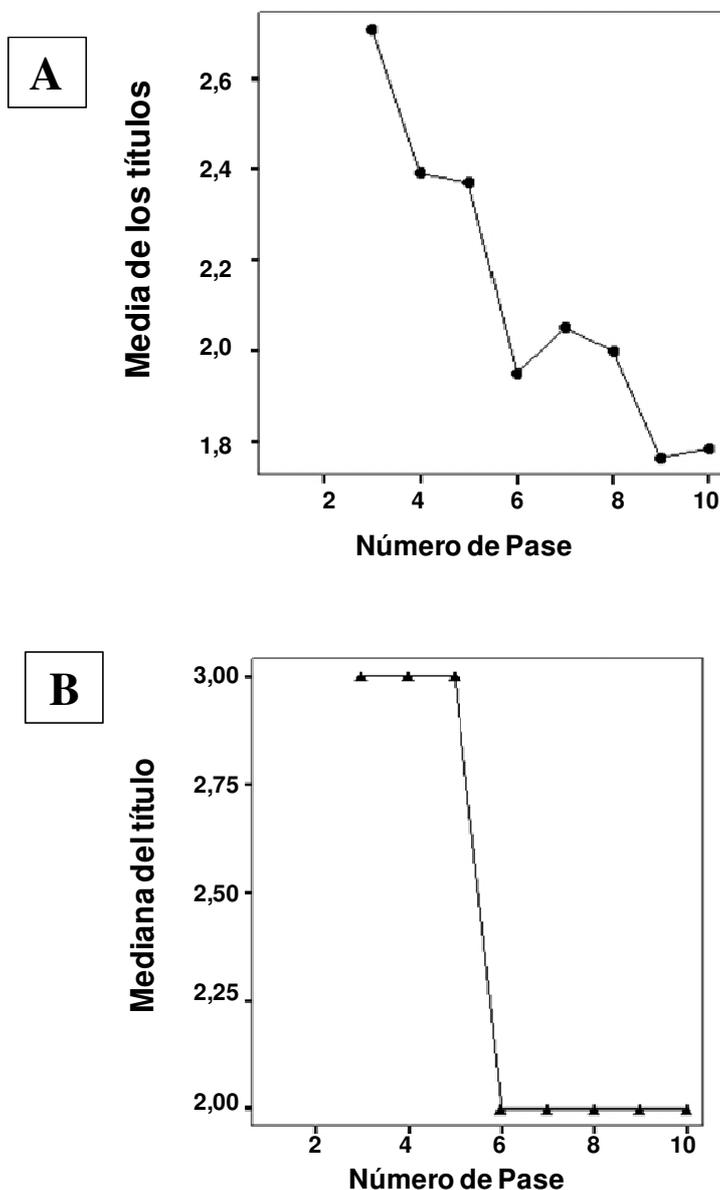


Figura 23. Análisis estadístico de la evolución del título viral de todas las series durante el proceso de clonación.

A: Evolución de la media de los títulos obtenidos en la línea celular 143 a partir del pase 3. La disminución progresiva de los títulos fue estadísticamente significativa ($P=0,016$ Kruskal-Wallis).

B: Evolución de la mediana de los títulos obtenidos en la línea celular 143 a partir del pase 3. La disminución progresiva de los títulos fue estadísticamente significativa ($P=0,014$ Test de las medianas.).

4.2.1. Series clonales en que no se detectan cambios durante el proceso de pases sucesivos.

No se detectaron cambios aparentes en 16 de un total de 23 series clonales durante el proceso de pases sucesivos. Las series clonales A, B, C, D, E G, H, I, J, K, O, Q, S, T, V, Y mostraron una velocidad de crecimiento constante así como tamaño de los focos de efecto citopático observados con igual tiempo de incubación, similar a la cepa original.

4.2.2. Series clonales en que se detecta una disminución en su capacidad de infectar células 143tk- .

Durante el proceso de pases sucesivos observamos en 6 series clonales: F, M, N, P, R, W, una disminución en su capacidad de producir focos de infección en células 143 tk-.

Las series F y R no pudieron ser transferidas hasta el último pase sucesivo, logrando obtener de la serie F sólo hasta el octavo pase, clon F8, y se la serie R sólo hasta el segundo, clon R2.

Las series M, N, P, W pudieron ser transferidas hasta lograr el último pase sucesivo, clones 10, sin embargo mostraron una disminución en el tamaño de los focos de infección y aumento en el período de incubación.

4.2.3. Serie clonal donde se detecta un incremento en su capacidad de infectar células 143tk-.

Por último en una de las series clonales, la serie L, se observó un aumento en el tamaño de los focos de infección que se presentaron a las 48 horas de la incubación.

4.2.4. Inoculación de clones en células 143tk- y células Vero.

De dos series clonales que demostraron una disminución en su capacidad de formar focos en células 143tk-, series N y M, se realizó inoculación en células Vero (**Figura 24**). Observamos que en células Vero, el número y tamaño de focos se incrementó, así como, el tiempo de presentación de los focos disminuyó de 72 a 48 horas.

Observemos la morfología de los focos del clon N9 en el noveno pase sucesivo en células 143tk- (**Figura 25 A**) y como se modifica al ser cultivada en células Vero aumentando notablemente el tamaño de los focos de infección (**Figura 24 B**). Al realizar el mismo procedimiento con la serie clonal M observamos que en células 143tk- los focos se observan reducidos en su tamaño (**Figura 26 A**) sin embargo en células Vero los focos de infección se presentan con un notable aumento de tamaño (**Figuras 26 B**).

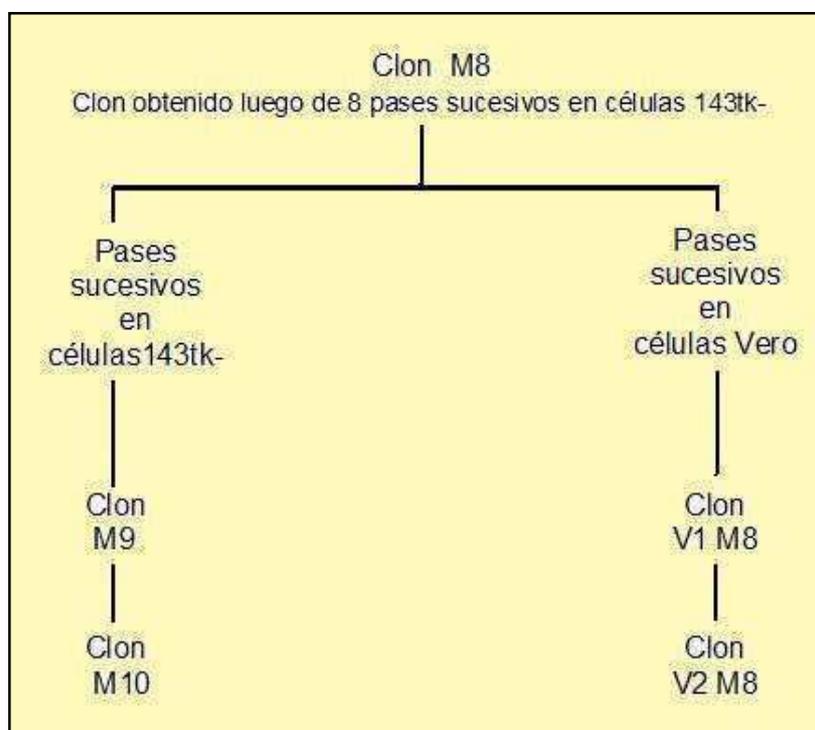


Figura 24. Denominación asignada a los clones durante el ensayo de pases en dos líneas celulares simultáneamente, 143tk- y Vero.

Nótese que en el presente ejemplo el clon M8, obtenido a través de pases en células 143tk-, luego de su primer pase en células Vero se le agrega V1 a su denominación, lo que indica que el clon M8 ha sido pasado una vez en células Vero obteniendo el clon V1 M8, éste mismo clon al ser nuevamente pasado en células Vero se le denomina V2 M8, indicando que ha sido pasado 2 veces en células Vero

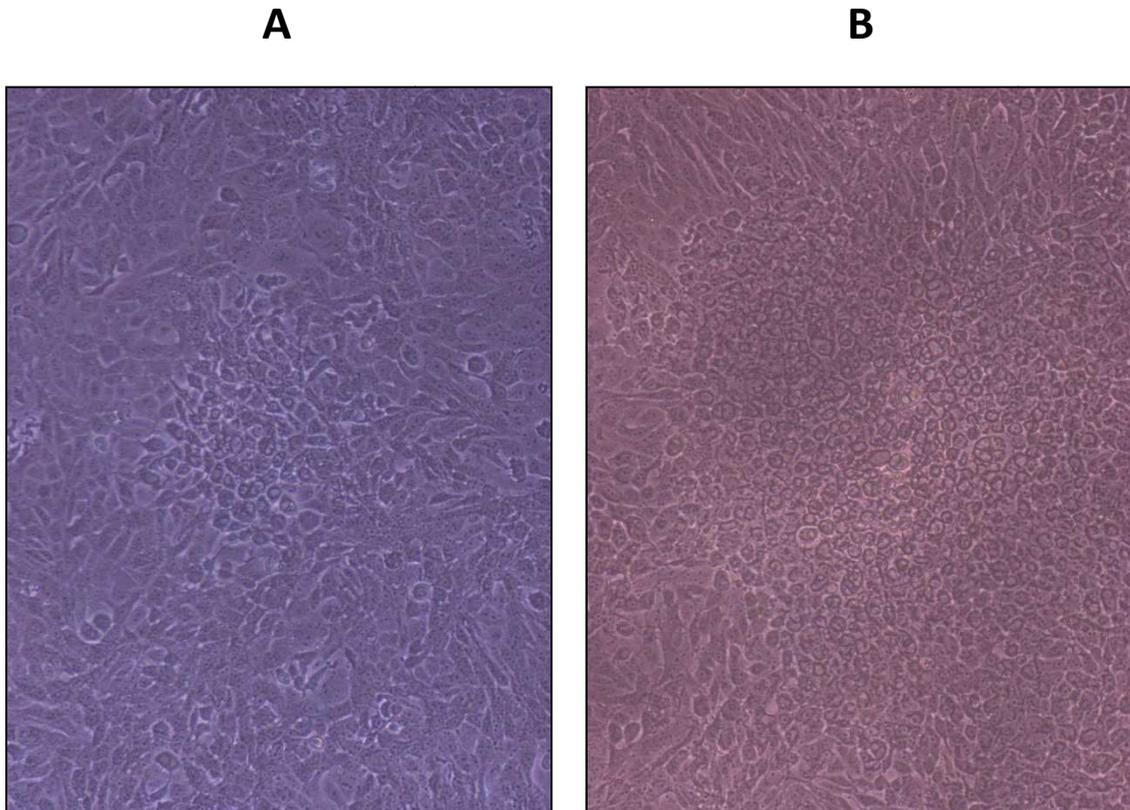


Figura 25. Comparación entre focos de infección producidos por virus clonales de la serie N.

Se observa un virus debilitado en células 143tk- que al inocularse en células Vero recupera su capacidad de infectar las células. Foto A: Clon N9 72h (10x). Foto B: Clon V1 N9 48h (10x).

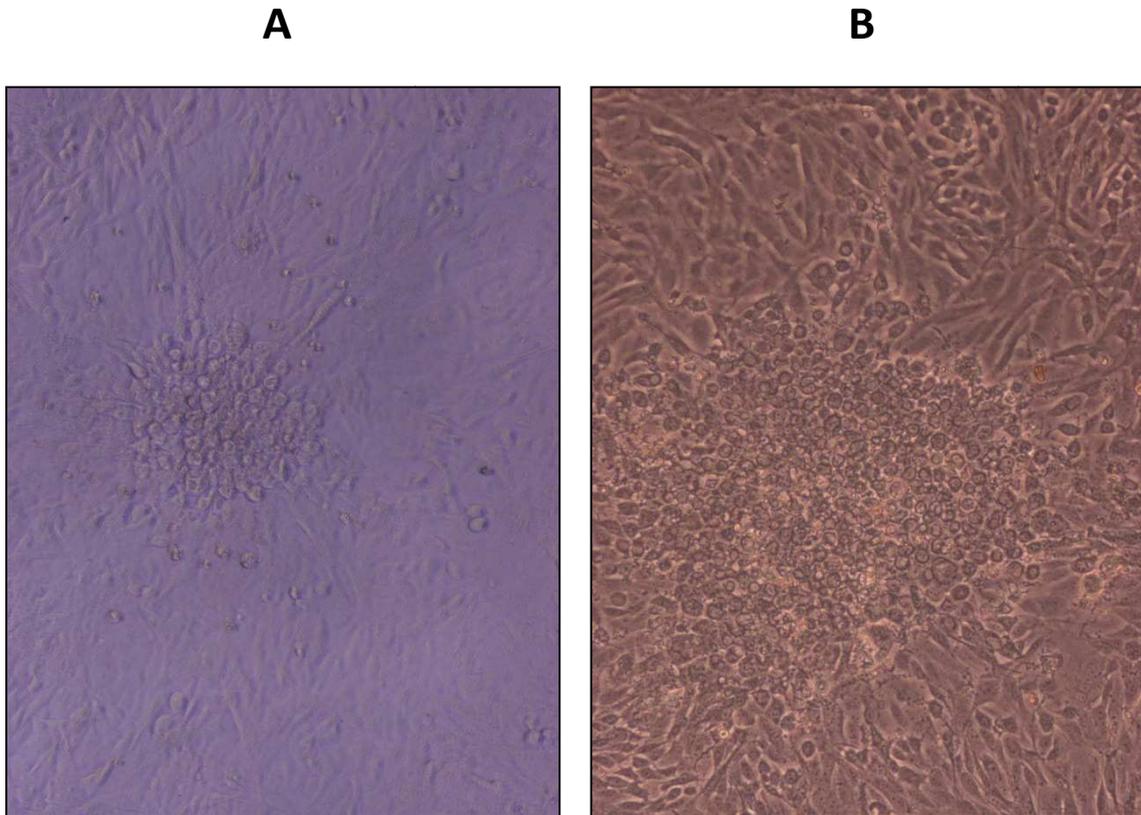


Figura 26. Comparación entre focos de infección producidos por clones de la serie M.

Se observa un virus debilitado en células 143tk- que al inocularse en células Vero recupera su capacidad de infectar las células. Foto A: Clon M8 72h (10x). Foto B: Clon V1 M8 48h (10x)

4.2.5. Comprobación del efecto del agar en la pérdida de la infectividad de los Clones en cultivo celular.

Con el objetivo de verificar que los clones de las series F, M, N y R efectivamente se habían visto afectados en su infectividad para la línea celular 143tk-y que no era un artefacto producido por la presencia de agar en el medio, procedimos a realizar pases paralelos en células 143tk⁻ y células Vero sin agregar agar al medio de cultivo.

Los resultados observados a las 48 y 72 horas de incubación fueron similares a los obtenidos durante los pases sucesivos de estas series de clones y demuestran que la disminución de su capacidad de producir focos o producir infección no obedecen a la presencia de agar en el medio (**Tabla 2**).

Clon	Células 143tk-		Células Vero	
	48h	72h	48h	72h
F7	<i>neg</i>	<i>1 foco</i>	<i>neg</i>	<i>1 foco</i>
M8	<i>neg</i>	<i>1 foco</i>	<i>>1</i>	<i>>1</i>
N9	<i>1 foco</i>	<i>1 foco</i>	<i>neg</i>	<i>1 foco</i>
R2	<i>neg</i>	<i>neg</i>	<i>neg</i>	<i>neg</i>

Tabla 2. Resultados de la Inoculación paralela de clones en dos líneas celulares sin adición de agar.

Se indica la observación de focos de infección a las 48h y 72h de la inoculación en células 143tk y células Vero sin la adición de agar en el medio de los clones de las series F, M, N y R.

4.3 RESULTADOS DE LA AMPLIFICACIÓN

4.3.1. Región Exo III de la DNA polimerasa.

Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa, que se le realizó a los clones iniciales y finales, se ponen de manifiesto al realizar la electroforesis en gel de agarosa observando la presencia de bandas correspondientes a 403 pb, tamaño del segmento amplificado para la región exo III de la DNA Pol.

En algunos clones no se logró obtener la concentración necesaria de DNA para la secuenciación. Tal fue el caso de los clones A1, C1, J1, A10, C10 y J10 que, como vemos en la **Figura 27 A**, presentaron bandas muy débiles a la electroforesis que corresponden a concentraciones de DNA bajas.

Sin embargo estos clones alcanzan niveles óptimos de DNA para la secuenciación luego de realizar un procedimiento de reamplificación al primer producto de PCR (**Figura 27 B**).

Se observan los productos de la amplificación purificados en la **Figura 27 C**.

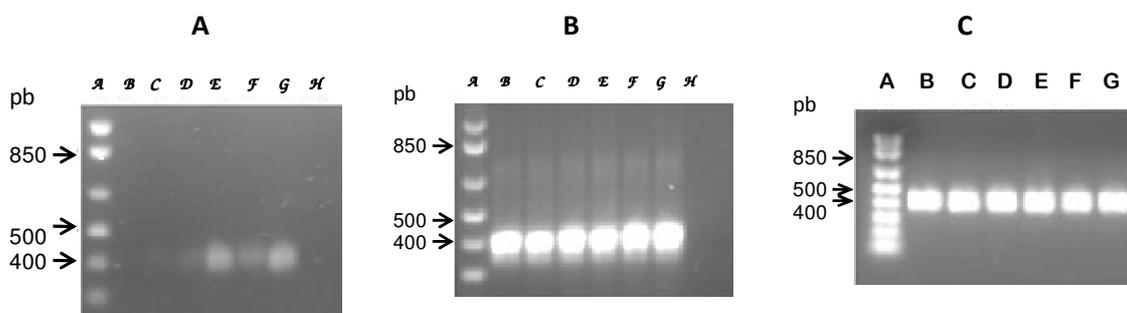


Figura 27. Electroforesis de los resultados de amplificación, reamplificación y purificación para la región Exo III de la DNA Pol.

- A:** Amplificación. En los canales A y H se encuentran el marcador de peso molecular y control negativo respectivamente. En los canales del B al G se encuentran A1, C1, J1, A10, C10, J10.
- B:** Reamplificación. En los canales A y H se encuentran el marcador de peso molecular y control negativo respectivamente. En los canales del B al G se encuentran A1, C1, J1, A10, C10, J10.
- C:** Purificación A1, C1, J1, A10, C10, J10.

4.3.2. Gen de la glicoproteína D.

Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa, que se le realizó a los clones iniciales y finales, se ponen de manifiesto al realizar la electroforesis en gel de agarosa observando la presencia de bandas correspondientes a 436 pb, tamaño del segmento amplificado para el gen de la glicoproteína gD.

En algunos clones no se logró obtener la concentración necesaria de DNA para la secuenciación. Tal fue el caso de los clon A1 y C1 que podemos observar en la **Figura 28A**, presentaron bandas muy débiles a la electroforesis que se corresponden con concentraciones de DNA bajas. Vemos en la misma figura que los clones J1, A10, C10 y J10 muestran una mayor concentración por lo cual no fueron reamplificadas. Los clones A1 y C1 alcanzan niveles óptimos de DNA para la secuenciación luego de realizar un procedimiento de reamplificación al primer producto de PCR (**Figura 28B**). Se observan los productos de la amplificación purificados en la **Figura 28C**.

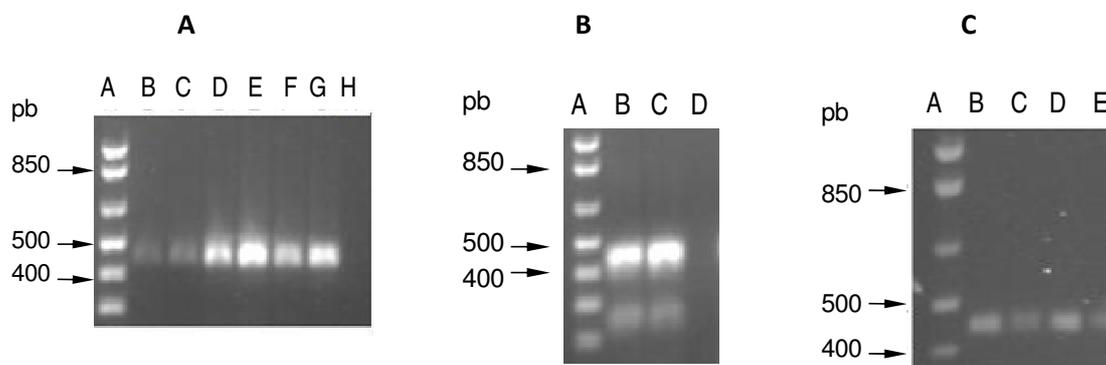


Figura 28. Electroforesis de los resultados de la amplificación, reamplificación y purificación para el gene de la gD.

A: Amplificación. En los canales A y H se encuentran el marcador de peso molecular y control negativo respectivamente. En los canales del B al G se encuentran A1, C1, J1, A10, C10, J10.

B: Reamplificación. En los canales A y D se encuentran el marcador de peso molecular y control negativo respectivamente. En los canales del B y C se encuentran A1, C1.

C: Purificación A1, C1, J1, A10.

4.3.3. Gen de la timidina kinasa

Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa, que se le realizó a los clones iniciales y finales, se ponen de manifiesto al realizar la electroforesis en gel de agarosa observando la presencia de bandas correspondientes a 480 pb, tamaño del segmento amplificado para el gen de la timidina kinasa.

En la **Figura 29A** se muestran los productos de la amplificación de los clones A1, C1, J1, A10, C10 y J10. Se puede apreciar que A1 y C1 presentaron bandas muy débiles a la electroforesis que corresponden a concentraciones de DNA bajas. Éstos clones alcanzan niveles óptimos de DNA para la secuenciación luego de realizar un procedimiento de reamplificación al primer producto de PCR (**Figura 29 B**). Se observa los productos de la amplificación purificados en la **Figura 29 C**.

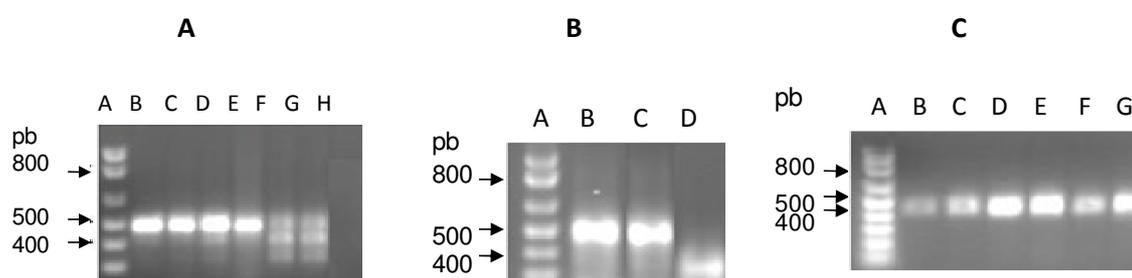


Figura 29. Electroforesis de los resultados de la amplificación, reamplificación y purificación para el gen de la timidina kinasa.

A: Amplificación. En los canales A y H se encuentran el marcador de peso molecular y control negativo respectivamente. En los canales del B al E se encuentran A10, C10, J10 y J1; canales F y G clones A1 y C1 respectivamente.

B: Reamplificación. En los canales A y D se encuentran el marcador de peso molecular y control negativo respectivamente. En los canales del B y C se encuentran A1, C1.

C: Purificación A1, C1, J1, A10, C10, J10.

4.4. RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN

4.4.1 Análisis de las secuencias obtenidas.

En la **Tabla 3** se puede apreciar un resumen de las mutaciones que se verificaron luego de los pases sucesivos entre los clones iniciales y los clones finales con respecto a los genes estudiados. Vemos que en la región Exo III de la DNA polimerasa no se presenta ninguna variación, por lo que podemos suponer que es una región muy conservada del virus.

Genes	Serie	Posición de Nucleótido	Población Viral Original (Cepa F)	Población Inicial (Clones 1)	Población Final	Cambio de Codón	Cambio de Amino Acido
gD	K	720	C	C	(10) T	GAC → GAT	Asp (D) → Asp (D)
	F	867	G	A ^a	(8) A ^b	ACG → ACA	Thr (T) → Thr (T)
TK	B	511	T	T	(10) A	TGC → AGC	Cys (C) → Ser (S)
	E	511	T	T	(10) A	TGC → AGC	Cys (C) → Ser (S)
	G	511	T	T	(10) A	TGC → AGC	Cys (C) → Ser (S)
	H	511	T	T	(10) A	TGC → AGC	Cys (C) → Ser (S)
	K	511	T	T	(10) A	TGC → AGC	Cys (C) → Ser (S)
	T	511	T	T	(10) A	TGC → AGC	Cys (C) → Ser (S)
	P	511	T	T	(10) A	TGC → AGC	Cys (C) → Ser (S)
	O	511	T	T	(10) A	TGC → AGC	Cys (C) → Ser (S)

Tabla 3. Caracterización de las variaciones encontradas en las regiones amplificadas de los genes estudiados.

Se observan las variaciones obtenidas en cuanto a nucleótido, codón y aminoácido entre la población original representada por la Cepa F, los clones iniciales o padres (clones 1) y los clones finales o transferidos. ^a Nótese que en la serie F la variación se presenta desde el clon 1. ^b En la serie F solo se logró llegar al octavo pase sucesivo, lo cual se indica entre paréntesis. No se detectaron mutaciones en la región exo III del gen de la polimerasa de DNA.

En cuanto al segmento amplificado de la gD obtuvimos en la serie clonal K en el clon K10 una sustitución de timina por citosina en la posición 720 del gen el cual se pudo observar en la lectura con ambos iniciadores. Esta sustitución resulta en una mutación silenciosa ya que aunque produce un cambio en el correspondiente codón de GAC para GAT no altera el aminoácido que codifica el ácido aspártico (asp).

Otra mutación silenciosa que se obtuvo en el análisis de las secuencias de la gD se observó en el grupo de clones F en el nucleótido 867 del gen donde se sustituye adenina por guanina cambiando el codón de ACG para ACA los cuales codifican para el aminoácido treonina (thr). En esta serie clonal la detección de esta variación se produjo a partir del clon F1 donde se leyó con ambos iniciadores y se observó también en el clon F8 donde se leyó con el iniciador directo. El resultado obtenido con la serie clonal F demuestra que, como era previsible, la cepa de referencia F (Ejercito et al., 1968) constituye una población heterogénea y que esta variación está formando parte de ella, aunque sea minoritaria.

En el caso de la timidina kinasa encontramos una sustitución de adenina por timina en el nucleótido 511 del gen en los clones B10, E10, G10, H10, K10, T10, P10 y O10 que produce una variación del codón de TGC para AGC el cual se traduce en un cambio de aminoácido de cisteína (cys) para serina (ser).

4.4.2. Frecuencia y tasa de las mutaciones espontáneas obtenidas

Las mutaciones observadas quedan reflejadas en la **Tabla 3** donde se aprecia que en la región estudiada de la DNA Pol no se detectan mutaciones, en el fragmento de la gD estudiado se detectaron 2 mutaciones y en el fragmento estudiado de la TK se detectaron 8 mutaciones, si bien fue la misma en todos los casos. En la **Tabla 4** se refleja la frecuencia de mutaciones observada, definida como: número de mutaciones detectadas/ número total de nucleótidos secuenciados

La frecuencia de mutaciones en el fragmento de la polimerasa es inferior a $1,08 \times 10^{-4}$ sustituciones por nucleótido; de $1,9 \times 10^{-4}$ sustituciones por nucleótido en el fragmento de la gD y, se consideran las 8 mutaciones repetidas del fragmento de la TK como una sola, si la frecuencia de mutaciones del fragmento de la TK secuenciado es de $9,06 \times 10^{-5}$ sustituciones por nucleótido. Extrapolando los datos obtenidos a la totalidad del genoma y asumiendo una tasa media de mutaciones. La tasa de mutaciones por genoma completo y pase de HSV tipo 1 sería de 1,5 sustituciones por genoma y pase.

Genoma del HSV-1	Gen	Tamaño del Gen	Zona Amplificada	Nucleotidos Totales Secuenciados	Frecuencia de Mutaciones
152 260 pb	gD	1 185 pb	436 pb	10 028	$1,99 \times 10^{-4}$
	TK	1 131 pb	480 pb	11 040	$9,06 \times 10^{-5}$

Tabla 4. Frecuencia de mutaciones.

Se reportan la frecuencia de mutaciones y los nucleótidos secuenciados por cada gen estudiado. Se observa información relevante como tamaño del genoma completo del HSV-1, tamaño de cada gen y tamaño de cada zona amplificada. En el gen de la DNA polimerasa no se detectaron mutaciones.

4.5. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS CLONES EN CULTIVOS

CELULARES

En la **Tabla 5** se pueden observar comparativamente los títulos de los clones finales de las series Q y S, que fueron seleccionados ya que no mostraron cambios aparentes en la morfología de los focos durante los pases sucesivos ni mostraron cambios en las secuencias de ninguno de los genes estudiados y de los clones de las series F y R que mostraron una disminución en su capacidad de infectar células 143tk⁻ durante los pases sucesivos.

Clon S10	$4,3 \times 10^6 \times \text{TCD}_{50}$
Clon Q10	$2 \times 10^6 \times \text{TCD}_{50}$
Clon F8	$9,3 \times 10^3 \times \text{TCD}_{50}$
Clon R2	$2 \times 10^7 \times \text{TCD}_{50}$

Tabla 5. Resultados de la titulación por el método de dosis infecciosa 50 en cultivos de tejido de clones finales o transferidos.

Se aprecian los títulos de clones de la población final de manera comparativa entre las series Q y S que lograron el pase 10; y de las series F y R que se mostraron afectados durante el Plaqueo.

Además durante el proceso de titulación realizado en células Vero cada uno de los virus mostró un comportamiento diferente en cuanto a su desarrollo en la monocapa de células:

- § Cepa F o población original: crece con rapidez y desarrolla abundantes sincitios (**Figura 30 A**).
- § Clon R2: produce algunos pocos y pequeños sincitios (**Figura 30 B**).
- § Clon Q10: crecimiento en términos de tiempo es igual al S10, sin embargo no produce sincitios (**Figura 30 C**).
- § Clon S10: de crecimiento un poco lento, sin embargo se muestra como gran productor de sincitios (**Figura 30 D**).
- § Clon F8: su crecimiento es muy lento y no produce sincitios (**Figura 30 E**).

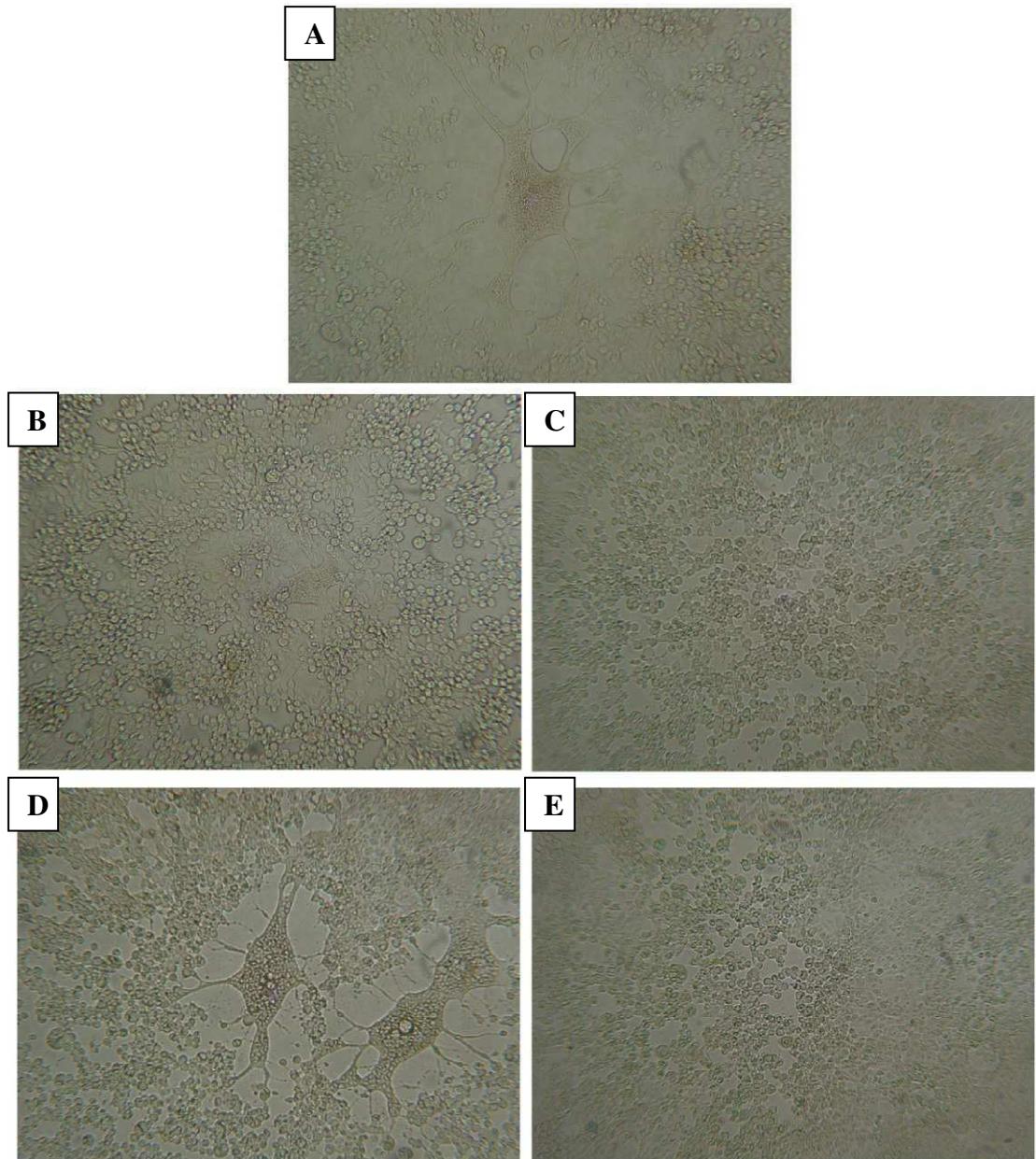


Figura 30. Diferencias de crecimiento de cuatro clones finales o transferidos comparados con la Cepa F o población original observadas durante la titulación en células Vero.

A: Crecimiento de la Cepa F o población original a 48 horas de incubación. Se aprecia la formación de grandes sincitios. **B:** Crecimiento del Clon R2 a las 48 horas de incubación. Se aprecian focos pequeños y formación de pequeños sincitios. **C:** Crecimiento del Clon Q10 a las 48 horas. Nótese la formación de grandes focos similares a aquellos de la población original pero sin la formación de sincitios. **D:** Crecimiento del Clon S10 a las 48. Se aprecia la formación de grandes focos similares a aquellos de la población original (Cepa F) y la formación de grandes sincitios. **E:** Crecimiento del Clon F8 a las 96 horas de incubación. Nótese la formación de pequeños focos a pesar del largo período de incubación y la ausencia de sincitios.

4.6. ENSAYO BIOLÓGICO

4.6.1. Determinación de la neurovirulencia en el modelo murino.

La neurovirulencia de cuatro clones finales fue comparada con la de la población original representada por la cepa de referencia F, origen de todos los clones mediante el cálculo de la dosis letal 50% (DL₅₀) expresadas.

Se determinó la neurovirulencia en el modelo ratón de cuatro de los clones virales pertenecientes a la población final: S10, Q10, F8 y R2. Los clones S10 y Q10 representan aquellos que lograron ser llevados hasta el último pase y que fueron transferidos un total de diez veces en células 143tk⁻ sin presentar pérdida o alteraciones en su capacidad de infectar células. Por otra parte los clones F8 y R2 representan a las series clonales que presentaron una pérdida más notoria de su capacidad de infección para la línea 143 tk⁻, de manera que sólo pudieron ser llevadas hasta el pase número ocho y número dos respectivamente. Se calculó la dosis letal 50% (DL₅₀) mediante el método de Kärber una vez obtenidos los datos experimentales de mortalidad en los diferentes grupos de ratones (**Tabla 6**).

Cepa F	$3,7 \times 10^2 \times \text{TCD}_{50}$
Clon S10	$3,2 \times 10^2 \times \text{TCD}_{50}$
Clon Q10	$1,9 \times 10^2 \times \text{TCD}_{50}$
Clon F8	$3,5 \times 10^2 \times \text{TCD}_{50}$
Clon R2	$1,1 \times 10^3 \times \text{TCD}_{50}$

Tabla 6. Resultados del ensayo biológico en ratones CD1.

Se aprecian los resultados de manera comparativa entre la población original, representada por la cepa de referencia F y una selección de clones transferidos: S10, Q10, F8, R2..

Observamos que todos los clones finales muestran una atenuación de la neurovirulencia en el modelo murino. Sin embargo el grado de atenuación que muestran difiere para cada uno de ellos, siendo el clon R2 el más atenuado en el modelo de ratón, con una DL_{50} 30 veces mayor que la correspondiente a la población viral original, representada por la cepa de referencia F.

DISCUSIÓN

5. DISCUSION

5.1. APLICACIÓN DEL CUELLO DE BOTELLA GENETICO A UNA POBLACIÓN DE HSV-1

A partir del HSV-1 F han sido obtenidas, mediante pases sucesivos aplicando cuello de botella genético, los clones iniciales o clones parentales y los clones finales o clones transferidos. Con ello se alcanza el primer objetivo de este trabajo. En nuestro conocimiento no se han comunicado estudios previos para determinar la forma en que opera el Trinquete de Müller en el HSV-1. Sin embargo se conocen estudios en este sentido realizados en diversos microorganismos tales como: bacteriófago $\phi 6$ (Chao, 1990), patógenos virales humanos y animales (Duarte et al., 1993; Elena et. al., 1996; Escarmís et al., 1996; Yuste et al., 1999; Escarmís et al., 2008), virus que afectan diversos cultivos como son el virus del maíz o “maize streak virus” (MSV) (Isnard et al., 1998) y el virus del tabaco o “tobacco etch virus” (TEV) (De La Iglesia y Elena, 2007) así como en la bacteria *Salmonella thyphimurium* (Andersson y Hughes, 1996), entre otros.

La forma en que la variabilidad genética afecta a los DNA virus comparadamente con los RNA virus es un problema que se mantiene pendiente de respuesta desde el enfoque de la virología evolutiva (Domingo et al., 2001). En este estudio se procedió a aplicar un cuello de botella genético a una población de HSV-1 mediante pases sucesivos de placa con el fin de evaluar las consecuencias de este régimen de pases en cuanto al *fitness* viral, la acumulación de mutaciones y las posibles alteraciones biológicas del virus.

Hemos observado que se produce una disminución de su capacidad de infectar células al aplicar el cuello de botella genético, cuantificada por la disminución progresiva de los títulos obtenidos en células 143tk-, a medida que aumentaba el número de pases, lo que concuerda con otros estudios que concluyen: (i) se observa una sustancial declinación de la *fitness* en el virus del mosaico del tabaco (TEV) como consecuencia de la aplicación del trinquete de Müller (De La Iglesia and Elena, 2007);

(ii) el trinquete de Müller produce una obvia pérdida de la *fitness* en *Salmonella thyphimurium*, la cual fue determinada a través de la observación de su descenso en la tasa de crecimiento (Andersson y Hughes, 1996).

Las modificaciones que presenta un microorganismo en su capacidad de replicarse o *fitness* se encuentra fuertemente influenciada por el tamaño de las poblaciones que participan en el proceso de infección. Resultados experimentales documentan que diferentes RNA virus con frecuencia experimentan un incremento en la *fitness* durante pases de poblaciones virales grandes (Clarke et al., 1993; Novella et al., 1995a). Sin embargo los eventos del tipo cuello de botella genético conllevan, en diversos microorganismos, su pérdida, como lo predice la teoría del trinquete de Müller (Chao, 1990; Duarte et al., 1992; Andersson y Hughes, 1996; Yuste et al., 1999).

Estos resultados sugieren que en ausencia de recombinación y con un alto “genetic drift”, otros mecanismos genéticos como las mutaciones de retroceso o reversiones compensatorias no son capaces de compensar la acumulación de mutaciones deletéreas (Andersson y Hughes, 1996).

5.2. VARIABILIDAD EN LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS FOCOS

DE INFECCIÓN DE LOS CLONES

Las diferencias observadas en el comportamiento del HSV-1 durante la obtención de los clones en el presente estudio concuerdan con otros trabajos: Hinze y Walker comunicaron en el año 1961 haber observado alteraciones en el virus tanto en su virulencia en ratones como en su efecto citopático y una relativamente baja tasa de multiplicación en distintas líneas celulares, luego de haber sido cultivado durante seis meses en presencia de suero humano a una concentración de 30% en el medio. Este estudio muestra una buena correlación entre la presencia de anticuerpos en el medio (como factor de presión selectiva) y la obtención de virus con modificaciones en su efecto citopático, tales modificaciones resultaron tan significativas como para denominar al virus obtenido como una “variante atenuada”. Basándose en estos

resultados los autores proponen que dicha “variante atenuada” surge al aplicar factores que ejerzan una presión selectiva en la población (Hinze y Walker, 1961). Otro hallazgo similar lo publican Scott y McLeod (Scott y McLeod, 1959), en este caso los autores denominan a la variante “cepa proliferativa” ya que se caracterizó por la producción de focos proliferativos y su efecto citopático resultó muy parecido al producido por la “variante atenuada” de Hinze.

Hay más publicaciones en este sentido: Hoggan y colaboradores describen una variante del virus capaz de producir focos que se caracterizan por grandes células multinucleadas (Hoggan y Roizman, 1959); mientras que Spear publicó que la capacidad de fusionar células del HSV es evidente y que además durante la propagación del virus en cultivos celulares surgen espontáneamente mutantes formadores de sincitios (Spear, 1993). También se ha sugerido la presencia de un nivel significativo de variación interna que se genera en cada ciclo replicativo del HSV-1, debido a la relativa facilidad con que se han aislado mutantes o variantes a partir de poblaciones virales clonadas luego de unos pocos pases sucesivos *in vitro* (Derse et al., 1982; Holland et al., 1983).

Finalizado el proceso de obtención de clones y luego de observar durante dicho proceso una marcada diferencia de comportamiento de los clones a pesar de provenir de una misma cepa y de haber sido cultivados en idénticas condiciones coincidimos con lo publicado por Hinze y Walker (Hinze y Walker, 1961) donde se afirma que en vista de la variabilidad observada en los virus y de la tendencia que muestran, en los sistemas de cultivos virales de producir selección de variantes, sorprende el hecho de que estos cambios en las poblaciones virales no se hubiesen estudiado o reportado con una mayor frecuencia en la literatura científica de entonces. Como lo afirman Terhune y colaboradores existen estudios donde se demuestra que a través de pases sucesivos del HSV se obtienen variantes del virus que exhiben diferencias en cuanto al tamaño de los focos y sus morfologías, aunque en estos estudios dichas variantes no son caracterizadas genéticamente (Terhune et al., 1998).

Un estudio de Cassai y colaboradores describe la selección de dos variantes a partir de herpes simplex virus tipo 1 (F), sin haberlo expuesto deliberadamente a

ningún agente mutagénico conocido, estas variantes fueron identificadas según las características morfológicas de su efecto citopático: variante policariocitogénica (FP) y variante no policariocitogénica o agregativa (FA).

Además entre estas dos variantes se demostraron diferencias significativas en sus características biológicas y bioquímicas, tales como sus patrones en cuanto a polipéptidos y glicoproteínas y la virulencia en pruebas con ratones donde la variante FP demostró ser mucho más virulenta que la variante FA (Cassai et al., 1975).

Un estudio realizado a nivel de análisis genético demostró variabilidad en el gen de la glicoproteína L en cepas del HSV-1 en las cuales se observó inhibida la fusión celular alterando así la formación de sincitios (Novotny et al., 1996).

Existen diferentes loci ubicados en la región única larga (UL) del genoma del HSV-1 cuyas mutaciones pueden causar cambios en la presentación del fenotipo sincitial el cual, probablemente, se presenta a partir de cambios en las proteínas estructurales. Una de ellas es UL27, que corresponde a la glicoproteína viral de superficie B (Bzik et al., 1984) y otra es UL53 que codifica la proteína hidrofóbica múltiple (Debroy et al 1985; Pogue-Geile y Spear, 1987).

Se considera que la policariocitosis espontánea que se presenta en infecciones celulares por HSV-1 tiene una base en la actividad fusogénica de la glicoproteína D, la cual es dependiente del tipo celular ya que se ha observado que las líneas celulares que expresan bajos niveles de gD post infección no desarrollan policariocitosis (Campadelli-Fiume et al, 1988) y que anticuerpos específicos frente a gD inhiben la fusión entre células. Por otro lado se ha planteado que para que se produzca la policariocitosis es imprescindible que el virus lleve a cabo la coexpresión de cuatro glicoproteínas: gD, gH, gB, gL, las cuales promueven juntas la fusión celular (Zhou et al., 2003).

Existe evidencia de este fenómeno de cambios en la morfología de los focos de infección en virus RNA: los resultados de un estudio con el virus de la fiebre aftosa (FMDV) documentan la transición de fenotipo viral como resultado de la aplicación del cuello de botella genético, uno de los clones sobrevino en fenotipo no citolítico, este fenotipo fue incapaz de formar focos de infección visibles en los cultivos, sin embargo fueron competentes en la replicación de RNA y establecieron infección persistente en

los cultivos celulares a pesar de no atravesar la fase citolítica (Escarmís et al., 2008). En este mismo sentido los resultados obtenidos por Duarte y colaboradores con el virus de la estomatitis vesicular (VSV) sugieren la posibilidad de que las variantes que, durante los pases sucesivos han acumulado daños mutacionales adicionales, podrían fallar en formar focos de infección visibles y de tal manera ser indetectables (Duarte et al., 1994).

5.3. VARIACIONES EN LA CAPACIDAD DE INFECTAR CÉLULAS

Cuando un virus da origen a una progenie genéticamente heterogénea durante solo un pase/ciclo de infección celular, cualquier genoma que sea tomado al azar a partir de esa población progenie posee cierta probabilidad infinita de incluir consigo una mutación que disminuya el fitness viral. Esta predicción ha sido comprobada experimentalmente con diversos virus RNA. (Chao, 1990; Duarte et al., 1992; Clarke et al., 1993; Escarmís et al., 1996; Escarmís et al., 1999; Escarmís et al., 2008; Novella y Ebdendick-Corpus, 2004; Yuste et al., 2000) y constituye la demostración experimental de la hipótesis del trinquete de Müller (Müller, 1964; Maynard Smith, 1976; Bell, 1988). El presente estudio revela que el HSV-1 presenta un decrecimiento de *fitness* como resultado de los pases sucesivos. Y que estos eventos afectan igualmente a virus complejos de doble cadena de DNA.

Los resultados obtenidos al realizar pases sucesivos aplicando el cuello de botella genético aportaron resultados coherentes con trabajos previos con otros virus, como los obtenidos por Chao con el bacteriófago ϕ 6; los de Yuste y colaboradores en el estudio del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); los de Duarte y colaboradores, con el virus de la estomatitis vesicular (Chao, 1990; Yuste et al., 1999; Duarte et al., 1992; Duarte et al., 1994). Todos estos estudios muestran un comportamiento aleatorio de la población clonal obtenida luego de aplicar el cuello de botella genético, donde algunas series clonales muestran disminución de la *fitness*, otras no muestran cambios y otras lo aumentan. Chao, comunicó un incremento de 6% en algunos clones transferidos y en otros una disminución de hasta un 71%, con estos resultados Chao plantea que debido a que los clones tienen el mismo origen las

variaciones encontradas son genéticas y necesariamente están dadas por mutaciones que surgen durante el proceso de clonación y sostiene que estas mutaciones se presentan de manera aleatoria (Chao, 1990).

Duarte comunica la observación de un patrón similar en cuanto a la habilidad de los clones de producir progenie infecciosa, la cual fue determinada cuantitativamente, de su población clonal sólo una serie clonal exhibió una gran reducción en su *fitness*, dos series clonales mostraron una significativa reducción, y otras dos series clonales la incrementaron significativamente, todas la demás series no mostraron variabilidad significativa en su habilidad de producir progenie infecciosa (Duarte et al., 1992).

Por su parte Yuste observó que de un total de 10 series clonales provenientes del mismo aislado de campo del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, algunos dejaron de formar focos al séptimo pase; otros al décimo tercer pase y solamente 6 series clonales lograron llegar hasta el décimo quinto y último pase (Yuste et al., 1999).

En este sentido Duarte y colaboradores determinaron cuantitativamente que al aplicar el cuello de botella genético a un virus de RNA disminuyó la capacidad de infectar un cultivo de células, *fitness*, en la mayoría de la población clonal resultante. Argumentando que la mayoría de los genomas virales producto de la replicación de un clon de RNA podrán contener mutaciones no adaptativas o deletéreas, resultados que concuerdan con los obtenidos por Chao en 1990 (Duarte et al., 1994). Según plantea la teoría de las *cuasiespecies*, en una población viral la variante más adaptativa representa una minoría dentro de la población total de *cuasiespecies*. Lo cual podría explicar cómo la aplicación del cuello de botella genético resulta en detrimento de la capacidad de infectar células por estos clones virales.

Duarte también planteó que aquellas variantes virales que acumulan daños mutacionales adicionales podrían con frecuencia presentarse sin ser detectadas debido a su incapacidad de formar focos visibles (Duarte et al., 1994). Este planteamiento resulta interesante ya que en nuestro estudios observamos dos series clonales F y R las cuales no pudieron ser recuperados luego del octavo y segundo pase respectivamente debido a que no se observó la formación de focos de infección; como en el mencionado estudio de Yuste (Yuste et al., 1999).

5.4. DESARROLLO DE INFECCIÓN EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES DE LAS SERIES CLONALES EN QUE DISMINUYÓ LA INFECTIVIDAD

La aplicación del cuello de botella genético tuvo como consecuencia en varias series de clones una disminución en su capacidad de producir focos de infección. A éste respecto, es muy significativo que los clones F8 y R2 perdieran la habilidad de producir focos de infección en la monocapa de células 143tk⁻, sin embargo mantener su capacidad de producir focos en células Vero. Esto evidencia claramente la naturaleza ambiente-dependiente del *fitness* viral, el cual fue documentado previamente para virus RNA. (Domingo y Holland, 1997; Quiñones-Mateu y Arts, 2006; Pariente et al., 2001).

Las diferencias observadas en el presente estudio en la morfología de los focos producidos por el HSV-1 entre las dos líneas celulares inoculadas, células Vero y células 143tk⁻, son consistentes con observaciones previas.

Es conocido que, *in vivo*, el HSV se replica primordialmente en dos tipos celulares muy distintos: en las células epiteliales que es el sitio de infección inicial y, en las neuronas sensoriales que inervan el tejido. De esta manera es razonable asumir que el virus ha evolucionado desarrollando funciones específicas que le facilitan reproducirse productivamente en estos tipos celulares tan distintos, en este sentido se sabe que el tipo celular ejerce gran influencia en la expresión de los genes virales (Weir, 2001).

Ya que la infección en estado de latencia puede definirse como la interrupción reversible de la multiplicación viral dentro de una célula y, que el HSV es capaz de establecerla en un tipo celular muy distinto al tejido epitelial donde se observan con mayor frecuencia las lesiones que causa, resulta de especial valor el estudio de este virus en diferentes líneas celulares (Roizman et al., 1993).

Epstein y colaboradores realizaron pases sucesivos de una población de HSV-1 en diferentes líneas celulares para determinar como éstas influían o determinaban la manera de propagación o crecimiento de la población viral. Observaron que luego de

varios pases la descendencia viral obtenida mostraba divergencia en cuanto a sus fenotipos, sugiriendo que diferentes líneas celulares son capaces de actuar de tal forma sobre la población viral que seleccionan variantes contenidas dentro de la población parental afectando significativamente la estructura poblacional del virus, esto sugiere que las divergencias resultantes pueden deberse a un proceso selectivo dependiente de célula donde las partículas virales correspondientes al virus nativo, *wild type*, poseen ventajas selectivas en las líneas celulares LCL y MRC5, mientras que en las células HEp-2 presentan desventajas selectivas (Epstein et al, 1990).

La influencia de la línea celular con respecto al comportamiento de las diferentes cepas de HSV1 también se muestra en otros estudios:

- Kelleher y colaboradores publicaron haber logrado el establecimiento de lo que ellos llamaron “infección no productiva de herpes simplex virus” la cual es dependiente de la línea celular. Estos investigadores compararon la recuperación del virus en células Wistar-38 (WI-38), RK (*rabbit kidney*) y HK (*human kidney*); luego de ser sometido a una temperatura de incubación de 41° C, observando que al restablecer la temperatura a 37° C se verificó una espontánea reactivación luego de períodos de entre 4 hasta 45 días de completa inhibición del crecimiento viral. Durante este período de inhibición el virus no pudo ser recuperado de los cultivos infectados, sin embargo luego de pasado este período, el virus se multiplicó y pudo ser recuperado con una tasa máxima de 49%, tanto en las células WI-38 como en RK, no así en células HK donde solo se obtuvo el 13% (Kelleher et al., 1975). Aunque en el presente estudio no se utilizó un cambio de temperatura como factor de inhibición o de selección viral observamos que el proceso de pases sucesivos del HSV-1 en las células 143tk⁻ resulta en un aumento del período de incubación del virus y la variación de la morfología de los focos como se menciono anteriormente, estos cambios se revirtieron al realizar la inoculación en células Vero.
- Zhou y colaboradores demostraron que diferentes líneas celulares exhiben fuertes variaciones con respecto a la expresión de los genes que actúan en

la fusión entre células infectadas por la cepa nativa del HSV-1 y observaron una marcada diferencia entre células BHK (*Baby Hamster Kidney*), las cuales alcanzaban una policariocitosis masiva y las células 143tk⁻ en las que se observó una significativa reducción de la cantidad de policariocitos así como también en el tamaño que presentaron. Estos resultados muestran una marcada diferencia en la habilidad del virus de fusionar células, esta habilidad mostró ser dependiente del tipo celular, en cada línea celular se observaron diferencias en cuanto a su predisposición de formar sincitios, así como el número de células reclutadas y el tamaño promedio del sincitio formado (Zhou et al., 2003).

- Otro estudio aportó resultados similares a partir de cultivos de HSV-1 en dos líneas celulares, células Raji y células BJAB. Se detectaron cambios en el genoma viral y se observó que los cambios se verificaron con una mayor intensidad en los virus cultivados en células Raji (Klauck et al, 1995).

La aplicación del cuello de botella genético acentúa la influencia de la línea celular en la que se realizan los pases sucesivos de manera que la acumulación de mutaciones que resultaron en una pérdida de adaptación al cultivo celular pudieron tener menor relevancia en la adaptación a una línea celular diferente.

A este respecto se han comunicado la modificación genética del virus de la fiebre porcina africana durante la adaptación a una determina línea celular (Tabarés et al., 1987) y también, evidencias de que la estructura poblacional interna del HSV-1 puede ser modificada rápidamente por el tipo de células en el cual se realicen los pases sucesivos, debido a la selección de una variante particular por cada línea celular distinta (Epstein et al, 1990).

Se ha reportado que en virus de RNA las fluctuaciones de ambiente en el cual toma lugar la replicación viral podría presentar para el virus demandas de adaptación conflictivas. La replicación persistente del VSV en una línea celular de insecto, tuvo como consecuencia una profunda declinación de *fitness* del virus en líneas celulares de mamíferos (Novella et al., 1995b).

El conocimiento de los tipos celulares y tipos de huéspedes en los cuales la replicación podría conllevar a una alterada disminución de su capacidad replicativa en el auténtico hospedero podría mejorar el diseño de vacunas vivas atenuadas y terapia génica.

5.5. MUTACIONES

Realizar un estimado de las tasas de evolución que presentan los virus DNA de doble cadena utilizando una base de datos con información recopilada retrospectivamente no es factible. Esto se debe principalmente a que mientras para los virus RNA contamos con gran cantidad de estudios que reportan tasa y frecuencia de mutación (Batschelet et al., 1976; Drake y Holland, 1999), para los virus DNA existe una cantidad muy limitada de ellos.

Drake comparó diferentes DNAs tanto celulares como virales y concluyó que todos mostraron una tasa de mutación aproximada de 0.003 por replicación de genoma (Drake, 1991) y que el HSV-1 posee una tasa de mutación comparable (Drake y Hwang, 2005).

En el caso de los virus RNA las tasas y frecuencias de mutación se encuentran en el rango de 10^{-4} a 10^{-5} sustituciones por nucleótido copiado, mientras que para los genomas de DNA los valores por nucleótido podrían variar dentro de un amplio rango aunque convergerían a un valor similar por genoma replicado. Esta diferencia es consistente con la limitación de la tasa de mutación por nucleótido para preservar la información genética de los genomas de DNA más complejos (Eigen y Schuster, 1979).

Todos los virus se encuentran sujetos a un evento de cuello de botella poblacional durante sus ciclos infecciosos. Eventos del tipo cuello de botella pueden ocurrir durante la transmisión de un hospedador a otro, durante la evolución viral intra-huésped, durante la colonización de nuevos tejidos u órganos a través de entre un número largo de partículas virales (Escarmís et al., 2006; Pfeiffer y Kirkegaard, 2006).

Las altas tasas de mutación que presentan los virus RNA actúan como determinante importante en la adaptabilidad que presentan en sentido general (Domingo et al., 2006) y también actúan para asegurar, la rápida generación de variantes virales

inmediatamente luego de un evento del tipo cuello de botella genético (Pfeiffer y Kirkegaard, 2005; Vignuzzi et al., 2006)

Interesantemente, el numero de mutaciones por genoma y pase estimado para el HSV-1 se encuentra dentro del rango determinado para el HIV-1 y es de entre 5.0-a 7.5-veces mayor que los valores reportados para FMDV y VSV (**Tabla 7**). En esta comparación debemos tomar en cuenta que las tres regiones del genoma estudiadas que fueron secuenciadas muestran diferentes grados de conservación, sin embargo todas ellas pertenecen a una única secuencia viral y no a secuencias terminales o internas repetidas que son dadas a la variabilidad por medio de recombinación (McGeoch et al., 2008).

Virus	Mutaciones por genoma y por pase	Tamaño del genoma (pb)
Glosopeda	0,2 - 0,3	8 500
Estomatitis vesicular	0,21	11 161
VIH	0,9 - 1,8	9 380
HSV-1	1,5	152 260

Tabla 7. Tasas de acumulación de mutaciones en diferentes genomas víricos sometidos a pases sucesivos.

Se observan los valores estimados para los virus del Glosopeda (Escarmis et al., 2002); Estomatitis vesicular (Novella, 2004); Inmunodeficiencia humana (Yuste et al., 2000); Herpes simplex, del presente trabajo.

La normalización del números promedio de las mutaciones por genoma a el número de nucleótidos (o pares de bases) de su correspondiente genoma, le atribuye valores de 2.9×10^{-5} , 1.8×10^{-5} , 1.4×10^{-4} y 9.8×10^{-6} mutaciones por nucleótido y por pase a FMDV, VSV, HIV-1 y HSV-1, respectivamente. Aunque debemos enfatizar que estos valores no corresponden a tasas o frecuencias de mutación estándares ni tampoco

a tasa de evolución dentro del componente tiempo. Sin embargo, ellos representan tasas de mutación en los genomas virales bajo un régimen específico de cultivo representado por pases sucesivos en placa. Más aún, los valores obtenidos no toman en consideración ciertos parámetros que son sumamente difíciles de definir y de calcular, y que, de alguna manera podrían contribuir a una mejor diferenciación entre virus. Entre estos parámetros se encuentran el número de ciclos de copia del genoma en cada célula infectada, el modelo de copiado del genoma durante la replicación ya sea RNA o DNA (lineal o exponencial).

El estudio genético llevado a cabo en este trabajo no logró revelar el origen de las mutaciones que podrían ser responsables de las alteraciones observadas: variaciones en la morfología de los focos, infectividad y neurovirulencia. Comprobamos que el estudio genético no fue suficiente para documentar genéticamente los cambios observados en un virus con un genoma tan complejo y de gran tamaño como lo es el HSV-1.

5.5.1. Región Exo III de la DNA Polimerasa.

Debido al importante papel de la región Exo III de la DNA Polimerasa en la fidelidad durante la replicación viral por su actividad correctora de prueba se planteó como objetivo el estudio de las mutaciones que presentan. Las secuencias obtenidas de la amplificación de la zona Exo III de la DNA polimerasa de nuestras poblaciones estudiadas fueron comparadas entre sí y con sus correspondientes secuencias de diferentes cepas de HSV-1 publicadas por otros autores tales como: cepa 17 (McGeoch et al., 1988); cepa F (Homa et al., 2002); clon R98/3 (Saijo et al., 2002); cepa F (Ejercito et al., 1968).

Con ello se logra el cuarto objetivo planteado: el estudio de las mutaciones que se verifican en la región Exo III tras la aplicación del cuello de botella genético. La comparación se puede observar esquemáticamente en la **Figura 31** y se aprecia que no se halló ninguna variación entre cepas y clones comparados. Lo cual puede considerarse un indicativo de que la zona corresponde a una región genéticamente muy conservada del virus, lo que concuerda con otros reportes.

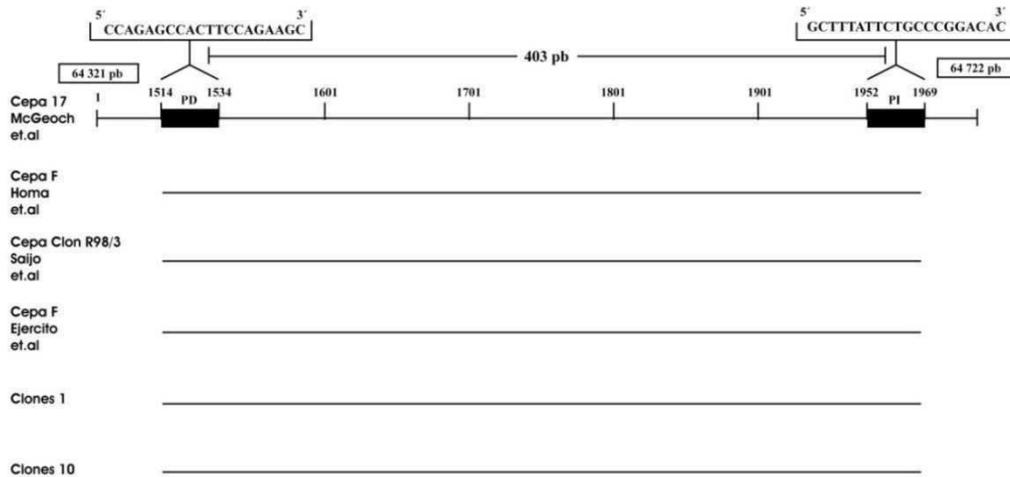


Figura 31. Diagrama comparativo de la secuencia amplificada para la región Exo III de la DNA Pol de diferentes cepas publicadas y los clones de las poblaciones estudiadas.

Se observa la ubicación de la zona amplificada de la región Exo III de la DNA Pol en el HSV-1 cepa 17 y otros detalles tales como iniciadores directo (PD) e indirecto (PI) así como la extensión de la zona amplificada. Las líneas continuas representan las secuencias de cada una de las cepas listada a la izquierda del diagrama así como de los clones 1 y clones 10. La continuidad de las líneas indica que no se encontraron variaciones en las secuencias de nucleótidos.

Algunos investigadores sugieren que la actividad exonucleasa durante la replicación viral podría ser crítica para el HSV debido a que virus defectivos resultan no viables probablemente debido a catástrofe por error (Hall et al., 1995) en este sentido también se reporta que una RMF (Frecuencia Mutacional Relativa) muy alta conlleva a un inaceptable elevado nivel de progenie no viable (Pyles y Thompson, 1994); mientras que otros sugieren que una elevada tasa de mutaciones aumentaría la variabilidad de la población y esto supondría otras ventajas evolutivas.

Lo cierto es que el hecho de que no se hayan detectado mutaciones en el fragmento estudiado, en ninguno de los clones transferidos, es consistente con el hecho conocido de que la región exo III de la DNA polimerasa se encuentra sumamente conservada dentro del genoma viral de los *Herpesvirus* y otros organismos (Bernard et al., 1989; Larder et al., 1987); aunque no podemos excluir que hubiera cambios en otros fragmentos del gen distintos al estudiado.

5.5.2. Gen de la glicoproteína D

Las secuencias obtenidas de la amplificación del gen de la gD de nuestras poblaciones estudiadas fueron comparadas entre sí como también con sus correspondientes secuencias de diferentes cepas de HSV-1 publicadas por otros autores tales como: cepa 17 (McGeoch et al., 1988); cepa F (Lee, 2000); cepa F (Ejercito et al., 1968). Estos datos obtenidos y su análisis comparativo lleva consigo el cumplimiento del segundo objetivo planteado: estudiar las mutaciones en la secuencia del gen de la gD como gen esencial para la replicación viral tras la aplicación del cuello de botella genético.

En la **Figura 32** observamos un diagrama donde se aprecian las variaciones de nucleótidos en cada secuencia así como los cambios de aminoácidos que se producen. Se presenta una transversión C→G en la posición del nucleótido 684 de guanina en la Cepa F de Lee, para citosina en todas las demás secuencias comparadas; en la posición 720 se presenta C→T una transición en el clon K10 que presenta el nucleótido timidina en contraste con la citosina que contienen todas las otras cepas y clones comparadas. En la posición 867 se verifica la transición G→A que los clones de la serie F presentaron desde el primer pase, correspondiente al clon F1, mientras todos los demás presentan guanina; sin embargo, ninguna de estas mutaciones supone sustitución de aminoácidos.

En la posición 890 observamos una transversión A→C ya que la cepa F de Lee presentó una citosina en contraste con todas las cepas y clones comparadas que poseen adenina en esta posición; y en este caso sí se traduce en un cambio de amino ácido de leucina (leu) en la cepa F de Lee a isoleucina (iso) para el resto de cepas y clones.

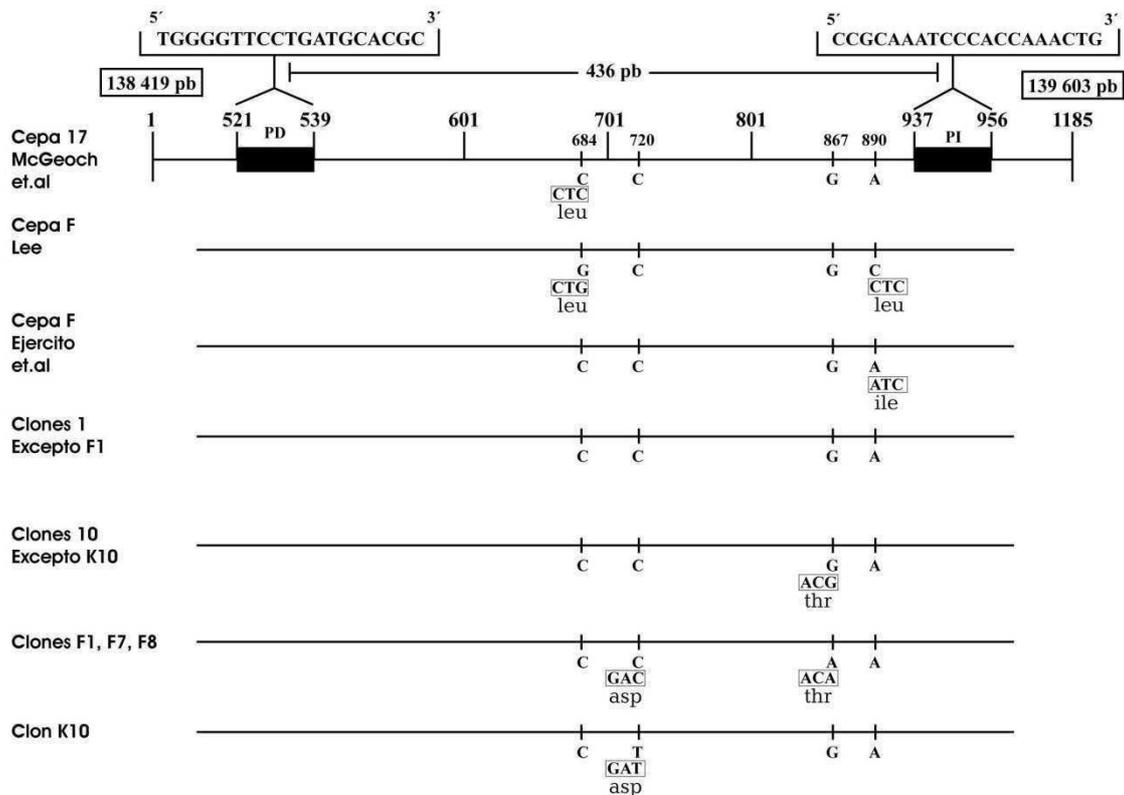


Figura 32. Diagrama comparativo de la secuencia amplificada del gen gD entre las correspondientes secuencias de diferentes cepas y clones de HSV-1.

Se observa la ubicación de la zona amplificada del gen de la gD en el HSV-1 cepa 17 y otros detalles como iniciadores directo (PD) e indirecto (PI) así como la extensión de la zona amplificada. Las líneas continuas representan las secuencias de cada una de las cepas listada a la izquierda del diagrama así como de los clones 1 y clones 10 y otros clones donde se encontraron variaciones. La continuidad de las líneas se interrumpe en el punto donde se encuentre un nucleótido que varía en alguna de las cepas, indicando el nucleótido, codón al que corresponde y el aminoácido que codifica.

En el presente estudio hemos observado que durante los pases sucesivos del virus se verificaron mutaciones en el gen de la glicoproteína D, estas observaciones concuerdan con reportes de estudios anteriores. En este sentido Campadelli-Fiume y colaboradores comunican que no es rara la presentación de mutaciones en el gen de la gD de el HSV-1 ya que luego de sólo cuatro pases seriados del virus en células BJ se seleccionaron variantes virales que las contenían (Campadelli-Fiume et al., 1990).

El mantenimiento de la estructura y conformación espacial de la glicoproteína D en el HSV-1 resulta indispensable para su funcionamiento y el desarrollo de sus actividades biológicas normales, ya que su estructura se define por la correcta secuencia en sus aminoácidos, las mutaciones podrían resultar en alteraciones de su capacidad de infectar células permisivas (Long, et al., 1992; Manoj et al, 2004). En tal sentido se ha demostrado que algunas deleciones en la gD interfieren con su actividad biológica, además en algunos casos estas mutaciones ejercen un efecto en el plegamiento de la proteína (Muggeridge et al., 1990).

Tampoco en este caso hemos encontrado cambios en el gen del fragmento de la gD estudiado que justifiquen la pérdida de viabilidad de algunos clones. Una vez más, no se puede descartar que estos cambios hayan sido producidos en secuencias diferentes a las estudiadas en este trabajo. En este sentido investigadores han comunicado que una simple sustitución de aminoácido en la gD del herpes simplex virus 1 conlleva la alteración en su capacidad de infectar células (Dean et al., 1994).

Los cambios observados en la morfología de los focos a través de los pases sucesivos podrían ser el resultado de mutaciones en el genoma que alteran el fenotipo viral, especialmente en la gD si consideramos que la producción espontánea de sincitios que se presenta en infecciones celulares por HSV-1 tiene una base en la actividad fusogénica de la glicoproteína D reportada por diversos autores; y que anticuerpos específicos frente a gD inhiben la fusión entre células (Zhou y Roizman, 2002; Noble et al., 1983).

También debemos tomar en cuenta que la actividad fusogénica de la gD es dependiente del tipo celular ya que se ha observado que las líneas celulares que expresan bajos niveles de gD post infección no desarrollan policariocitosis (Campadelli-Fiume et al, 1988).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que efectivamente se presentan mutaciones en la gD con una frecuencia considerable sin embargo estas sustituciones de nucleótidos no se tradujeron en cambios en los aminoácidos en ninguno de los dos casos. Es importante considerar que en el presente estudio se amplificó y secuenció una sección del gen lo cual deja la posibilidad abierta de que se hubiesen

producido mutaciones en otro sitios del gen los cuales pueden haber afectado alguna de las actividades biológicas que realiza la glicoproteína D. La presencia de una mutación con la sustitución de la cisteína 7 por serina como lo reportan Zhou y Roizman en 2002 serian suficientes para afectar la capacidad de bloqueo de la apoptosis celular por la gD viral.

5.5.3. Gen de la timidina kinasa

Alcanzamos el logro del tercer objetivo planteado: estudiar las mutaciones que se presentan en el gen de la TK como gen viral no esencial tras la aplicación del cuello de botella genético; al obtener las secuencias amplificadas del gen de la timidina kinasa y realizar el análisis comparativo de las poblaciones virales entre sí y con sus correspondientes secuencias de varias cepas de HSV-1 publicadas por otros autores como: cepa 17 (McGeoch et al., 1988); cepa F (Lee et al., 1988); cepa F (Ejercito et al., 1968); HSV-1 (McKnigh, 1980); SC16 (Darby et al., 1986); cepa CL101 (Wagner et al., 1981).

En la **Figura 33** observamos un diagrama donde se aprecian las diferencias de nucleótidos en la secuencia y los cambios de aminoácidos que se verifican. En este gen encontramos la mayor cantidad de variaciones en los nucleótidos. Fueron detectadas cuatro mutaciones silenciosas: una transición de C→T en la posición del nucleótido 171 y encontramos que las cepas F de Lee y de Ejercito, la cepa CL101 y los clones de nuestro estudio poseen timidina a diferencia de las cepa 17 HSV-1 de McKnight y SC16 que poseen citosina.

En la posición 271 se observo transición de T→C donde las cepa 17 de McGeoch contiene timidina a diferencia de todas las demás cepas y clones de nuestro estudio que contienen citosina.

En la posición 447 se verifica una transición C→T y vemos en todas las cepas y clones la presencia de citosina excepto en el CL101 que presenta timidina.

En la posición 528 se presentó transición de A→G, y observamos en todas las cepas y clones contiene el nucleótido adenina excepto en la cepa McKnight que contiene guanina.

En otro grupo de mutaciones observamos que se presentan sustituciones de amino ácidos como en el caso de la transición T→C que detectamos en la posición 125 que corresponde a timidina para las cepas 17, CL101, F de Lee, F de Ejército y en todos los clones de nuestro estudio a diferencia de las cepas McKnight y SC16 que contienen citosina, esta mutación resulta en cambio del amino ácido leucina (leu) para prolina (pro).

En la posición 266 detectamos transición de G→A y vemos que las cepas 17, McKnight y SC16 poseen el nucleótido guanina mientras las cepas CL101, F de Lee, F de Ejército, y todos los clones de nuestras poblaciones muestran el nucleótido adenina, esta transición da como resultado la sustitución del amino ácido arginina (arg) por glicina (gln).

La posición 427 presenta la transición A→G y encontramos ocupando esta posición el nucleótido adenina en todos los clones estudiados y todas las cepas excepto en la cepa CL101 donde encontramos guanina. La mutación produce sustitución de la isoleucina (ile) por la valina (val).

Por último detectamos la transversión de T→A en la posición de nucleótido 511 donde encontramos timidina en todas las cepas y todos los clones de la población inicial y en algunos clones de la población final. Sin embargo los clones B10, E10, G10, H10, K10, T10, P10, y O10 presentaron el nucleótido adenina. Esta mutación T→A conlleva sustitución del amino ácido cisteína (cys) por serina (ser).

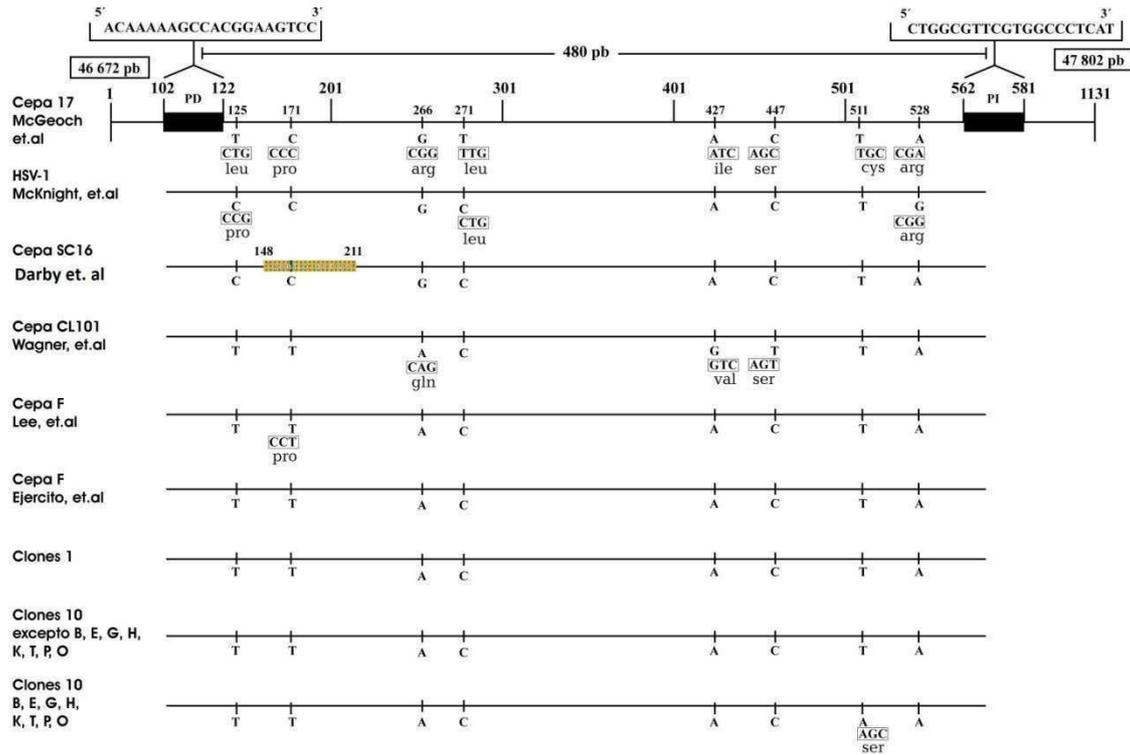


Figura 33. Diagrama comparativo de la secuencia amplificada para la timidina kinasa entre sus correspondientes secuencias de diferentes cepas y clones de HSV-1 publicadas.

Se observa la ubicación de la zona amplificada del gen en la secuencia del HSV-1 cepa 17 y otros detalles como iniciadores directo (PD) e indirecto (PI). También se observa la extensión de la zona amplificada. En la cepa SC16 se puede observar la región activa de ATP entre los nucleótidos 148 y 211. Las líneas continuas representan las secuencias de cada una de las cepas listada a la izquierda del diagrama así como de los clones 1 y clones 10 y otros clones donde se encontraron variaciones. La continuidad de las líneas se interrumpe en el punto donde se encuentre un nucleótido que varía en alguna de las cepas, indicando el nucleótido, codón al que corresponde y el aminoácido que codifica.

Nuestros resultados de caracterización de las mutaciones observadas en el gen de la TK en el herpes simplex virus son consistentes con aquellas comunicaciones de estudios en los cuales se han observado puntos calientes de mutación, “hot spots”, dentro del gen.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio son similares a aquellos publicados por Pardeiro y colaboradores donde se observó un patrón de mutación idéntico en clones obtenidos a partir de un aislado clínico del HSV-2 al ser comparados con la cepa de referencia 333, lo cual puede indicar la presencia de “*hot spots*” o puntos calientes de mutaciones en este gen. Su análisis genético de los clones S-1a y R-101 reveló que comparten las mismas sustituciones en los nucleótidos de cuatro codones los cuales generan los siguientes cambios en sus aminoácidos con respecto a la cepa de referencia 333: Ala→Thr; Ser→Ala; Asn→Asp; Leu→Phe. Sin embargo al comparar ambos clones provenientes del aislado se demostró la presencia de la sustitución de citosina por timina en el nucleótido 153 del sitio de unión a ATP, esta sustitución trae consigo el cambio de arginina a triptófano en el clon R-101, este mutante resultó ser negativo a actividad de la enzima TK (TK⁻), presentó también una pérdida de virulencia a la inoculación en ratón y además mostró resistencia al penciclovir a diferencia de S-1a y la cepa de referencia 333 (Pardeiro et al, 2004).

Se han reportado mutantes de TK para el virus de la pseudorabia (PRV) donde se detectó una simple transición de guanina a adenina en el codón 13 que tenía como consecuencia la sustitución de la glicina por el ácido aspártico en el polipéptido lo cual resultó en la pérdida de la actividad enzimática (Prieto et al., 1991). Esta simple transición ocurrida en el sitio de unión a ATP (Darby et al., 1986; Gentry, 1985) trae como consecuencia la pérdida de la actividad enzimática de la TK. Estos resultados son consistentes con aquéllos obtenidos a partir de experimentos de *site-directed mutagenesis* de el sitio de unión a ATP de la TK en el HSV-1 (Liu y Summers, 1988).

Estudios fundamentan que una simple mutación del gen TK en HSV-1 de la cepa SC16 deriva en una serie de variantes virales, en cada caso la mutación resulta en la sustitución de un aminoácido, las mutaciones observadas fueron de alanina→threonina en el aminoácido 168 del mutante B3; de arginina→glutamina en el aminoácido 176 en el mutante Tr7 y en el mutante S1 de cisteína→tyrosina en el aminoácido 336. Es notable que las sustituciones de las cepas B3 y Tr7 se encuentran en una región del polipéptido altamente conservada entre el HSV-1 y HSV-2 que es la secuencia entre los aminoácidos 161 y 193 en HSV-1 que muestran un 97% de homología con su región correspondiente en el HSV-2; esta homología es mucho más

alta que la homología promedio en toda la región codificante del gen (aproximadamente un 73%) y sugiere que esta secuencia tan conservada tiene un papel funcional importante (Darby et al., 1986). En particular se ha reportado que la simple mutación observada en la cepa B3 tiene poco efecto en la actividad normal de la enzima sin embargo es responsable de la dramática reducción de su afinidad por el sustrato (Larder et al., 1987). Siendo así también se podría considerar que estas mutaciones puedan tener un efecto en el plegamiento de la proteína y su estructura tridimensional (Darby et al, 1986).

En este sentido un reporte del análisis de variantes funcionales de TK del HSV-1 revela que existe un alto grado de flexibilidad en la capacidad de acomodar diferentes amino ácidos sustitutos en el sitio de unión a nucleótido de la enzima sin embargo se observó que ciertos aminoácidos no toleran sustitución alguna, tal es el caso de la prolina 173 y el de la tyrosina 172 la cual sólo puede ser reemplazada por fenilalanina, de tal manera que son considerados aminoácidos indispensables. También se ha señalado que dos cisteínas en la posiciones 171 y 336 juegan un papel importante en la estabilidad conformacional de la enzima TK del HSV-1 *wild type* (Munir et al, 1992).

Se ha postulado que los errores en la síntesis de DNA durante la replicación viral son la causa principal en la presentación de cepas virales resistentes a fármacos antivirales, en el caso de los herpes virus ocasionalmente se observan mutaciones simples de base dentro de los genes de la TK y/o DNA polimerasa en las cepas resistentes (Suzutani et al, 2003); también se reportan mutaciones que pueden presentar fenotipos completamente alterados de las enzimas (Schnipper y Crumpacker, 1980). Se estima que la frecuencia de estas mutaciones espontáneas corresponde a en algunos pocos viriones por 10^4 PFU (Suzutani et al, 2003).

5.6. EFECTO DE LA APLICACIÓN DEL CUELLO DE BOTELLA GENÉTICO SOBRE LA NEUROVIRULENCIA EN EL MODELO MURINO

El ensayo biológico en ratones y la observación de los efectos que produce la aplicación del cuello de botella genético en los clones transferidos conlleva la realización del quinto objetivo de este estudio. Las mutaciones acumuladas en el

genoma del HSV-1 durante los pases sucesivos pueden traer consigo mayores consecuencias biológicas para el comportamiento viral, como se demuestra por un notable decrecimiento de la neurovirulencia para el ratón, que incrementó su valor de LD₅₀ de 5- a 30- veces con respecto al virus HSV-1 de la población parental (**Tabla 6**).

La neurovirulencia en el HSV-1 es una cualidad compleja, (Roizman et al., 2007) y en este caso, cantidades equivalentes de partículas infecciosas de los clones virales fueron inoculadas directamente en el cerebro (Pelosi et al., 1998) para restringir las manifestaciones patológicas solo a aquellas que corresponden al resultado de la replicación viral en el cerebro. Las notables diferencias observadas en cuanto a la neurovirulencia, sugieren que eventos naturales del tipo cuello de botella genético que se verifiquen en el ciclo de vida del HSV-1 pueden tener consecuencias biológicas extremas.

No conocemos otros estudios del efecto que ejerce sobre la neurovirulencia el cuello de botella genético en el HSV-1 sin embargo existen comunicaciones de variantes virales que se producen espontáneamente las cuales se presentan con distintos grados de atenuación en la neurovirulencia. En este sentido varios estudios señalan la obtención de variedades de mutantes a partir del HSV. Así Pelosi y colaboradores comunican la obtención de un mutante de HSV el cual se observó 30 veces atenuado en cuanto a su neurovirulencia comparadamente con el virus nativo (*wild type*), al practicar la inoculación intracraneal en ratones CD1 de 7 semanas de edad y demostró que la atenuación de dicha variante se debía a una mutación en el gen de la DNA polimerasa (Pelosi et al., 1998).

Otro estudio demostró la selección de mutantes a partir del HSV-1 KOS con patrones distintos de neurovirulencia en el modelo murino con rangos que exhibían desde una neurovirulencia semejante al virus nativo (*wild type*) pasando por un grado de significativa atenuación hasta mostrar altos niveles de atenuación. Estas variantes seleccionadas por la presencia de diferentes agentes antivirales, además presentaron al estudio genético, sustituciones en aminoácidos localizados en diferentes dominios de la DNA polimerasa (Andrei et al., 2007).

Un estudio donde se realizaron pases seriados de la cepa HSV-1 ANG aporta resultados similares al nuestro al demostrar la aparición de variantes virales tras el undécimo pase seriado. Interesantemente la cepa HSV-1 ANG que resulta no patógena a las inoculaciones intravenosa, intraperitoneal e intravaginal en ratones; se tornó patógena a la inoculación intraperitoneal luego del decimoprimer pase. Los cambios se correlacionaron con cambios a nivel del genoma (Kaerner et al., 1983).

También se ha comunicado que bajo presión selectiva se produce un mutante de HSV-1, designado HF10, el cual presentó un alto grado de atenuación de su infectividad en el modelo murino a la inoculación periférica. Este mutante presentó un número de deleciones e inserciones en el genoma las cuales resultaron en la pérdida de la expresión funcional de diferentes genes. Además presentó cambio de amino ácidos en genes envueltos en la formación de sincitios (Ushijima et al., 2007).

Otro estudio reporta diferencias significativas en cuanto a la neurovirulencia de un HSV-1 γ_1 34.5 defectivo, al realizársele pases sucesivos, no del tipo cuello de botella genético (Shah et al., 2006).

Estudios de aislados clínicos demuestran la presencia de variantes intracepa del HSV-1 en pacientes con infección diseminada fatal. Las variantes mostraron diferencias en cuanto a tamaño de los focos de infección producidos, tropismo y en cuanto a la neurovirulencia (Bower et al., 1999).

5.7. CONSIDERACIONES FINALES

El estudio de la biología y dinámica poblacional de los microorganismos virales es de gran relevancia actual, existe una creciente necesidad de entender los mecanismos a través de los cuales los virus sobreviven la presión ejercida para limitar su replicación. Estos aspectos han sido estudiados exhaustivamente en virus RNA (Domingo y Holland, 1997).

Se ha señalado, desde el enfoque evolutivo, que el mundo de los genomas RNA es sumamente más dinámico comparado con el estático mundo celular de DNA, con el cual coexiste y del cual es dependiente (Holland et al., 1982). Esto trae como

consecuencia que la variabilidad genética y fenotípica de los RNA virus permita una aproximación experimental al fenómeno evolucionario con especial atención al detalle molecular. La limitada complejidad de los genomas, en términos de números de proteínas codificadas, su alta mutabilidad, entre otros, son características que han definido a éstos virus como sistemas modelos para el entendimiento de la evolución a nivel molecular y han promovido ampliamente las investigaciones en este sentido (Domingo y Holland, 1997).

Otro factor decisivo para el incremento de las investigaciones de estos aspectos en los virus RNA ha sido la emergencia de nuevos patógenos virales de este tipo y su gran impacto a nivel mundial: síndrome respiratorio agudo severo (SARS) (Drosten et al., 2003); influenza aviar (Maines et al., 2005); hantavirus (Klempa et al., 2006), lo cual es un indicativo más de la naturaleza altamente variable y adaptable de éstos elementos genéticos.

El progreso en el entendimiento de las implicaciones de la dinámica poblacional de los RNA virus ya ha arrojado las bases para la preferencia de algunos tipos de tratamientos sobre otros como la combinación de retrovirales sobre la monoterapia o la predilección de vacunas de componentes complejos sobre las vacunas de péptidos simples (Domingo y Holland, 1997).

Consideramos que nuestros resultados señalan que el estudio de la variabilidad genética en el HSV-1, como ejemplo de virus de DNA, es de gran importancia desde el punto de vista clínico y evolutivo. Hemos observado que eventos del tipo cuello de botella genético juegan un papel importante en la selección de una parte de la población viral y hemos visto también que el HSV-1 posee una estructura poblacional de cierta complejidad. El herpes simplex virus está conformado por variantes diversas denominadas variantes intercepa (Derse et al., 1982), variantes intracepa (Dix et al., 1983; Bower et al., 1999), variante intertipo (Halliburton, 1980; Moyra Brown et al., 1984).

Existe evidencia de que la variabilidad genética presente en el HSV-1 actúa modificando el fenotipo viral determinando así cambios en su virulencia, en las manifestaciones clínicas, que el virus se active desde su estado de latencia, en el

tropismo celular y la respuesta a los tratamientos. La comprensión de cómo se logra esta heterogeneidad dentro de la dinámica poblacional de los HSV-1, cómo opera y cómo evoluciona resulta de gran interés como ejemplo de DNA virus.

El cuello de botella genético en el HSV genera resultados similares a los obtenidos en virus RNA, ejerciendo influencia en su estructura poblacional. Sin embargo se conoce que la diversidad genética de los RNA, dada por una más alta mutabilidad, genera poblaciones mucho más diversas, lo cual facilita una rápida adaptabilidad a cambios de medioambiente y hospedador. Se ha planteado que las cuasiespecies virales no son colecciones simples de mutantes diversos sino más bien un grupo de variantes en constante interacción que en su conjunto contribuye a las características de toda la población (Domingo y Holland 1997). En este sentido se han realizado estudios con modelos matemáticos que sustentan este planteamiento (Vignuzzi et al., 2006).

En resumen el presente estudio presenta evidencia que en el curso de los pases sucesivos, la acumulación de las mutaciones que se verificaron en el genoma del HSV-1 son comparables con aquellas observadas entre los virus RNA altamente variables. El trinquete de Müller opera de forma tal en el HSV-1 generando pérdida del *fitness* y produciendo alteraciones de la virulencia en el modelo animal. Los resultados predicen que los eventos del tipo cuello de botella genético podrían tener un efecto para el HSV-1 con consecuencias similares a aquellas documentadas para virus de RNA altamente variables.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El Trinquete de Müller actúa en HSV-1 de manera semejante a la documentada para virus de RNA altamente variables. El cuello de botella genético en el HSV-1, logrado mediante el pase sucesivo de clones virales, tiene como resultado la pérdida del fitness (capacidad de infectar células) promedio de la población resultante con respecto a la población viral parental.
2. La capacidad de infectar células o fitness en el HSV-1 posee una naturaleza ambiente-dependiente capaz de producir consecuencias biológicas extremas. La aplicación de un cuello de botella a una población de HSV-1 consistente en pases sucesivos de clones, acarrea la aparición de clones que pierden su eficacia para la producción de focos de efecto citopático en la línea celular en la que se establecen los pases. Esta capacidad se recupera con el pase a otras líneas celulares.
3. La población viral contenida en el HSV-1 cepa F demostró ser heterogénea, pues tras la realización de pases sucesivos de la cepa F de herpes simplex virus tipo 1 surgieron, desde el primer pase, variantes que mostraron diferentes fenotipos.
4. La acumulación de mutaciones de HSV-1 por pase y genoma es comparable a la publicada para virus RNA.

5. Se verifican frecuentemente mutaciones en el genoma del HSV-1; sin embargo, hemos comprobado la presencia de regiones altamente conservadas como es el caso de la región Exo III de la DNA polimerasa.

6. La aplicación de un cuello de botella genético altera las propiedades biológicas de los clones sucesivos, como ocurre con la neurovirulencia en un modelo murino. Esta neurovirulencia fue diferente para los distintos clones, aunque inferior a la de la población de referencia en todos los clones estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez Cáceres, R. (1995). Estadística multivariante y no paramétrica con SPSS. Aplicación a las ciencias de la salud. Madrid. Díaz de Santos, cop. 1995.

Andersson, D. I., Hughes, D. (1996). Muller's ratchet decreases fitness of a DNA-based microbe. *Proc Natl Acad Sci USA* 93,906-907.

Andrei, G., Fiten, P., Froeyen, M., De Clercq, E., Opdenakker, G., Snoeck, R. (2007). DNA polymerase mutations in drug resistant herpes simplex virus mutants determine in vivo neurovirulence and drug-enzyme interactions. *Antivir Ther* 12, 712-732.

Bachetti, S., and Graham, F. L. (1979). Transfer of the gene of thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 1590-1594.

Batschelet, E., Domingo, E. and C. Weissmann. (1976). The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene* 1, 27-32.

Becker, Y., Hadar, J., Tabor, E., Ben-Hur, T., Raibstein, I., Rösen, A., Darai, G. (1986). A sequence in HpaI-P fragment of herpes simplex virus -1 DNA determines intraperitoneal virulence in mice. *Virology* 149, 255-259.

Baker, R. O., Hall J. D. (1998). Impaired mismatch extension by a herpes simplex DNA polymerase mutant with an editing nuclease defect. *J Biol Chem* 273, 24075-24082.

Bell, G. (1988). *Sex and Death in Protozoa. The History of an Obsession.* Cambridge University Press, Cambridge.

Bernard, A., Blanco, L., Lazaro, J. M., Martin, G. Salas, M. (1989). A conserved 3'-5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell* 59, 219-228.

Bower, J. R., Mao, H., Durishin, C., Rozembom, E., Detwiler, M., Rempinski, D., Karban, T. L., Rosenthal, K. S. (1999). Intrastrain variants of herpes simplex virus type 1 isolated from a neonate with fatal disseminated infection differ in the ICP34.5 gene, glycoprotein processing, and neuroinvasiveness. *J Virol* 75, 3843-3853.

Brandimarti, R., Huang, T., Roizman, B., Campadelli-Fiume, G. (1994). Mapping of herpes simplex virus 1 genes with mutations which overcome host restrictions to infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5406-5410.

Brown, D. G., Visse, R., Sandhu, G., Davis, A., Rizkallah P. J., Melitz, C., Summers, W. C., Sanderson, M. R. (1995). Crystal structure of the thymidine kinase from herpes simplex virus type 1 in complex with deoxythymidine and ganciclovir. *Nat Struct Biol* 2, 876-881.

Bzik, D. J., Fox, B. A., De Luca, N. A., Person, S. (1984). Nucleotide sequence of a region of the herpes simplex virus type 1 gB glycoprotein gene: mutations affecting rate of virus entry and cell fusion. *Virology* 137, 185-190.

Campadelli-Fiume, G., Avitabile, E., Fini, S., Stirpe, D., Arsenakis, M., Roizman, B. (1988). Herpes simplex virus glycoprotein D is sufficient to induce spontaneous pH-independent fusion in a cell line that constitutively expresses the glycoprotein. *Virology* 166, 598-602.

Campadelli-Fiume, G., Qi, S., Avitabile, E., Foà-Tomasi, L., Brandimarti, R., Roizman, B. (1990). Glycoprotein D of herpes simplex virus encodes a domain which precludes penetration of cells expressing the glycoprotein by super infecting herpes simplex virus. *J Virol* 64, 6070-6079.

Campione-Picardo, J., Rawls, W. E., Bacchetti, S. (1979). Selective assay for herpes simplex virus expressing thymidine kinase. *J Virol* 31, 281-287.

Cassai, E., Manservigi, R., Corallini, A., Terni, M. (1975). Plaque dissociation of herpes simplex viruses: biochemical and biological characters of the viral variants. *Intervirology* 6; 212-223.

Clarke, D. K., Duarte, E. A., Moyá, A., Elena, S. F., Domingo, E., and Holland, J. (1993). Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses. *J Virol* 67, 222-228.

Chao, L. (1990). Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* 348, 454-455.

Chiang, H.-Y., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J. (1994). Identification of functional regions of herpes simplex virus glycoprotein gD by using linkerinsertion mutagenesis. *J. Virol* 68, 2529–2543.

Cocchi, F., Fusco, D., Menotti, L., Gianni, T., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., Campadelli-Fiume, G. (2004). The soluble ectodomain of herpes simplex virus gD contains a membrane-proximal pro-fusion domain and suffices to mediate virus entry. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 7445-7450.

Cohen, G. H. (1980). Comparative structural análisis of glycoprotein gD of Herpes Simples Virus types 1 and 2. *J Viro* 35, 428-435.

Coen , D. M., Aschman, D. P., Gelep, P. T., Retondo, M. J., Weller, S. K., Schaffer, P. A. (1984). Fine mapping and molecular cloning of mutations in the Herpes Simplex Virus DNA polymerase locus. *J Virol* 49, 236-247.

Coen, D.M., Kosz-Venenchak, M., Jacobson, J. G., Leib, D. A., Bogard, C. L., Schaffer, P. A., Tyler, K. L., Knipe, D. M. (1989). Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactive. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 4733-4740.

Connolly, S. A., Landsburg, D. J., Carfi, A., Wiley D. C., Cohen G. H., Eisenberg R.J. (2003). Structure-based mutagenesis of herpes simplex virus glycoprotein D defines three critical regions at the gD-HveA/HVEM binding interface. *J Virol* 77, 8121-8140.

Connolly, S. A., Landsburg, D. J., Carfi, A., Whitbeck J. C., Zuo, Y. Wiley D. C., Cohen G. H., Eisenberg R.J. (2005). Potential nectin-1 binding site on herpes simplex virus glycoprotein D. *J Virol* 79, 1282-95.

Connolly, S. A., Landsburg, D. J., Carfi, A., Wiley, D. C., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H. (2002). Structure-Based Analysis of the herpes simplex virus glycoprotein D binding site present in herpes virus entry mediator HveA (HVEM). *J Virol* 76, 10894-10904.

Darby, G., Larder, B. A., Inglis. M. M. (1986). Evidence that the “active centre” of the herpes simplex virus thymidine kinase involves an interaction between three distinct regions of the polypeptide. *J Gen Virol* 67, 753-758.

Dean, H. J., Terhune, S. S., Shieh, M., Susmarski, N., Spear, P. G. (1994). Single amino acid substitution in gD of herpes simplex virus 1 confer resistance to gD-mediated interference and cause cell-type-dependent alterations in infectivity. *Virology* 199, 67-80.

Debroy, C., Pederson, N., Person, S. (1985). Nucleotide sequence of a herpes simplex virus type 1 gene that causes cell fusion. *Virology* 145, 36-48.

De La Iglesia, F., Elena, S. F. (2007). Fitness declines in tobacco etch virus upon serial bottleneck transfers. *J Virol* *81*, 4941-4947.

Derse, D., Bastow, K. F., Cheng, Y. C. (1982). Characterization of DNA polymerases induce by a group of herpes simplex virus type 1 variants selected for growth in the presence of phosphonoacetic acid. *J Biol Chem* *257*, 10251-10260.

Dix, R. D., McKendal, R. R., Baringer, J.R. (1983). Comparative neurovirulence of herpes simplex virus type 1 strains after peripheral or intracerebral inoculation of BALB/c mice. *Infect Immun* *40*, 103-112.

Domingo, E., Escarmís, C., Sevilla, N., Moya, A., Elena, S. F., Quer, J., Novella, I. S., Holland, J. J. (1996). Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J* *10*, 859-864.

Domingo, E., Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microb* *51*, 151-178.

Domingo, E., Biebricher, C.K., Eigen, M. and Holland, J.J. (2001). Quasiespecies and RNA virus evolution. Principles and Consequences. Landes Bioscience, Georgetown, Texas.

Domingo, C., Gadea, I., Pardeiro, M., Castilla C., Fernández, S., Fernandez-Clua, M. A., De La Cruz Troca, J. J., Punzón, C., Soriano, F., Fresno, M., Tabarés, E. (2003). Immunological properties of a DNA plasmid encoding a chimeric protein of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B and glycoprotein D. *Vaccine*. *21*, 3565-3574.

Domingo, E., Martín, V., Perales. C., Grande-Pérez, A., García-Arriaza, J. y Arias, A. (2006). Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol* *299*, 51-82.

Drake, J. W. (1969). Comparative rates of spontaneous mutation. *Nature* *221*, 1132.

Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci USA* *88*, 7160-7164.

Drake, J. W. and J. J. Holland. (1999). Mutations rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* *96*, 13910-13913.

Drake, J. W., Hwang C. B. (2005). On the mutation rate of herpes simplex virus type 1. *Genetics* *170*, 969-970.

Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A., Berger, A., Burguière, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.C., Müller, S., Rickerts, V., Stürmer, M., Vieth, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D., Schmitz, H., Doerr, H.W. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348, 1967-1976.

Duarte, E., Clarke, D., Moyá, A., Domingo, E., Holland, J. (1992). Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6015-6019.

Duarte, E. A., Clarke, D. K., Moya, A., Elena, S. F., Domingo, E., Holland, J. J. (1993). Many-trillion fold amplification of single RNA virus particles fails to overcome Muller's ratchet effect. *J Virol* 67, 3620-3623.

Duarte, E. A., Novella, I. S., Ledesma, S., Clarke, D. K., Moya, A., Elena, S. F., Domingo, E., Holland, J. J. (1994). Subclonal components of consensus fitness in an RNA virus clone. *J Virol* 68, 4295-4301.

Efstathiou, S., Kemp, S., Darby, G., Minson, A. C. (1989). The role of herpes simplex type 1 thymidine kinase in pathogenesis. *J Gen Virol* 70, 869-879.

Eigen, M. and Schuster, P. (1979). *The hypercycle. A Principle of Natural Self-Organization.* Springer, Berlin.

Eisenberg R. J., Ponce De León, M., Cohen, G. H. (1980). Comparative structural analysis of glycoprotein gD of Herpes Simplex Virus types 1 and 2. *J Virol* 35, 428-435.

Ejercito, P. M., Kieff, E. D., Roizman, B. (1968). Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour on infected cells. *J Gen Virol* 2, 357-364.

Elbers, J. M., Bitnun, A., Richardson, S. E., Ford-Jones, E.L., Tellier, R., Wald, R. M., Petric, M., Kolski, H., Heurter, H., MacGregor, D. (2007). A 12-year prospective study of childhood herpes simplex encephalitis: is there a broader spectrum of disease? *Pediatrics* 119; e399-e407.

Elena, S. F., Gonzalez-Candelas, F., Novella, I. S., Duarte, E., Clarke, D. K., Domingo, E., Holland J. J., Moyá, A. (1996). Evolution of fitness in experimental populations of vesicular stomatitis virus. *Genetics* 142, 673-679.

Epstein, A. L., Lyon, M., Michal, Y., Jacquemont, B. (1990). In vitro divergence of HSV-1 population propagated in different cell lines. *Arch Virol* 111, 133-140.

Epstein, M. A. (1962). Observations of the mode of release of the herpes virus from infected HeLa cells. *J Cell Biol* 12, 589-597.

Escarmís, C., Dávila, M., Charpentier, N., Bracho, A., Moya, A., Domingo, E. (1996). Genetic lesions associated with Muller's Ratchet in an RNA virus. *J Mol Biol* 264, 255-267.

Escarmís, C., Dávila, M. and Domingo, E. (1999). Multiple molecular pathways for fitness recovery of RNA virus debilitated by operation of Müller's ratchet. *J Mol Biol* 285, 495-505.

Escarmis, C., Gomez-Mariano, G., Davila, M., Lazaro, E. and E. Domingo. (2002). Resistance to extinction of low fitness virus subjected to plaque-to-plaque transfers: diversification by mutation clustering. *J Mol Biol* 315, 647-661.

Escarmis, C., Lazaro, E. and Manrubia, S.C. (2006). Population bottlenecks in quasispecies dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol* 299, 141-170.

Escarmís, C., Lázaro, E., Arias, A., Domingo, E. (2008). Repeated bottleneck transfer can lead to non-cytocidal forms of a cytopathic virus: implication for virus extinction. *J Mol Biol* 376, 367-379.

Felsenstein, J. (1974). The evolutionary advantage of recombination¹. *Genetics* 78, 737-756.

Fuller, O. A. and Lee, W. (1992). Herpes simplex virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration. *J Virol* 66, 5002-5012.

Gentry, G.A . (1985). Locating a nucleotide-binding site in the thymidine kinase of vaccinia virus and of herpes simplex virus by scoring triply aligned protein sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 6815-6819.

Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Spear, P. G. (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* 28, 1618-1620.

Gray, A., Tokumaru, T., Scott, T. F. (1958). Different cytopathogenic effects observed in HeLa cells infected with herpes simplex virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 8, 59-76.

Halliburton, I. W. (1880). Intertypic recombinants of herpes simplex virus. *J Gen Virol* 48, 1-23.

Hall, J. D., Orth, K. L., Sander, K. L., Swihart, B. M., Senese, R. (1995). Mutations within conserved motifs in the 3' -5' exonuclease domain of herpes simplex virus DNA polymerase. *J Gen Virol* 76, 2999-3008.

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 Nat Acad Sci USA* 72, 1768-1772.

Hinze, H. C., Walker, D. L. (1961). Variation of herpes simplex virus in persistently infected tissue cultures. *J Bacteriol* 82, 498-504.

Holland, T. C., Marlin, S. D., Levine, M., Glorioso, J. (1983). Antigenic variants of herpes simplex virus selected with glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *J Virol* 45, 672-682.

Holland, J.J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., VandePol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. In E. Domingo and J. J. Holland. (1997). RNA fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 51, 151-178.

Homa, F. L., Wathen, M. W., Hopkins, T. A. y Thomsen, D. R. (2002). A method for treating herpes viruses. JOURNAL Patent: WO 0206513-A 7 24-JAN-2002; PHARMACIA & UPJOHN COMPANY (US). Gene Bank Accession AX358316 Version AX368316.1 GI18674963.

Hoggan, M. D. and Roizman, B. (1959). The isolation and properties of a variant of herpes simplex virus producing multinucleated giant cells in monolayer cultures in the presence of antibody. *Am J Hyg* 70, 208-219.

Hwang, Y. T., Liu, B., Coen D. M., Hwang C. B. (1997). Effects of mutations in Exo III motif of herpes simplex virus DNA polymerase gene on enzyme activities, viral replication, and replication fidelity. *J Virol* 71, 7791-7798.

ICTVdB Management (2006). 00.031.1.01.001. Human herpesvirus 1. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>

Isnard, M., Granier, M., Frutos, R., Reynaud, B., Peterschmitt, M. (1998). Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to test response to infection of maize cultivars. *J Gen Virol* 79, 3091-3099.

Jogger, C. R., Montgomery, R. I., Spear, P. G. (2004). Effects of linker-insertion mutations in herpes simplex virus 1 gD on glycoprotein-induced fusion with cells expressing HVEM or nectin 1. *Virology* 318, 318-326.

Kaerner, H. C., Schröder, C. H., Ott-Hartmann, A., Kümel, G., Kirchner, H. (1983). Genetic variability of herpes simplex virus: development of a pathogenic variants during passaging of a non-pathogenic herpes simplex virus type 1 virus strain in mouse brain. *J Virol* 46, 83-93.

Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch Exp Pathol Pharm* 162, 480–483.

Kelleher, J. J., Varani, J., Nelson, W. W. (1975). Establishment of a non-productive herpes simplex virus infection in rabbit kidney cells. *Infect Immun* 12, 128-133.

Klempa, B., Fichet-Calvet, E., Lecompte, E., Auste, B., Aniskin, V., Meisel, H., Denys, C., Koivogui, L., Meulen, J., Krüger, D. H. (2006). Hantavirus in african wood mouse, guinea. *Emerg Infect Dis* 12, 838-840.

Kimberlin, D. W., Sleasman, J. W., Murguía de Sierra, T., Soong, S. J., Kiell, J., Lakeman, F. D., Arvin, A. M., Gutierrez, K., Shelton, M., Weiner, L.M., Frenkel, J., Gruber, W. C., Rathore, M., Bradley, J. S., Diaz, P. S., Kumar, M., Lin, C. Y., Jacobs, R. F., Powell, D. A., and Whitley, R. J. (2001). Natural history of neonatal herpes simplex infections in the acyclovir era. *Pediatrics* 108, 223-229

Klauck, S. M., Hampl, W., Kleinschmidt, A. K. (1995). HSV type 1 genome variants from persistently productive infections in Raji and BJAB cells lines. *Arch Virol* 140, 1195-1213.

Knopf, C. W. (1998). Evolution of viral DNA-dependent DNA polymerases. *Virus Genes* 16, 47-58.

Kruskal, W.H. and Wallis, W.A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc* 47, 583-621.

Kunkel, T. A., Schaaper, R. M., Beckman, R. A., Loeb, L. A. (1981). On the fidelity of DNA replication. Effect of the next nucleotide on proofreading. *J Biol Chem* 256, 9883-9889.

Kunkel, T. A. (2004). DNA replication fidelity. *J Biol Chem* 279, 16895-16898.

Langenberg, A. G., Burke, R. L., Adair, S. F. (1995). A recombinant glycoprotein vaccine for herpes simplex virus type 2: safety and immunogenicity. *Ann Intern Med* 122, 889-898.

Larder, B.A., Kemp, S.D., Darby, G. (1987). Related functional domains in virus DNA polymerases. *EMBO J* 6, 169-175.

Lázaro, E., Escarmís, C., Pérez-Mercader, J., Manrubia, S. C., Domingo, E. (2003). Resistance of virus to extinction on bottleneck passages: study of a decaying and fluctuating pattern of fitness loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 19, 10830-10835.

Lee, H. H., Kim, J .W., Cha, S. C. and Kang, H. (1988). Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of Herpes simplex virus type-1 thymidine kinase gene *JOURNAL Taehan Paerosu Hakhoe Chi* 28, 215-224.

Lee, H. H. (2000). Cloning sequencing and baculovirus-based expression of glycoprotein D gene of herpes simplex virus type 1 strain F. Unpublished. Gene Bank Accession AF293614. Version AF293614.1 GI15277535.

Liu, Q. Y., Summers, W. C. (1988). Site-directed mutagenesis of a nucleotide-binding domain in HSV-1 thymidine kinase: effects on catalytic activity. *Virology* 163, 638-642.

Long, D., Wilcox, W. C., Abrams, W. R., Cohen, G. H. and R. J. Eisenberg. (1992). Disulfide bond structure of glycoprotein D of herpes simplex virus type 1 and 2. *J Virol* 66, 6668-6685.

López, C. (1975). Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. In: Kaerner, H. C., Schröder, C. H., Ott-Hartmann, A., Kümel, G., Kirchner, H. (1983). Genetic variability of herpes simplex virus: development of a pathogenic variants during passaging of a non-pathogenic herpes simplex virus type 1 virus strain in mouse brain. *J Virol* 46, 83-93.

Maines, T. R., Lu, X. H., Erb, S. M., Edwards, L., Guarner, J., Greer, P. W., Nguyen, D. C., Szretter, K. J., Chen, L., Thawatsupha, P., Chittaganpitch, M., Waicharoen, S., Nguyen, D. T., Nguyen, T., Nguyen, H. H. T., Kim, J. H., Hoang, L. T., Kang, Ch., Phuong, L. S., Lim, W., Zaki, S., Donis, R. O., Cox, N.J., Katz, J. M., Tumpey, T. M. (2005). Avian Influenza (H5N1) Viruses Isolated from Humans in Asia in 2004 Exhibit Increased Virulence in Mammals. *J Virol* 79, 11788–11800 .

Manoj, S., Jogger, C. R., Myscofski, D., Yoon, M., Spear P. G. (2004). Mutations in herpes simplex virus glycoprotein D that prevent cell entry via nectins and alter cell tropism. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 12414-12421.

Maynard Smith, J. (1976). *The evolution of sex*. Cambridge University Press, Cambridge.

McGeoch, D. J., Dalrymple, M. A., Davison A. J., Dolan, A. Frame, M. C., McNab, D., Perry, L. J., Scott, J. E., Taylor, P. (1988). The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 68, 1531-1574.

McGeoch, D. J., Dolan, A., Donald, S., Rixon, F. J. (1985). Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Mol Biol* 181, 1-13

McGeoch, D.J., Davison, A.J., Dolan, A., Gatherer, D. and Sevilla-Reyes, E.E. (2008). Molecular evolution of the Herpesvirales. In: E. Domingo, C.R. Parrish, and J.J. Holland, eds. *Origin and Evolution and Viruses*, 2nd edition, pp. 447-475 Academic Press, Elsevier, Amsterdam.

McKnight, S. L. (1980). The nucleotide sequence and transcript map of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Nucleic Acids Res* 8, 5949-5964.

Moira Brown, S., Harland, J. and Subak-Sharpe, J. H. (1984). Isolation of restriction endonuclease site deletion mutants of herpes simplex virus. *J Gen Virol* 65, 1053-1068.

Morrison, A. and Sugino, A. (1994). The 3'-5' exonucleases of both DNA polymerase δ and ϵ participate in correcting errors of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 242, 289-296.

Montgomery, R. I., M. S. Warner, B. J. Lum, and P. G. Spear. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87, 427-436

Montgomery, A., Centifanto, Y. (1989). Heterogeneity within an HSV-1 wild-type strain and its importance in pathogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 191, 362-369.

Muggeridge, M. I., Wilcox, W. C., Cohen, G. H., Eisemberg, R. J. (1990). Identification of site on herpes simplex virus type 1 glycoprotein D that is essential for infectivity. *J Virol* 64, 3617-3626.

Müller, H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research* 1, 2-9.

Munir, K. M., French, D. C, Dipak K., D., Loeb, L. A. (1992). Permissible amino acid substitutions within the putative nucleoside-binding site of Herpes Simplex Virus type 1 established by random sequence mutagenesis. *J Biol Chem* 267, 6584-6589.

Noble, A. G., Lee, G. T., Sprague R., Parish, M. L., Spear, P. G. (1983). Anti-gD monoclonal antibodies inhibit cell fusion induced by herpes simplex virus type 1. *Virology* 129, 218-224.

Novella, I. S., Duarte, S. A., Elena, S. F., Moya, A., Domingo E., Holland, J. J. (1995a). Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions. *Pro Natl Acad Sci USA* 92, 5841-5844.

Novella, I.S., Clarke, D.K., Quer, J., Duarte, E.A., Lee, C.H., Weaver, S.C., Elena, S.F., Moya, A., Domingo, E., Holland, J.J. (1995b). Extreme fitness differences in mammalian and insect hosts after continuous replication of vesicular stomatitis virus in sandfly cells. *J Virol* 69, 6805-6809.

Novella, I.S. and Ebendick-Corpus, B.E. (2004). Molecular basis of fitness loss and fitness recovery in vesicular stomatitis virus. *J Mol Biol.* 342, 1423-1430.

Novella, I. S. (2004). Negative effect of genetic bottlenecks on the adaptability of vesicular stomatitis virus. *J Mol Biol* 336, 61-67.

Novotny, M. J., Parrish, M. L., Spear, P. G. (1996). Variability of herpes simplex virus 1 gL and anti gL antibodies that inhibit cell fusion but not viral infectivity. *Virology* 221, 1-13.

Nugier, F, Collins P., Larder, B. A., Langlois, M., Aymard, M., Darby, G. (1991). Herpes simplex virus isoletes from an immunocomplromised patient who failed to respond to acyclovir treatment express thymidine kinase with altered substrate specificity. *Antivir Chem Chemother* 2, 295-302.

Pardeiro, M., Cuenca-Estrella, M., Fernández-Clúa, M. A., Santos-O`Connor, F., Tabarés, E., Gadea, I. (2004). Characterization of penciclovir resistant acyclovir sensitive herpes simples virus type 2 isolated from an AIDS patient. *J Med Virol* 73, 60-64.

Pariente, N., Sierra, S., Lowenstein, P.R., and Domingo, E. (2001). Efficient virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors. *J Virol* 75, 9723-9730.

Parris, D. S. and Harrington, J. E. (1982). Herpes simplex virus variants resistant to high concentrations of acyclovir exist in clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 22, 71-77.

Pelosi, E., Rozemberg, F., Coen, D. M., Tyler, K. L. (1998). A herpes simplex virus DNA polymerase mutation that specifically attenuates neurovirulence in mice. *Virology* 252, 364-372.

Pfeiffer, J.K. and Kirkegaard, K. (2005). Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathog.* 1(2):e11.

Pfeiffer, J.K. and Kirkegaard, K. (2006). Bottleneck-mediated quasispecies restriction during spread of an RNA virus from inoculation site to brain. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* *103*, 5520-5525.

Poffenberger, K. L., Tabarés, E., Roizman, B. (1983). Characterization of a viable, noninverting herpes simplex 1 genome derived by insertion and deletion of sequences at the junction of components L and S. *Proc Nat Acad Sci USA* *80*, 2690-2694.

Pogue-Geile, K. L., Spear, P. G. (1987). The single base pair substitution responsible for the Syn phenotype of herpes simplex virus type 1, strain MP. *Virology* *157*, 67-74.

Prieto, J., Martín Hernández, A. M., Tabarés, E. (1991). Loss of pseudo rabies virus thymidine kinase activity due to a single base mutation and amino acid substitution. *J Gen Virol* *72*, 1435-1439.

Pyles, R. B., Thompson, R. L. (1994). Mutations in accessory DNA replicating functions alter the relative mutation frequency of herpes simplex virus type 1 strains in culture murine cells. *J Virol* *68*, 4514-4524.

Quiñones-Mateu, M.E. y Arts, E.J. (2006). Virus fitness: concept, quantification, and application to HIV population dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol.* *299*, 83-140.

Reed, J.H., Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent end points. *Am J Hyg* *27*, 493-497.

Rekabdar E., Tunbäck, P., Liljeqvist, J., Lindh, M., Bergström, T. (2002). Dichotomy of glycoprotein G gene in herpes simplex virus type 1 isolates. *J Clin Microbiol* 40, 3245-3251.

Rekabdar E., Tunbäck, P., Liljeqvist, J., Bergström, T. (1999). Variability of the glycoprotein G gene in clinical isolates of herpes simplex virus type 1. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6, 926-831.

Rhim, J. S., Cho, H. Y., Huebner, R. J. (1975). Non-producer human cells induced by murine sarcoma virus. *Int J Cancer* 15, 23-29.

Roizman, B., Whitley, R. J. and Lopez, C. (1993). *The Human Herpes Viruses*. Raven Press, N. Y.

Roizman, B., Knipe, D.M. and Whitley, R.J. (2007). Herpes simplex virus. In: D.M. Knipe and P.M. Howley et al. eds. *Fields Virology*, 5th edition, pp. 2501-2601. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

Rojas, J. M., Dopazo, J., Martín-Blanco, E., López-Galindo, C., Tabarés, E. (1993). Analysis of genetic variability of populations of herpes simplex viruses. *Virus Res* 28, 249-261.

Rojas, J. M., Dopazo, J., Santana, M., López-Galindo, C., Tabarés, E. (1995a). Comparative study of genetic variability in thymidine kinase and glycoprotein B genes of herpes simplex viruses by the RNase A mismatch cleavage method. *Virus Res* 35, 205-214.

Rojas, J. M., Sánchez-Palomino, S., Santana, M., López-Galíndez, C., Tabarés, E. (1995b). Genetic analysis of herpes simplex virus type 1 isolates from recurrent lesions and clinical reinfections. *J Infect Dis* 172, 1602-1605.

Saijo, M., Yasuda, Y., Yabe, H., Kato, S., Suzutani, T., De Clercq, E., Niikura, M., Maeda, A., Kurane, I., Morikawa, S. (2002). Bone Marrow transplantation in child with Wiskott-Aldrich Syndrome latently infected with acyclovir-resistant (ACVr) herpes simplex virus type 1: emergent of foscarnet-resistant virus originating from the ACVr virus. *J Med Virol* 68, 99-104.

Sarisky, R. T., Nguyen T. T., Duffy, K. E., Wittrock, R. J., Leary, J. J. (2000) Difference in incidence of spontaneous mutation between herpes simplex virus types 1 and 2. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1524-1529.

Schnipper , L. E., Crumpacker, C. S. (1980). Resistance of herpes simplex virus to acycloguanosime: role of viral thymidine kinase and DNA polymerase loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 2270-2273.

Scott, T. F., McLeod, D. L. (1959). Cellular responses to infection with strains of herpes simplex virus. *Ann N Y Acad Sci.* 81, 118-128.

Scott, T. F., McLeod, D. L., Tokumar, T. (1961). A biologic comparison of two strains of Herpesvirus hominis. *J Immuno* 86, 1-12.

Shah C., A., Price, K. H., Parker, J. N., Samuel, S. L., Meleth, S., Cassady, K. A., Gillespie, G. Y., Whitley, R. J., Markert, J. M. (2006). Serial passage through human glioma xenografts selects for a $\Delta \gamma_1$ 34.5 herpes simplex virus type 1 mutants that exhibits decreased neurotoxicity and prolongs survival of mice with experimental brain tumors. *J Virol* 80, 7308-7315.

Simon, M., Giot, L., Faw, G. (1991). The 3'-5' exonuclease activity located in the DNA polymerase 6 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* is required for accurate replication. *EMBO J* 10, 2165-2170.

Song, L., Chaudhuri, M., Knopf, C. W., Parris, D. S. (2004). Contribution of the 3'- to 5'- exonuclease activity of herpes simplex virus type 1 DNA Polymerase to the fidelity of DNA synthesis. *J Biol Chem* 279, 18535-18543.

Spear, P. G. (1993). Membrane fusion induced by herpes simplex virus. In: Terry-Alison, T., Montgomery, R.T., Warner, M. S., Geraghty, R. J., Spear, P. J. (2001). Contributions of gD receptors and glycosaminoglycan sulfation to cell fusion mediated by herpes simplex virus 1. *Virus Res* 74, 39-45.

Spiecer, E. K., Rush, J., Fung, C., Reha-Krantz, L. J., Karam, J. D., Konigsberg W. H. (1988). Primary structure of T4 DNA polymerase. *J Biol Chem* 263, 7478-7486.

Suzutani, T., Ishioka, K., De Clercq, E., Ishibashi, K. Kaneko, H., Kira, T., Hashimoto, K., Ogasawara, M., Ohtani, K., Wakamiya, N., Saijo, M. (2003). Differential mutation patterns in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus type1 clones passaged in the presence of acyclovir or penciclovir. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 1707-1713.

Tabarés, E. (1987). Detection of DNA viruses by radioactive and non radioactive DNA probes: application to Africa swine fever virus. *Arch Virol* 92, 233-242.

Tabarés, E., Olivares, I., Santurde, G., García, M. J., Martín, E. Carnero M. E. (1987). African swine fever virus DNA: deletions and additions during adaptation to growth in monkey kidney cells. *Arch Virol* 97, 333-346.

Taylor, T. J., Brockman, M. A., McNamee E. E, Knipe, D. M. (2002). Herpes simplex virus. *Frontiers in Bioscience* 7, D752-764, March 1, 2002.

Tal-Singer, T., Peng, C., Ponce de Leon, M., Abrams, W. R. , Banfield, B. W., Tufaro, F., Cohen, G. H., Eisemberg, R. J. (1995). Interaction of herpes simplex virus glycoprotein gC with mammalian cell surface molecules. *J Virol* 69, 4471-4483.

Terhune, S. S., Coleman, K. T., Seculovich R., Burke, R. L., Spear, P. G. (1998). Limited variability of glycoprotein gene sequences and neutralizing targets in Herpes Simplex Virus type 2 isolates and stability on passages in cell culture. *J Infect Dis* 178, 8-15.

Terni, M., Roizman, B. (1970). Variability of herpes simplex virus: isolation of two variants from simultaneous eruptions at different sites. *J Infect Dis* 121, 212-216.

Terry-Allison, T., Montgomery, R. I., Warner, M. S., Geraghty, R. J., Spear, P. G. (2001). Contribution to gD receptors and glycosaminoglycan sulfation to cell fusion mediated by herpes simplex virus 1. *Virus Res* 74, 39-45.

Ushijima Y., Luo, C., Goshima, F., Yamauchi, Y., Kimura H., Nishiyama Y. (2007). Determination and analysis of the DNA sequence of highly attenuated herpes simplex virus type 1 mutant HF10, a potential oncolytic virus. *Microbes Infect* 9(2): 142-149.

Ward, P.L., and Roizman, B. (1994). Herpes Simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen. *Trends Genet* 10, 267-274.

Warner, M. S., W. Martinez, R. J. Geraghty, R. I. Montgomery, J. C. Whitbeck, R. Xu, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, and P. G. Spear. (1998). A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by herpes simplex virus type 2, mutants of herpes simplex virus type 1 and pseudorabies virus. *Virology* 246, 179–189.

Wagner, M. J., Sharp, J. A., Summers, W. C. (1981). Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of Herpes Simplex Virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 1441-1445.

Watson, R. L., Weis, J. H., Salstrom, J. S., Enquist, L. W., (1982). Herpes simplex virus type 1 glycoprotein D gene: nucleotide sequence and expression in *Echerichia coli*. *Science* 218, 381-383.

Weir, J. P. (2001). Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene* 271, 117-130.

Whitbeck, J. C., Connolly, S. A., Willis, S. H., Hou, W., Krummenacher, C., Ponce De Leon, M., Lou, H., Baribaud, I., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H. (2001). Localization of the gD-binding region of the human herpes simplex virus receptor, HveA. *J Virol* 75, 171-180.

Whitebeck, J. C., Peng, C., Lou, H., Xu, R., Willis S. H., Ponce De Leon, M., Peng, T., Nicola, A. V., Montgomery, R. I., Warner, M. S., Soulika, A. M., Spruce, L.A., Moore, W. T., Lambris, J. D., Spear, P. G., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. (1997). Glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry. *J Virol* 71, 6083-6093.

Whitley, R. J. (2002). Herpes simplex virus infection. *Semin Pediatr Infect Dis* 13; 6-11.

Whitley, R. J. and B. Roizman. (2001). Herpes simplex virus infections. *Lancet* 357, 1513-1518.

Wurth, C., Thomas, R. M., Folkers, G., Scapozza, Leonardo. (2001). Folding and self-assembly of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. *J Mol Biol* 313, 657-670.

Yoon, M., Zago, A., Shukla, D., Spear, P. G. (2003). Mutations in the N termini of herpes simplex virus type 1 and 2 gDs alter functional interactions with the entry/fusion receptors HVEM, nectin-2, and 3-O-sulfated heparin sulphate but not with nectin-1. *J Virol* 77, 9221-9231.

Yuste, E., Sánchez-Palomino, S., Casado, C., Domingo, E., López-Galíndez, C. (1999). Drastic fitness loss in human immunodeficiency virus type 1 upon serial bottleneck events. *J Virol* 73, 2745-2751.

Yuste, E., López-Galíndez, C., and Domingo, E. (2000). Unusual Distribution of Mutations Associated with Serial Bottleneck Passages of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 74, 9546-9552.

Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E., Andino, R. (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions within a viral population. *Nature* 439, 344-348.

Zago, A., Jogger, C. R., Spear, P. G. (2004). Use of Herpes Simplex Virus and Pseudo rabies virus chimeric glycoprotein D molecules to identify regions critical for membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 17498-17503.

Zhou, G., Avitabile, E., Campadelli-Fiume, G., Roizman, B. (2003). The domains of glycoprotein D required to block apoptosis induced by Herpes Simplex Virus 1 are largely distinct from those involved in cell-cell fusion and binding to nectin 1. *J Virol* 77, 3759-3767.

Zhou, G., Roizman, B. (2002) Truncated forms of glycoprotein D of Herpes Simplex Virus 1 capable of blocking apoptosis and of low-efficiency entry into cells forms a heterodimer dependent on the presence of a cysteine located in the shared transmembrane domains. *J Virol* 76, 11469-11475.