
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

EFECTO DE LA PROTEÍNA PRESENTADORA
DE ANTÍGENOS TAP EN LA INFECCIÓN *IN*
VIVO DEL VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 1 Y
GENERACIÓN DE MODELOS TRANSGÉNICOS
PARA SU ESTUDIO

ESTHER SERRANO SAIZ
junio 2007

MEMORIA PRESENTADA POR LA LICENCIADA
ESTHER SERRANO SAIZ
para aspirar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Directores de esta tesis:

Dr. JAVIER SANTOS BURGOS MUÑOZ
Doctor en Ciencias Biológicas

y

Dr. FERNANDO VALDIVIESO AMATE
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Madrid, 2007

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular/ Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, con la financiación de la Obra Social Caja Madrid/AFAL.



SUMMARY

The vast majority of Alzheimer's disease (AD) cases have a complex etiology, with multiple genetic and environmental factors influencing its pathogenesis. Recently, herpes simplex virus type 1 (HSV-1) has been related with this dementia in conjunction with several host factors as the allele $\epsilon 4$ of the apolipoprotein E. HSV-1 may reach the central nervous system (CNS) via either the neural or the hematogenous route. Although the main route for HSV-1 infection in humans is certainly neural, hematogenous infection could be important in some contexts, especially when immune system is affected. In fact, if HSV-1 plays a true role in this dementia, the mechanisms of the immune system should be also compromised. HSV-1 expresses an immediate-early protein (ICP47) that blocks the major histocompatibility complex class I presentation pathway, by binding to the transporter associated with antigen presentation (TAP). Human TAP forms a heterodimer consisting of TAP1 and TAP2 subunits, where the TAP2B variant (but not TAP2A), has been associated to AD.

In the present work, several infection parameters were analysed in order to characterise the HSV-1 challenge to the CNS. In this sense, the neural and hematogenous routes of infection were studied. For the neural route, intranasal and snout abrasion inoculations were employed; for the hematogenous route, intraperitoneal and intravenous vias were used. Additionally, the virulence and invasiveness of two viral strains (KOS and F) were analysed. Then, the influence of the ICP47 viral protein in the infection (in conjunction with murine TAP protein) was studied. Finally, three transgenic mouse lines with the main human TAP variants were generated: *TAP1A*, *TAP2A* and *TAP2B*. Furthermore, the analysis of the transgenic mice has proven that the pattern of expression of the transgenes in the nervous system.

The results here obtained indicates that: (i) hematogenous route is more efficient than neural route for the HSV-1 infection; (ii) hematogenous and neural routes describe two different pathways to colonise the brain by the HSV-1; (iii) ICP47 viral protein influences general invasiveness; (iv) murine TAP is irrelevant for the viral infection; (v) the neuroinvasiveness of the ICP47 defective virus is recovered in TAP deficient mice; (vi) three transgenic mouse lines containing the main human TAP variants (*TAP1A*, *TAP2A* and *TAP2B*) were constructed.

Here, the HSV-1 infection to the CNS has been characterised, and several host and viral factors influencing the brain infection were analysed, especially the ICP47 and the TAP protein. Moreover, three transgenic mouse lines containing the several human variants of TAP have been generated. These animals could be used as tools for the investigation of several human diseases, where the involvement of HSV-1 in the Alzheimer disease will be a priority.

A mis padres



Quiero agradecer a Fernando Valdivieso la oportunidad que me dio hace 5 años de entrar en su laboratorio para poder realizar esta tesis doctoral y lanzarme así al mundo de la ciencia. Gracias por el apoyo recibido durante estos años, por tener siempre la puerta abierta para escucharnos y por contagiarnos su entusiasmo por la ciencia.

Hubo dos momentos cruciales en mi carrera, cuando elegí estudiar Biología y cuando tuve que decidir la línea de investigación donde desarrollar mi tesis doctoral. En estos dos puntos de inflexión en mi incipiente vida científica estuve guiada por la mano de Miguel Peñalva, al que tengo que agradecer el acierto en sus consejos que sin duda me han servido para llegar hasta aquí. Gracias.

Es ya tradición escribir una enorme lista de gente a la que agradecer la realización de la tesis, pero me resulta realmente difícil no caer en tópicos y de este modo desvirtuar lo que en realidad debería ser un gesto espontáneo y desinteresado. Aun así aquí va la lista interminable de personas que de algún modo u otro, más o menos científico, recuerdo en el final de esta etapa.

Tengo que agradecer el apoyo que he recibido durante todos estos años de la gente del 340. En este laboratorio he encontrado buenos compañeros, pero también, aunque no era el objetivo (pero los objetivos se ponen al final) grandes amigos. A Carlitos, por contagiarme, aunque sea un poquito, de su optimismo ante la vida; a Juan, un camarero que un día me llevé a mi casa, gracias por escucharme; a M^aCarmen, que es muy castellana, pero al final se hace querer; a Anna, que aunque pasó poco tiempo por Madrid dejó huella convirtiéndose en una buena amiga; a Jorge, oriundo de la Vía Láctea, todo un descubrimiento; a Estela, que ha sido fundamental en esta tesis uniendo Madrid y Granada, y que se convirtió en una amiga, a pesar de que nos intentó asesinar con un salmorejo; a Pier, porque me tendió una mano cuando llegué al labo. De los supervivientes, me gustaría agradecer a Jesús, con el que inicié este camino, su apoyo y sobretodo la vuelta a 200 km/h en Lilín. Espero haber aprendido al menos a hacer bien las cuentas. A Junior que siempre ha estado ahí para echarme una mano y aguantar mis lamentos, y por supuesto, para darnos una charla en su perfecto inglés (ta); a Isabel, que a pesar de ese carácter (tan dulce) al final nos prestas una gran ayuda; a Soraya, que ya prometía en los pasillos de la facultad, por sus ánimos y estar siempre disponible; a Diego, uno de mis sicarios; a Mamen, Teresa, Mery (hola), M^aJe, Raquel, Anita y Christian. También a los vecinos del 330, Enrique, Kike y compañía, por el apoyo logístico y a Marta y Juanjo, del “cenebé”, por intentar una y otra vez que saliera el maldito southern. Gracias a todos.

Gracias al Pichón, del que no dejo de aprender cada día; a Jesús por sus consejos y dejarle el móvil a Anna; a Héctor; a Jose Felix, que vaya lata te damos con las tesis y a Esteban, que realmente es del Madrid aunque lo niegue. Gracias a todos por esas tardes de fútbol porque así me he dado cuenta de que ese, efectivamente, no es mi deporte, pero sobretodo por la terracita, donde arreglábamos el mundo (o todo lo contrario) la Barraka, el Juglar, la sala Sol y tantos otros sitios, ¡qué buena época!

A Antonio cómplice de tantas cosas, gracias por apoyar mi candidatura. A la Ruiz, una de las responsables de que me metiera en esto de la tesis, gracias por “amadrinarme” hace unos años (aunque todavía no he ido a hacer el turno de limpieza al 201); a los consejos de Espe, por su sinceridad y porque se puede contar con ella para todo. A Cati y a Sandra. A Carlota (a pesar de que nunca nos quiere cantar), gracias por tu generosidad. A Ali y a Elena, que siempre te reciben con una sonrisa y están tan dispuestas a prestar cualquier tipo de ayuda, incluso la simple organización de una tesis.

A mis compis, con los que compartí un año estupendo en el “pueblo”: nunca habría imaginado que Álvaro fuera a convertirse en uno de mis mejores amigos (con ese lado oscuro); a Fernando, por ser un ejemplo de tío con principios, un amigo sin condiciones (y que no te mereces agradecimientos). A los bioquímicos: Al-Anín, siempre tan cariñoso; Desi, que nos ha abandonado por otros compañeros un poco más recios; Leire, que aprenderá catalán antes que castellano; Pablo y su pesimismo ante la ciencia; Lucía y su tía (y a Alicia por supuesto); Inma, por su visión crítica del mundo y Gonzalo (alias detritus). A los Cuezvas, siempre dispuestos a dejarme algo en el último momento.

A mis amigos los D.F.K.2: Alvarito, Dani, el Maulas, Oscar, Jose, el Rodro, el Kawa. Creo que nunca se han enterado muy bien de qué va la tesis, pero así siempre tengo algo nuevo que contarles. A mis tres amiguitas: a Victoria, la más elegante de todas, con la que he crecido y con la que he compartido tantas y tantas aventuras, y las que nos quedan amiga; a Izaskun, a la que he admirado siempre, aunque no te dejes querer; a Elvira, my friend, inseparables desde que descubrimos nuestras vidas paralelas. No sé qué haría sin ti.

A Nieves, Isa y Cris, mi segunda familia que han logrado hacerme sentir como una hermana más.

A Iñaki, la persona más crítica que conozco, que nunca dejará de discutirme todo. Gracias por estar siempre a mi lado, aunque nos separe un océano.

A Carlos, que el pobre se ha tragado prácticamente toda la tesis, los buenos y malos momentos (y encima le hago currar a última hora con la portada). Gracias por ser el mejor amigo que nunca he tenido

A mi familia, a mi abuela, fiel seguidora de esta tesis, a mis tíos, a mis primas y hermanas Sol, Bea, Ali, Javi e Irene, que siempre me han animado. Al Doctor Fabi, que espero que no pregunte durante la tesis y por sus clases de anatomía telefónicas.

A Kurosh, mi segundo padre. A mi padre (que lío), que me ha mostrado siempre su apoyo y admiración. Y a mi madre, por su apoyo incondicional, porque me lo ha dado todo y porque se que puedo contar con ella siempre. Sin ellos nunca habría podido llegar hasta aquí.

A Julio, porque de una u otra forma me has acompañado durante todo este tiempo. Porque aunque has estado tan lejos has logrado que nunca dejara de sentirte cerca. Las vidas que da la vuelta...

Finalmente he de agradecer a Javi, de quién realmente he aprendido en esta tesis. Gracias por el esfuerzo de estos últimos meses, por enseñarme a ser crítica con el trabajo, a entender que el orden es fundamental (como las boinas), a escribir (sin tirar un saco de comas), a creer en uno mismo. Pero además, y esto es un extra (“porque aquí no hemos venido a hacer amigos”) gracias por tu amistad.

Índice

Índice

0. Acrónimos y abreviaturas.....	5
1. Introducción.....	11
1.1. Características generales del HSV-1.....	11
1.2. Ciclo biológico de la infección por HSV-1.....	12
1.2.1. Primoinfección o infección primaria.....	12
1.2.2. Evasión del sistema inmune.....	14
1.2.3. Latencia.....	15
1.2.4. Reactivación.....	17
1.3. Epidemiología de la infección por HSV-1 y enfermedades asociadas.....	18
1.4. Modelos experimentales de infección por HSV-1.....	19
1.4.1. Modelos animales.....	19
1.4.2. Rutas de infección.....	20
1.4.3. Curso temporal de la infección.....	21
1.4.4. Cepas de ratón.....	21
1.4.5. Cepas de virus.....	22
1.5. La enfermedad de Alzheimer y el HSV-1.....	22
1.6. Implicación de los polimorfismos de TAP en la EAE.....	24
1.7. Participación de la proteína TAP en la infección por HSV-1.....	25
1.7.1. Estructura.....	26
1.7.2. Mecanismo y selectividad de péptidos.....	26
1.7.3. Estabilización, organización genómica y regulación.....	27
1.7.4. Enfermedades y TAP.....	28
1.7.5. HSV-1 y TAP.....	29
2. Objetivos.....	35
3. Materiales y métodos.....	39
3.1. Materiales.....	39
3.1.1. Reactivos.....	39
3.1.2. Anticuerpos.....	39
3.1.3. Vectores de clonaje.....	40
3.1.4. Virus.....	41
3.1.5. Células.....	41
3.1.6. Animales.....	41
3.2. Métodos.....	42
3.2.1. Manipulación de ratones.....	42

3.2.2. Manipulación de virus	42
3.2.3. Infección de los ratones	43
3.2.3.1. Inoculación intravenosa.....	43
3.2.3.2. Inoculación intraperitoneal.....	43
3.2.3.3. Inoculación intranasal.....	43
3.2.3.4. Inoculación por abrasión del morro.....	43
3.2.4. Disección y tratamiento de las muestras para extracción de DNA, RNA y proteínas ...	44
3.2.4.1. Sangrado y disección de los animales	44
3.2.4.2. Homogenización de órganos	44
3.2.4.3. Extracción de DNA.....	45
3.2.4.4. Extracción de RNA total.....	45
3.2.4.5. Extracción de proteínas	45
3.2.5. PCR cuantitativa a tiempo real	45
3.2.5.1. PCR cuantitativa con SYBR Green I®	46
3.2.5.2. PCR cuantitativa con sondas TaqMan-MGB®	47
3.2.6. RT-PCR (transcripción inversa y amplificación del cDNA por PCR)	47
3.2.7. Inmunomarcaje de proteínas tras transferencia proteica (<i>Western-Blot</i>)	48
3.2.7.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS-PAGE	48
3.2.7.2. Electrotransferencia	48
3.2.7.3. Inmunodetección y revelado	48
3.2.8. Perfusión y tratamiento de las muestras para inmunohistoquímica	49
3.2.8.1. Disección de órganos	49
3.2.8.2. Preparación de las muestras	49
3.2.8.3. Inmunohistoquímica de campo claro	50
3.2.9. Generación de plásmidos	51
3.2.10. Transfección de células	51
3.2.11. Generación de los ratones transgénicos mediante microinyección	51
3.2.12. Mantenimiento de las colonias	52
3.2.12.1. Extracción de DNA genómico de los ratones	52
3.2.12.2. Análisis mediante PCR.....	53
3.2.13. Análisis estadístico	54
4. Resultados	59
4.1. Optimización del método de detección del genoma viral	
mediante PCR cuantitativa	59
4.2. Caracterización de la infección	61
4.2.1. Estudio de la ruta hematogena de infección del HSV-1	62
4.2.1.1. Progresión de la enfermedad en la infección hematogena	62
4.2.1.2. Efecto de la vía de inoculación en la cuantificación de la carga viral	63
4.2.1.2.1. Efecto de la vía de inoculación hematogena en la infección a 4 d.p.i. ...	63

4.2.1.2.2. Efecto de la vía de inoculación hematogena en la infección aguda a 5.7 d.p.i.....	65
4.2.1.3. Estudio inmunohistoquímico de la infección hematogena en el cerebro.....	67
4.2.1.4. Estudio comparativo de la infección hematogena de las cepas virales HSV-1 KOS y F ..	68
4.2.1.5. Cinética de infección del HSV-1 F en la infección hematogena.....	70
4.2.1.6. Curva de dosis de HSV-1 F	72
4.2.2. Estudio de la ruta neural de infección del HSV-1	73
4.2.2.1. Progresión de la enfermedad en la infección neural	74
4.2.2.2. Estudio de la ruta neural en la fase de infección aguda	75
4.2.2.2.1. Efecto de la vía de inoculación en la cuantificación de la carga viral a \$ d.p.i....	75
4.2.2.2.2. Efecto de la vía de inoculación en la cuantificación de la carga viral a 5.7 d.p.i. ...	77
4.2.2.2.3. Estudio inmunohistoquímico de la infección neural en el cerebro	80
4.2.2.3. Estudio de la ruta neural en la fase de latencia	81
4.2.2.4. Efecto de la dosis de HSV-1 KOS en la infección neural	82
4.2.2.4.1. Cinética de HSV-1 KOS con la dosis de 10 ⁶ ufp.....	83
4.2.2.4.2. Cinética de HSV-1 KOS con la dosis de 10 ⁷ ufp.....	85
4.2.2.5. Estudio comparativo de la infección neural de las cepas HSV-1 KOS y F	88
4.3. Influencia de la proteína viral ICP47 y de la proteína murina tap1	
en la infección intravenosa del HSV-1	90
4.3.1. Efecto de la proteína ICP47 en la infección hematogena de ratones salvajes	91
4.3.2. Efecto de la proteína TAP murina en la infección hematogena del HSV-1.....	92
4.3.3. Efecto de la proteína ICP47 en ratones deficientes en <i>tap1</i>	93
4.3.4. Análisis de la expresión de <i>tap1</i> mediante <i>Western-Blot</i>	95
4.4. Generación de ratones transgénicos que expresan los genes	
TAP humanos	97
4.4.1. Clonaje y mutagénesis de TAP1 y TAP2 en un vector de	
expresión neuronal	98
4.4.1.1. Clonaje en pCR TM II	98
4.4.1.2. Obtención de <i>TAP2B</i> mediante mutagénesis dirigida	99
4.4.1.3. Introducción de la secuencia Kozak.....	99
4.4.1.4. Clonaje en MoPrP.Xho.....	100
4.4.2. Clonaje en pcDNA3	101
4.4.2.1. Análisis de la expresión de <i>TAP1A</i> , <i>TAP2A</i> y <i>TAP2B</i>	101
4.4.3. Microinyección de los vectores <i>MoPrP.TAP1A</i>, <i>MoPrP.TAP2A</i>	
y <i>MoPrP.TAP2B</i>.....	103
4.4.4. Obtención de una línea congénita C57BL/6J deficiente en <i>tap1</i>	103
4.4.5. Caracterización de la expresión de los ratones transgénicos	105
4.4.5.1. Análisis de la expresión de <i>TAP1A</i> en los ratones B6.CBA-TAP1A(<i>tap1</i> ^{-/-}).....	105

4.4.5.2. Análisis de la expresión de TAP2A y TAP2B en los ratones B6.CBA-TAP2A(tap1 ^{-/-}) y B6.CBA-TAP2B(tap1 ^{-/-})	106
5. Discusión	111
5.1. El virus herpes simplex tipo 1: un patógeno asociado a la enfermedad de Alzheimer.	111
5.2. Modelos animales para el estudio de la neuroinfección del HSV-1	112
5.3. La evasión del sistema inmune: un proceso clave en los procesos de infección viral	118
5.3.1. ICP47, la respuesta viral que bloquea TAP	119
5.3.2. TAP: una proteína encargada de la respuesta inmune	120
5.4. Generación de ratones transgénicos que expresan los genes del complejo TAP humanos	121
6. Conclusiones	127
7. Bibliografía	133
8. Anexo: artículos publicados	147

Acrónimos y abreviaturas

0. Acrónimos y abreviaturas

a.e.c.	Antes de la era común
a.m.	abrasión del morro
Ala	Alanina
apoE	Apolipoproteína E de ratón
APOE	Apolipoprotina E de humanos
<i>APOE</i>	Gen de la apolipoprotina E de humanos
<i>apoE</i>	Gen de la apolipoprotina E de ratón
APP	Proteína Precursora del β -amiloide
ATP	Trifosfato de Adnosina
B.O.E.	Boletín Oficial del Estado
BrEt	Bromuro de Etidio
BSA	Albúmina de Suero Bovino
C.B.M.	Centro de Biología Molecular
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CMV	Citomegalovirus
C-terminal	Extremo Carboxilo Terminal
d.p.i.	días post infección
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleótidos
DTT	Ditiotreitol
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAE	Enfermedad de Alzheimer Esporádica
EAF	Enfermedad de Alzheimer Familiar
EDTA	Ácido Etilen-Diamino-Tetraacético
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
<i>gapdh</i>	gen de la glideraldehido fosfato deshidrogenada de ratón
HCl	Ácido clorhídrico
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus type I</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HSE	Encefalitis asociada al HSV-1
HSV-1/HSV-2	Herpes Simplex virus tipo 1 y 2
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenosa
ICP0/ICP4/ICP6/ICP27/ICP47	Proteína de Infección Celular 0/4/6/27/47
IFN- γ	Interferón γ

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

IHQ	Inmunohistoquímica
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LAT	Transcrito asociado a latencia
MHC-I/MHC-II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo I y II
<i>MOCK</i>	No infectado
mRNA	Ácido ribonucleico Mensajero
NaCl	Cloruro sódico
NaOH	Hidróxido sódico
ng	nanogramos
NGS	Suero Normal de Cabra
NK	<i>Natural Killer</i>
N-terminal	Extremo Amino Terminal
P.F.	Punto de Fusión
pb	Pares de Bases
PBS	Tampón Fosfato Salino
PBST	PBS con Tween-20 0.05%
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLC	Complejo de Carga del Péptido
<i>prnd</i>	Gen de la proteína prión de ratón
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción Inversa Seguida de Amplificación Mediante la Reacción en cadena de la polimerasa
SD	Desviación estándar
SDS	Sulfato Sódico de Dodecilo
SEM	Desviación estándar de la media
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
T ^a	Temperatura
TAP	Transportador Asociado al Procesamiento de antígenos de humanos
tap ^{-/-}	Ratón deficiente en el gen <i>tap1</i>
<i>tap1</i>	Gen de la proteína tap1 de ratón
tap1	Proteína tap1 de ratón
<i>TAP1/TAP2</i>	Genes de las proteínas TAP1 y TAP2 humanos
TAP1/TAP2	Proteínas TAP1 y TAP2 de humanos
TBS	Tampón Tris Salino
TBST	TBS-Tween20 al 0.05%
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
Thr	Treonina
<i>tk</i>	gen de la timidín kinasa del HSV-1
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>

Tris	Trishidroximetilaminometano
u.a.....	Unidades Arbitrarias
ufp.....	Unidades Formadoras de Placas
Us12	Gen viral que codifica para ICP47
VP16	Proteína del Virión 16
WB	<i>Western-Blot</i>
Δ ICP47.....	Virus deficiente en la proteína viral ICP47

Introducción

1. Introducción

1.1. Características generales del HSV-1

El término “herpes” aparece por primera vez 2 500 años a.e.c., procede del griego y significa “reptar” lo que describe las clásicas lesiones observadas en la piel. A lo largo de la historia la investigación sobre los herpes se ha desarrollado desde la mera clasificación de las lesiones hasta la descripción de la enfermedad, su epidemiología y, por último la caracterización molecular (Roizman y Whitley, 2001).

El Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1) pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Simplexvirus*.

Los herpesvirus, y en concreto el HSV-1, se caracterizan por la arquitectura del virión que consiste en un *núcleo*, que contiene DNA lineal de doble cadena, una *cápsida* icosaédrica de aproximadamente 110 nm de diámetro, el *tegumento* o *matriz*, que es el material que rodea la cápsida que contiene

de 15 a 20 proteínas, y finalmente la *envuelta* compuesta por, al menos 8 glicoproteínas del virus (Roizman, 1996) (figura I1).

Los herpesvirus están ampliamente diseminados en la naturaleza, donde casi todas las especies animales poseen, al menos, un virus herpes asociado. La familia de los herpes ha evolucionado para lograr una alta adaptación al ser humano: estos virus se caracterizan por un ciclo reproductivo corto, una eficiente destrucción de la célula infectada (durante el ciclo lítico) y la capacidad de establecer latencia, principalmente en los ganglios sensoriales (Ward y Roizman, 1994), aunque también en regiones del encéfalo (Baringer y Pisani, 1994).

Desde el punto de vista molecular, el HSV-1 presenta una estructura similar al resto de los integrantes de la familia *Herpesviridae*. El genoma viral, de aproximadamente 150 kb, consiste en dos componentes unidos covalentemente y designados como L (del inglés *long*) y S (del inglés *short*) (figura I2). Cada uno contiene una secuencia única flanqueada por repeticiones invertidas (Roizman,

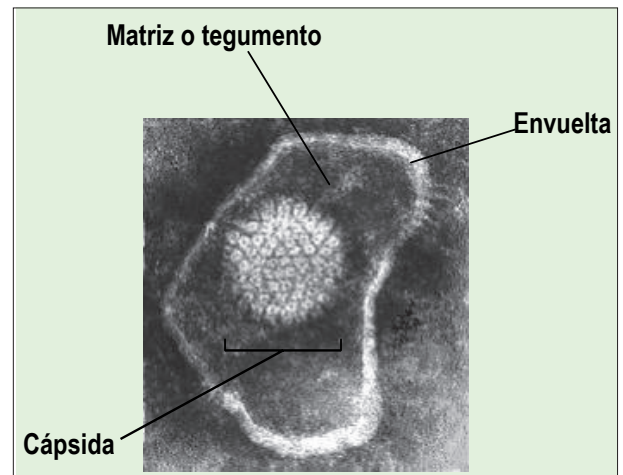


Figura I1. Estructura del HSV-1. Imagen de microscopía electrónica que muestra la estructura característica de los herpesvirus, donde se pueden apreciar la envuelta, la matriz y la cápsida icosaédrica. Imagen adaptada de Linda M Stannard (<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/emimages.html>).

1996). Esta molécula de DNA termina en las secuencias *a* que permiten la circularización del genoma durante la infección latente, mientras que el DNA permanece de forma lineal durante el ciclo lítico en el cual se produce la expresión génica (Rock y Fraser, 1983).

El genoma del virus codifica para aproximadamente 100 transcritos y más de 80 secuencias codificantes (Ward y Roizman, 1994). El patrón general de expresión génica fue descrito hace más de 20 años, y refleja una elegante y compleja regulación que permite a un virus con un material genético de pequeño tamaño expresar un alto número de genes. Se replica en tres rondas de transcripción que producen tres grupos de proteínas virales que se pueden clasificar en α , β , y γ . Las α (inmediatamente tempranas) son las encargadas principalmente de la regulación de la replicación viral. Estas proteínas activan la transcripción de otros genes virales sirviéndose de factores celulares. Las proteínas β (tempranas) se encargan principalmente de la síntesis y el empaquetamiento del DNA viral. Por último, las proteínas tardías $\beta\gamma$ y γ (estrictamente tardías) son proteínas estructurales que forman parte del virión (Weir, 2001).

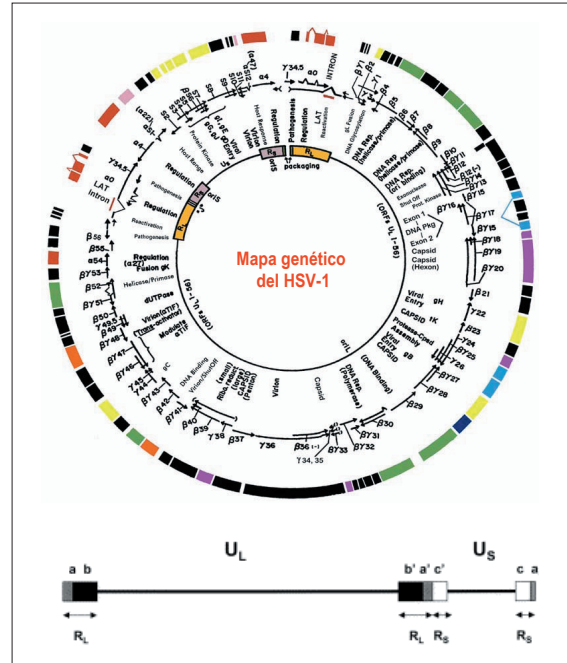


Figura 12. Mapa genético y estructura del genoma de HSV-1. Esquema representativo de todos los genes virales y su situación en el genoma. Adaptado de The Homepage of Dr. Edward K. Wagner (<http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv7f.html>). UL y US representan las secuencias únicas long y short. RL y RS representan las secuencias repetidas long y short. (Weir, 2001).

1.2. Ciclo biológico de la infección por HSV-1

1.2.1. Primoinfección o infección primaria

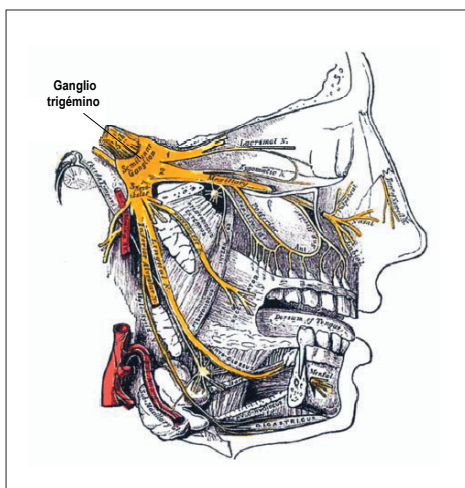


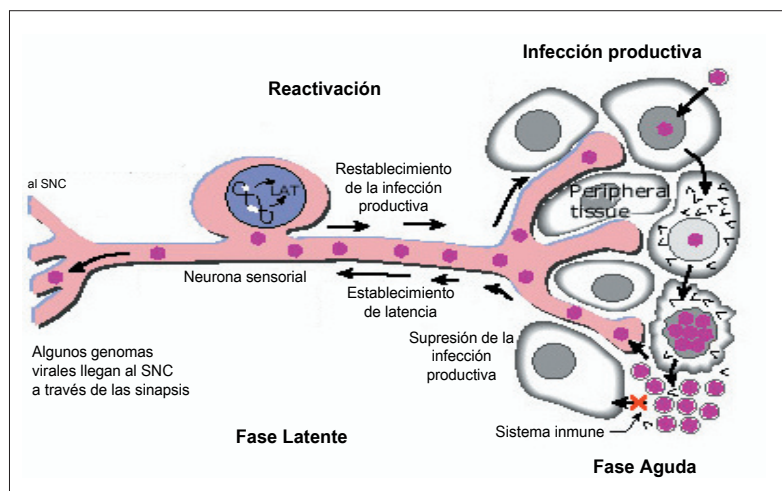
Figura 13. Esquema de la conexión del nervio trigémino con el ganglio trigémino, lugar de entrada del virus en la ruta neural.

La infección primaria se define como el proceso infeccioso asociado al primer contacto con el hospedador. Normalmente se produce de forma asintomática, aunque en algunos casos puede producir lesiones en los lugares de primoinfección, que superan en intensidad a los síntomas desarrollados en infecciones recurrentes debido a una respuesta inflamatoria mayor (Whitley, 1996).

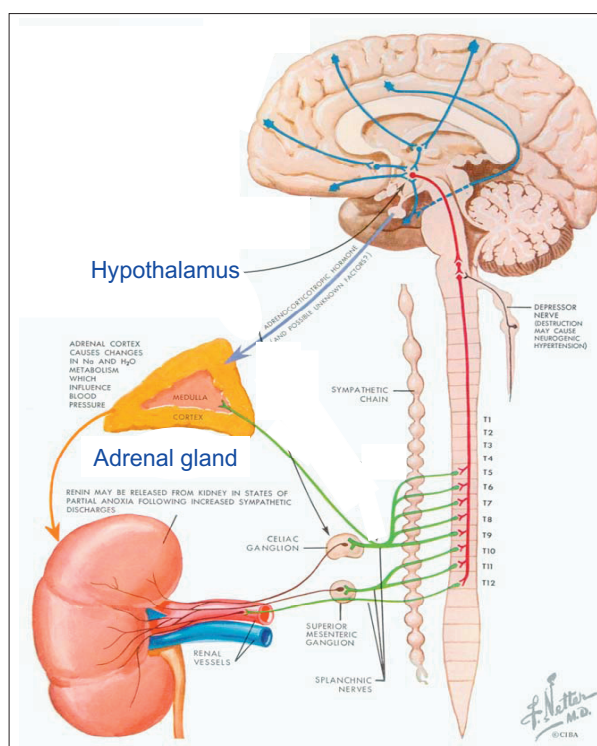
Habitualmente durante la infección primaria el virus infecta a través de una ruta neural, donde en primer lugar

entra en contacto con superficies mucosas o heridas en la piel (figura I3). Tras la replicación viral en el lugar de la infección, el virus viajará mediante transporte retrógrado axonal hasta los ganglios trigémino o sacro (de la raíz dorsal) (Baringer y Swoveland, 1973), sitios preferenciales del virus para el establecimiento de la latencia. (Weir, 2001; Whitley y Roizman, 2001). Tras el establecimiento de la latencia, un estímulo apropiado puede causar la reactivación viral (figura I4) que se hace evidente en los sitios de infección primaria. No obstante, se ha descrito que la infección puede afectar a múltiples órganos como consecuencia de la viremia en individuos inmunosuprimidos (Whitley, 1996).

Figura I4. Esquema del ciclo biológico del HSV-1. Imagen adaptada de The Homepage of Dr. Edward K. Wagner (<http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv7f.html>).



La primoinfección también puede ocurrir a través de la sangre en lo que se conoce como infección hematogena del virus (Johnson, 1964). Mediante esta ruta se produce una infección sistémica a partir de la viremia que afecta a órganos periféricos entre los que se encuentran el hígado, el bazo,



los ovarios y la glándula adrenal (Burgos et al., 2002a; Johnson, 1964). Esta glándula permite el acceso del virus a la médula espinal a través de conexiones anatómicas del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal (Hill et al., 1986b). Tras la infección de estos órganos periféricos el virus alcanza el encéfalo y los ganglios trigéminos (Burgos et al., 2002a; Cook and Stevens, 1973) (figura I5), donde finalmente establece latencia

Figura I5. Esquema de la conexión de la glándula adrenal con la médula espinal y el hipotálamo. Imagen adaptada de www.netterart.com, Dr. Frank H. Netter.

(Burgos et al., 2006b), como se ha demostrado en nuestro laboratorio en un modelo murino de infección hematogena tras inoculación intraperitoneal (Burgos et al., 2002a; Ramírez, 2006), lo que corrobora los trabajos realizados por Johnson a principios de los años 60 (Johnson, 1964).

Esta ruta de infección se ha descrito que puede ocurrir de forma natural en individuos inmunosuprimidos y en neonatos (Arvin et al., 1982; Burgos et al., 2006b; Johnson, 1964; Montgomerie et al., 1969; Whitley, 1996). Recientemente en nuestro laboratorio se ha demostrado que, al menos en ratones, existe una ruta natural de transmisión vertical del HSV-1 de carácter puramente hematogeno (Burgos et al., 2006a), puesto que el virus infecta al feto desde la sangre de madres latentemente infectadas a través de la placenta. En los neonatos el virus se encuentra en la sangre y en el sistema nervioso central (SNC), debido al carácter neurotrópico del HSV-1, especialmente en las neuronas del hipocampo desde donde se puede producir la reactivación viral. Este fenómeno de transmisión vertical hematogena podría explicar la viremia comúnmente detectada en neonatos en humanos, así como la mortalidad asociada al herpes neonatal, y el carácter sistémico de la infección del HSV-1 en neonatos.

1.2.2. Evasión del sistema inmune

La infección por HSV-1 provoca, tanto en humanos como en animales, una respuesta inmunológica del hospedador mediada por la respuesta inmune humoral, a nivel de anticuerpos circulantes y también por la respuesta inmune celular, incluyendo linfocitos T citotóxicos (CD8⁺), T ayudantes o *helper* y células T de memoria (Lopez y O'Reilly, 1977). El valor relativo de cada uno de ellos depende en gran medida de la ruta de infección utilizada por el virus (Lopez, 1975).

Como parte del proceso de co-evolución entre el virus y el hospedador, el HSV-1 ha desarrollado una serie de mecanismos para escapar de la vigilancia del sistema inmune, lo que explicaría en parte la alta prevalencia del virus en la población. Los linfocitos T citotóxicos se encargan de reconocer células infectadas por el virus a través de los antígenos virales expuestos por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (las siglas en inglés: MHC I). El HSV-1 inhibe el transporte de estas moléculas a la superficie celular (Fruh et al., 1995; Hill et al., 1994) mediante la unión del polipéptido viral ICP47 (proteína de infección celular 47) al transportador asociado al procesamiento de antígenos, TAP (Hill et al., 1995), evitando así la actuación de estos linfocitos T citotóxicos sobre las células infectadas. Además se ha descrito que el HSV-1 puede producir la destrucción de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ tras su infección (Cook y Stevens, 1973), mediante un mecanismo acuñado como “fraticidio” (Raftery et al., 1999).

Las células B juegan un papel importante en la defensa tanto humoral, con la producción de anticuerpos contra el HSV-1 (Simmons y Nash, 1985), como adquirida, al funcionar como células presentadoras de antígenos y así activar a los linfocitos CD4⁺ (Deshpande et al., 2000). El HSV-1 ha desarrollado mecanismos para interferir en la habilidad de las células B de activar a las células CD4⁺ mediante el bloqueo de la formación del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo II (MHC II)-péptido (Neumann et al., 2003), lo que en último término significaría la evasión del sistema inmune humoral de especial relevancia en las infecciones primarias.

El HSV-1 presenta además otros mecanismos que afectan a esta respuesta humoral como es la inhibición del complemento y el dominio Fc de las inmunoglobulinas G mediante las glicoproteínas E y C (Lubinski et al., 2002). Este virus ha desarrollado, de manera adicional, mecanismos para evitar la respuesta inmune innata que se presenta en las primeras rondas de replicación viral ya que interfiere en la activación de las células *Natural Killer* (NK) por parte de las células dendríticas activadas durante la infección viral, mediante la supresión del reciclado de las moléculas CD1 (Yuan et al., 2006). Estas moléculas son similares en estructura y función a las del MHC I, aunque presentan lípidos y glicolípidos a los receptores de las NK (Grubor-Bauk et al., 2003).

1.2.3. Latencia

La latencia se ha definido de forma clásica como la persistencia del genoma viral sin la producción de partículas infectivas, desde la que se puede producir la reactivación (Roizman et al., 1965). Sin embargo, esta fase se caracteriza por una leve transcripción de los genes líticos, a pesar de que el virus se encuentra en una forma no replicativa (Kramer y Coen, 1995). De hecho, las técnicas de detección más sensibles han permitido detectar la expresión de genes líticos como ICP4, *timidin kinasa* (*tk*), ICP0, ICP27 e ICP6 (Chen et al., 2002; Kramer y Coen, 1995). No obstante, no ha sido aclarado si la activación de estos genes es debida a reactivaciones espontáneas o a niveles muy bajos de expresión en neuronas concretas (Feldman et al., 2002).

En humanos el virus establece latencia principalmente en las neuronas de los ganglios sensoriales (Baringer y Swoveland, 1973), aunque se ha propuesto que también reside en forma latente en otras regiones del encéfalo (Baringer y Pisani, 1994; Rock y Fraser, 1983; Sequiera et al., 1979). Recientemente, Chen y colaboradores han demostrado que tras la infección corneal del HSV-1, el virus puede reactivarse no sólo desde el ganglio trigémino, sino también desde el tallo cerebral (Chen et al., 2006).

El estado de latencia puede venir determinado por varios factores, como el nivel de virus

producido en la replicación en la infección primaria, que puede estar directamente relacionado con el número de copias de genoma en latencia (Sawtell et al., 1998). Factores celulares del hospedador también afectan al estado de latencia. En este sentido, resultados de nuestro laboratorio han mostrado en un modelo murino de infección hematogena que la presencia de la isoforma ϵ -4 del gen de la apolipoproteína E (*APOE- ϵ 4*), afecta a los niveles de HSV-1 detectados en la infección primaria (aguda) y proporcionalmente a los niveles en la fase de latencia (Burgos et al., 2006b). El estado inmunológico del hospedador, en concreto los linfocitos T CD8⁺, ejerce además un papel fundamental influyendo en el mantenimiento de la latencia (Decman et al., 2005; Whitley y Grann, 1993). De hecho, se ha demostrado que en pacientes inmunosuprimidos las infecciones recurrentes son más habituales (Decman et al., 2005; Whitley, 1996).

Durante la latencia, el genoma viral adopta una configuración circular (Rock y Fraser, 1983) y se mantiene en el núcleo de forma episomal, sin integrarse en el genoma celular (Mellerick y Fraser, 1987). Esta disposición evita la replicación viral, excepto para el transcrito asociado a latencia, LAT (Stevens et al., 1987), del que no se ha encontrado evidencia directa de que codifique ninguna proteína. Se ha sugerido que el control de la transcripción viral podría venir mediado por una regulación de la unión de las histonas celulares a los genes líticos, mientras que las regiones reguladoras de estos genes, así como el promotor de LAT se mantendrían en un estado accesible para la activación (Mitchell et al., 2003).

El estudio con virus mutantes deficientes en LAT ha revelado una mayor virulencia de estos virus aunque la capacidad para establecer latencia permanece intacta, al contrario que con la reactivación (Sawtell and Thompson, 1992a). Así pues parece ser que el transcrito LAT juega un papel clave en la reactivación pero no en la latencia (Sawtell y Thompson, 1992a). No obstante, la función que desempeña LAT aún no está clara y se han propuesto varias funciones para este transcrito (Kent et al., 2003) (Tabla II).

Papel de LAT	Mecanismo	Referencia
Supervivencia neuronal	Antiapoptótico Modulador de infección aguda Modulador del sistema inmune	Perng et al, 2000; Ahmed et al 2000 Garber et al, 1997; Mador et al, 1998 Chen et al, 2000
Mantenimiento de latencia	Secuencia antisentido de ICP0 Secuencia antisentido de ICP4	Farrel et a, 1991; Stevens et al, 1987 Chen et al, 1997
Reactivación	LAT codifica para una proteína que activa promotores de genes líticos Antiapoptótico	Thomas et al, 1999; Thomas et al, 2002 Inman et al, 2001

Tabla II. Funciones propuestas para el transcrito LAT. (Kent et al, 2003)

1.2.4. Reactivación

En humanos, el virus se reactiva como consecuencia de estímulos locales de estrés físico o emocional que provocan situaciones de inmunosupresión (Decman et al., 2005). Entre el 20% y el 40% de la población sufre reactivaciones espontáneas en forma de herpes labiales (Johnson, 1998), aunque estas reactivaciones en muchas ocasiones son de carácter asintomático (Whitley, 1996).

La reactivación implica un cambio en el cual el virus pasa desde un estado quiescente hasta un estado replicativo. En modelos animales existe evidencia de que durante este proceso de reactivación se produce la muerte neuronal (Hill et al., 1987), aunque este fenómeno es un tema controvertido en humanos.

Los mecanismos que controlan el proceso de reactivación son poco conocidos. Se ha sugerido que el estrés celular provoca una situación en la neurona que puede activar los genes celulares y virales necesarios para la reactivación (Miller et al., 1998), aunque los genes virales responsables del inicio del proceso no han sido claramente establecidos. En este contexto se ha propuesto que LAT juega un papel importante (Roizman, 1996), así como la expresión de ICP4 o ICP0 (Samaniego et al., 1997). Además se ha sugerido que el orden temporal de expresión de los genes líticos difiere de la infección lítica (Tal-Singer et al., 1997), de modo que genes de expresión tardía, como el gen de la *timidin kinasa (tk)* podrían iniciar el proceso. Otro factor que parece estar implicado en la reactivación es el número de copias virales (Kosz-Vnenchak et al., 1993). Así, Sawtell y colaboradores comprobaron que existe una correlación entre el número de copias y la capacidad del virus para reactivarse, donde un alto número de copias es crítico para sobrepasar el efecto represor de los factores celulares que mantienen el estado de latencia (Sawtell et al., 1998). Kramer y Coen propusieron que los procesos de reactivación eficientes se restringen a poblaciones concretas de neuronas, donde se han de alcanzar unos niveles de expresión suficientes de los genes líticos para llegar satisfactoriamente a producir reactivaciones evidentes. Factores como el tejido, el tipo celular, la cepa viral o el hospedador intervienen en la facilidad para sobrepasar esos límites (Kramer y Coen, 1995).

Feldman y colaboradores demostraron la presencia de neuronas aisladas que expresan altos niveles de genes líticos (Feldman et al., 2002). Estas neuronas se encuentran rodeadas de células del sistema inmune aun en ausencia de detección de antígenos virales. Este proceso, que denominaron “reactivación molecular”, tan solo ocurre en algunas neuronas concretas, mientras que la mayoría de las neuronas expresan simplemente el transcrito LAT (Feldman et al., 2002). Este fenómeno explicaría la presencia constante de linfocitos CD8⁺ y su papel en el mantenimiento de la latencia, de modo que

cualquier estímulo que disminuya los niveles inmunológicos que mantienen a las neuronas en estado de latencia provocará el desencadenamiento de un proceso de reactivación (Decman et al., 2005).

1.3. Epidemiología de la infección por HSV-1 y enfermedades asociadas

El HSV-1 presenta una alta prevalencia independientemente del grupo poblacional analizado. Diversos estudios indican que el HSV-1 tiene una seroprevalencia de entre el 70% y el 95% (Whitley y Grann, 1993) dependiendo de la localización geográfica (figura I6). La infección primaria, normalmente se produce en edades tempranas, y depende en gran medida del estatus inmunológico del hospedador, ya que los neonatos e individuos inmunosuprimidos son más susceptibles a la infección (Whitley, 1996).

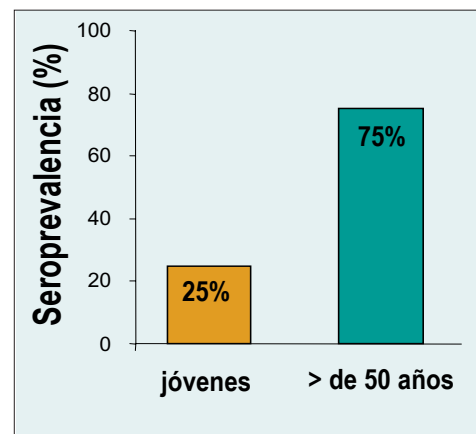


Figura I6. Seroprevalencia en individuos jóvenes y adultos. (Whitley, 1996)

Aunque la infección por el HSV-1 es generalmente asintomática, ocasionalmente es la causante de diversas enfermedades de diferente gravedad. Clásicamente las patologías se han clasificado atendiendo a las manifestaciones clínicas producidas: *herpes labial*, que cursa en función de la gravedad con úlceras (calenturas), fiebre, gingivostomatitis y edema; *herpes genital*, que provoca úlceras y pústulas en las mucosas; *queratitis herpética*, donde se produce la destrucción de las células epiteliales de la córnea y la infiltración de células inflamatorias; *ceguera* causada por el HSV-1; *afecciones de la piel*, generalmente manifestadas en forma de eccema herpético; *herpes neonatal* y *encefalitis* (Whitley, 1996).

Como se ha indicado anteriormente, la infección del HSV-1 en neonatos es de particular importancia. De hecho, la infección neonatal del herpes, aunque ocurre en menor frecuencia que el herpes genital, llega a alcanzar valores de 1 de cada 2 000 ó 5 000 partos (Whitley, 1996). La infección en neonatos puede ocurrir en tres estadios: *in utero*, durante el parto o post-parto. De éstas la más habitual es la infección durante el canal del parto a partir de la madre (Whitley, 2004), aunque la infección intrauterina puede tener gran relevancia. Recientemente, se ha demostrado la transmisión vertical *in utero* del HSV-1 en un modelo murino donde la infección se produce de la madre al hijo por vía hematológica (Burgos et al., 2006b).

La *encefalitis* provocada por herpes (HSE, del inglés *Herpes Simplex Virus Encephalitis*) es la causa más común de encefalitis tanto en niños como en adultos con una tasa de mortalidad

que llega al 70% (Whitley et al., 1981) y donde solo el 2.5% de los casos recuperan una actividad neurológica normal (Tyler, 2004; Whitley, 1996). En adultos, más de dos tercios de los casos de encefalitis afectan a individuos mayores de 50 años, de lo que se deduce que el virus proviene de una reactivación recurrente antes que de una infección primaria (Koskiniemi et al., 1996). La patología de esta enfermedad cursa con inflamación local, necrosis y cuerpos de inclusión (Johnson, 1998), que junto con algunas manifestaciones clínicas de esta enfermedad, (fiebre, alteración de la consciencia, comportamiento extraño y desorden mental), pueden ser indicativas de las zonas del encéfalo afectadas por la infección como el lóbulo temporal (Whitley et al., 1981). Sin embargo, en neonatos esta patología suele ser más difusa (Johnson, 1998). La causa del proceso de encefalitis se ha estudiado mediante modelos animales. En un modelo murino se demostró que el virus puede alcanzar el SNC a través del tracto olfatorio (Tomlinson y Esiri, 1983) desde donde infectaría las regiones afectadas en los cerebros de pacientes con HSE (Johnson, 1998), pero también se ha propuesto que la encefalitis podría estar causada por la reactivación del virus desde los ganglios trigéminos o desde otras regiones del encéfalo donde establece latencia (Baringer y Pisani, 1994).

Recientemente se ha relacionado al HSV-1 con la *enfermedad de Alzheimer* debido a que las regiones principalmente infectadas coinciden con las que se ven más afectadas en esta demencia (Ball, 1982). Además, diversos estudios epidemiológicos han demostrado la asociación del HSV-1 y de esta enfermedad neurodegenerativa en individuos portadores del alelo *APOE-ε4* (Itzhaki, 2004; Itzhaki y Lin, 1998; Itzhaki et al., 1997). Debido a su particular importancia, esta asociación será descrita con más detalle posteriormente.

1.4. Modelos experimentales de infección por HSV-1

1.4.1. Modelos animales

Los modelos animales se utilizan para el estudio de la infección del HSV-1 desde hace décadas, sobre todo en el desarrollo de vacunas y agentes antivirales. La aproximación de estos modelos a la patogénesis en humanos presenta diferencias, pero dichos modelos son sistemas únicos para el estudio de la infección del HSV-1.

Las principales especies utilizadas para el análisis de la infección son por este orden el ratón, el conejo y la cobaya (Kern, 1999). Factores como la cepa del hospedador, la ruta y el sitio de inoculación, así como la cepa viral utilizada son susceptibles de modificar la progresión de la enfermedad.

Las diferentes fases del virus pueden verse afectadas en función del hospedador seleccionado.

Por ejemplo en el conejo la reactivación se produce espontáneamente tras inducción adrenérgica (Hill et al., 1986a), donde el virus puede recuperarse tras la reactivación en el sitio de infección primaria, situación más próxima a lo que ocurre en humanos (Whitley, 1996). El ratón presenta una gran limitación en este sentido, puesto que no se ha podido reactivar el virus *in vivo*, aunque sí en cultivos de explantes de ganglios *in vitro* (Sawtell y Thompson, 1992b) o en cultivos primarios de hipocampo (Burgos et al., 2006b). No obstante, el ratón es el modelo animal más utilizado debido a su bajo coste de mantenimiento ya que posibilita el trabajar con un número de ratones suficiente para aportar datos significativamente relevantes y además existen una gran diversidad de ratones transgénicos que permiten llevar a cabo un completo estudio de la interacción del virus con su hospedador. Apesar de las limitaciones que supone la reactivación en el modelo murino, otras facetas de la infección pueden ser abordadas.

1.4.2. Ruta de infección

Se han propuesto varias teorías sobre el modo en que el HSV-1 accede al SNC. La existencia de varias rutas naturales de infección en humanos ha sido previamente sugerida por Johnson en 1964 entre otros (Johnson, 1964). La ruta neural parece ser la vía más habitual de infección, aunque en neonatos y en individuos inmunosuprimidos la ruta hematogena es más común. (Arvin et al., 1982; Montgomerie et al., 1969; Whitley, 1996),

Para mimetizar las rutas de infección en humanos se han desarrollado modelos de infección neural y hematogena. La ruta neural ha sido la más utilizada para estudiar la latencia, la reactivación y la encefalitis provocada por el HSV-1. Para llevar a cabo la ruta neural se utilizan las vías de inoculación *ocular* (Kristensson et al., 1978), *intranasal* (Johnson, 1964), así como la vía de *abrasión del morro* (Esiri y Tomlinson, 1984; Sawtell y Thompson, 1992b). La ruta neural seguida por el virus ha sido diseccionada en diversos trabajos: tras la inoculación el virus alcanza el nervio trigémino por donde viaja hasta los ganglios trigéminos (Price y Schmitz, 1979; Sawtell y Thompson, 1992b; Shimeld et al., 1987) alcanzando luego regiones más profundas del encéfalo. Tras la infección intranasal el virus accede a los bulbos olfatorios, al tallo cerebral y a estructuras del sistema límbico, que coinciden con la estructuras afectadas en la encefalitis en humanos (Esiri y Tomlinson, 1984). No obstante, en estos modelos de infección es difícil separar cada una de las rutas de infección puesto que las tres ramas del nervio trigémino están interconectadas (Davis y Johnson, 1979; Esiri y Tomlinson, 1984).

Para modelizar la ruta hematogena de infección, las vías de inoculación más utilizadas son la inoculación *intrapertoneal* (Johnson, 1964), la inoculación *a través de la pata* (Cook y Stevens, 1973; Sawtell y Thompson, 1992b) y la inoculación *intravenosa* (Hill et al., 1986b). Recientemente,

en nuestro laboratorio se ha demostrado que la transmisión vertical del HSV-1 de madres a hijos se produce a través de una vía de infección hematológica (Burgos et al., 2006b), lo que supone además un buen modelo para el estudio del herpes neonatal.

En la ruta de infección hematológica el virus alcanza el SNC desde la sangre. En un principio se postulaba que el virus podía atravesar directamente la barrera hematoencefálica (Johnson, 1964), pero estudios posteriores evidencian un papel clave de la glándula adrenal (Hill et al., 1986b) y de los ovarios (Knoblich et al., 1983) como zonas preferentes para la replicación viral debido a su bajo estatus inmunológico. Se ha descrito además que a través de la glándula adrenal el virus coloniza la médula espinal (Hill et al., 1986b), desde donde llega al cerebro y al ganglio trigémino (Burgos et al., 2002a; Burgos et al., 2006b).

1.4.3. Curso temporal de la infección

En el ratón, la infección sigue un curso temporal que se divide en dos fases: una fase aguda, que ocurre en los 10 primeros días tras la infección (Cook y Stevens, 1973; Whitley, 1996), y otra fase de latencia que se establece a partir de los 21 días (Miller et al., 1998; Roizman y Sears, 1987). En este momento se considera que el virus ha alcanzado el núcleo de las células neuronales y ha entrado en el periodo de latencia, puesto que aunque no se detectan transcritos líticos, el virus se puede recuperar tras reactivación (Mitchell et al., 2003; Roizman, 1996).

1.4.4. Cepas de ratón

Además de la ruta de infección seguida por el virus, otros factores influyen en la patogénesis del HSV-1. La resistencia de varias cepas congénitas a la infección hematológica ha sido descrita con anterioridad, donde se ha establecido que la cepa C57BL/6 presenta una mayor resistencia a la infección que otras cepas como BALB/c (Lopez, 1975). Estas diferencias se deben principalmente a la respuesta inmune (Halford et al., 2004; Kern, 1999; Lopez, 1975; Whitley, 1996). El haplotipo de los genes ligados al complejo H-2 (homólogo al HLA humano) (Lopez, 1975; Simmons, 1989), u otros genes responsables de la respuesta del sistema inmune, como aquellos que afectan a la acción de las células NK (Brown et al., 2001; Pereira et al., 2001) o a la actuación del IFN (α/β) (Halford et al., 2004) o del TNF (Lundberg et al., 2007), son responsables de la resistencia a la infección. Aunque se ha considerado a la cepa C57BL/6 como 1000 veces más resistente a la infección viral (Lopez, 1975), trabajos de nuestro laboratorio han demostrado que esta cepa puede ser infectada (Burgos et al., 2006a; Burgos et al., 2002a; Burgos et al., 2003; Burgos et al., 2006b) conformándose como un modelo válido para el análisis de la infección.

La edad de los ratones es también determinante en la susceptibilidad a la infección debido al desarrollo del sistema inmune, de modo que los ratones jóvenes, los cuales presentan un sistema inmune inmaduro, son más susceptibles a la infección (Vollstedt et al., 2003).

1.4.5. Cepas de virus

La cepa viral también se encuentra asociada al desarrollo de la infección. Las diferentes cepas del HSV-1 varían en sus características biológicas: infectividad, establecimiento de latencia y reactivación, y neurovirulencia (Norgren y Lehman, 1998). Muchas de ellas han sido aisladas de pacientes con encefalitis, del encéfalo o de regiones periféricas, con objeto de estudiar si existe algún comportamiento diferencial en las cepas en las diferentes patologías (Dix et al., 1983). No obstante, por el momento no se ha llegado a relacionar a ninguna cepa con una patología concreta. Sin embargo, Dix y colaboradores realizaron un estudio comparativo con 23 cepas distintas de virus y concluyeron que la virulencia de la cepa depende en gran medida de la ruta de infección utilizada (Dix et al., 1983). Estos trabajos sugieren que la virulencia depende de la relación del virus y el hospedador, y concretamente de los componentes del sistema inmune del hospedador. En este sentido, Lewandowski y colaboradores demostraron que la diferencia en la virulencia entre dos de las cepas más comunes, KOS y F, se debe en gran medida a la inhibición de las moléculas del MHC-II, de modo que en el caso de KOS la mayor eficiencia de inhibición de este complejo permite una infección más virulenta (Lewandowski et al., 1993). Esta inhibición se ha atribuido a la glicoproteína B, que en estas dos cepas difiere en la región de interacción con el MHC-II (Neumann et al., 2003). Sin embargo, a pesar de demostrar una virulencia diferente, ambas cepas colonizan el SNC.

1.5. La enfermedad de Alzheimer y el HSV-1

La enfermedad de Alzheimer (EA) se divide en EA familiar (EAF) y en EA esporádica (EAE). La primera afecta a aproximadamente el 1% de los casos de alzhéimer y presenta una herencia autosómica dominante, mientras que la EAE corresponde al menos al 99% de los casos donde la causa responde a un patrón multifactorial (Corder et al., 1993).

A pesar de existir un componente genético asociado a la EAE, no se ha descrito ninguna mutación que provoque directamente la aparición de la enfermedad, de modo que su etiología comprende un proceso en el que influyen tanto factores genéticos como ambientales. A principios de los años 90, se propuso al alelo *APOE-ε4* como un factor de riesgo para la EA esporádica (Corder et al., 1993; Poirier et al., 1993). Actualmente existen múltiples estudios epidemiológicos donde se analiza la asociación de gran cantidad de genes con la enfermedad, pero es sin embargo el *APOE-ε4*

el único que se presenta como un factor de riesgo claro en la EAE (Bertram y Tanzi, 2004). En este sentido, en un estudio epidemiológico desarrollado en nuestro laboratorio se ha asociado al alelo *TAP2B* en presencia del gen *APOE-ε4* con la EAE (Bullido et al., 2007). La proteína TAP es una de las principales dianas del HSV-1 para la evasión del sistema inmune (Hill et al, 1995) como se ha descrito previamente en el apartado 1.2.3., de modo que la asociación de este polimorfismo con la EAE podría venir determinado por la relación del virus con el complejo TAP.

Aunque la implicación de un patógeno en el desarrollo de la EA aún está lejos de demostrarse completamente, se ha propuesto al HSV-1 como un factor de riesgo para la EAE (Itzhaki et al., 1997; Pyles, 2001; Robinson et al., 2004). Existen diversas evidencias que asocian a la EA con el HSV-1. La ubicuidad del HSV-1, que reside en aproximadamente el 90% de la población adulta en el sistema nervioso periférico (SNP) (Itzhaki et al., 1997), sitúa a este patógeno como un factor potencialmente implicado en la EA.

Además, en procesos agudos de encefalitis el virus se reactiva en las mismas regiones del SNC afectadas en la EA: los lóbulos frontal y temporal, el hipocampo, la amígdala y el tracto olfatorio (Ball, 1982; Deykin y MacMahon, 1979). Las reactivaciones recurrentes de moderada gravedad que provocan encefalitis leves (Klapper et al., 1984), o un estado de neuroinflamación crónica asociada a la presencia del HSV-1 (Robinson et al., 2004), podrían causar daño neuronal en las mismas regiones afectadas por la EA.

La EA es un proceso en el que se produce una acumulación de daños neurológicos con la edad. En este sentido el virus normalmente se adquiere en edades tempranas, si no directamente de la madre *in utero* como se ha demostrado previamente (Burgos et al., 2006b). Además, Daw y colaboradores plantean que un agente no genético (ambiental) y transmisible podría mimetizar la influencia de un gen o conjunto de genes en la etiología de la enfermedad (Daw et al., 2000). El HSV-1 cumple esta premisa.

Pero los trabajos que han relacionado más firmemente al virus con la EA se realizaron a finales de los años 90 cuando Itzhaki y colaboradores demostraron que la combinación de la presencia de *APOE-ε4* y el HSV-1 confieren un mayor riesgo para esta demencia (Itzhaki et al., 1997) (figura I7). No

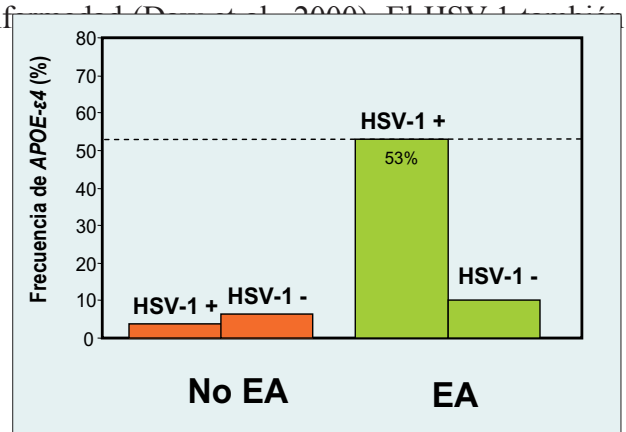


Figura I7. Frecuencia de APOEε-4 en cerebros de Alzheimer versus controles, positivos y negativos para HSV-1. (Itzhaki et al, 1997)

obstante, el mecanismo por el cual *APOE-ε4* junto con el HSV-1 confiere riesgo para la EA aún no está claro. Se ha propuesto que el *APOE-ε4* podría estar afectando al daño producido por la reactivación del virus o en la reparación del tejido dañado por la infección (Weisgraber et al., 1994). En nuestro laboratorio, se demostró que la presencia de *APOE-ε4* permite una llegada del virus al cerebro más eficiente que en presencia de *APOE-ε3* (Burgos et al., 2003). Además una mayor dosis génica de *APOE-ε4* también influye, aumentando la eficiencia de la neuroinvasión del virus (Burgos et al., 2002a).

Por último, la presencia de *APOE-ε4* también afecta a los niveles de virus en latencia, observándose un mayor número de copias de DNA viral en ratones que expresan el alelo *APOE-ε4* (Burgos et al., 2006c), lo que en último término podría influir aumentando la frecuencia de la reactivación del virus desde la latencia (Kosz-Vnenchak et al., 1993; Miller et al., 1998; Sawtell et al., 1998) provocando en los lugares de reactivación una situación de riesgo para el posible desarrollo de un proceso neurodegenerativo.

1.6. Implicación de los polimorfismos de TAP en la EAE

La búsqueda de factores genéticos asociados a la EAE ha sido extremadamente prolífica en los últimos años, pero de estos estudios pocos son tan consistentes y reproducibles como la asociación del gen *APOE*. Existen múltiples trabajos que asocian la región cromosómica 6p21 a la EAE (Bertram y Tanzi, 2004), aunque aún no se ha localizado ningún gen responsable de dicha asociación. El locus del MHC II, región donde se encuentran los genes *TAP1* y *TAP2*, se encuentra cerca de esta región (en 6p21.3) por lo que podría ser responsable de la asociación propuesta. Además, como se ha expuesto previamente, diversos factores genéticos del hospedador pueden intervenir en la infección del HSV-1. Si la hipótesis de la relación entre el virus y la EA es correcta, los factores genéticos que intervengan en la infección podrían estar también asociados a la patogénesis de la EA.

De esta forma, los genes que regulan los mecanismos celulares del sistema inmune serán candidatos para la EA. Por todo ello, *TAP* representa una excelente diana para estudiar la asociación con la EAE, puesto que su inhibición es uno de los principales mecanismos del HSV-1 para la evasión del sistema inmune (Fruh et al., 1995; Hill et al., 1995). Datos de nuestro grupo han demostrado que existe una asociación entre el alelo *TAP2B* y la EAE en pacientes portadores de *APOE-ε4* (Bullido et al., 2007) (figura I8). Con objeto de dilucidar los mecanismos moleculares de esta asociación se hace necesaria la generación de un ratón transgénico que combine los tres factores de riesgo, el gen *APOE-ε4*, el HSV-1 y el gen *TAP2B*. El modelo murino ofrece la ventaja de que el gen ortólogo del *APOE*

en el ratón (*apoE*) presenta una alta homología con el gen humano, donde los residuos que determinan la variabilidad alélica en humanos son iguales en el gen murino y coincidentes con la variante humana de *APOE-ε4* (Rajavashisth et al., 1985).

Puesto que la presencia de *APOE-ε4* permite una colonización más eficiente del virus al cerebro (Burgos et al., 2003), las diferencias en la funcionalidad o afinidad de ICP47 por la proteína

TAP podrían estar potenciadas en este entorno genético. No obstante, las diferencias entre ambos polimorfismos podrían deberse a otros motivos como una expresión diferencial entre ambos. Aunque no se ha descrito que estos polimorfismos afecten a la expresión, la falta de estudios *in vivo* no permite conocer en profundidad la fisiología de los fenómenos asociados a este transportador y a sus polimorfismos.

1.7. Participación de la proteína TAP en la infección por HSV-1

El transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP) es un factor clave en el procesamiento y presentación de antígenos dependiente del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (MHC I) (Spies et al., 1990), siendo responsable de la translocación de los péptidos generados en el citosol por el proteosoma al lumen del retículo endoplásmico (RE) donde son cargados en las

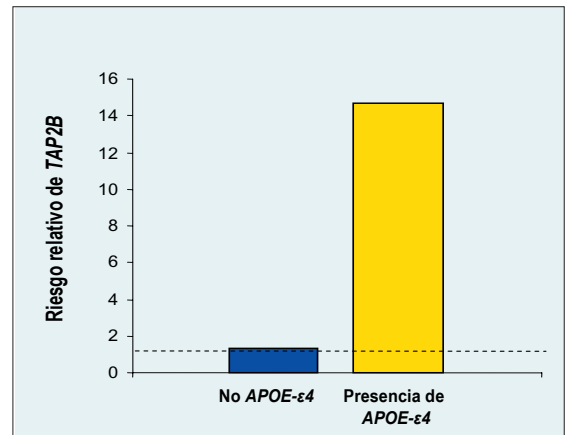


Figura 18. Riesgo relativo del alelo TAP2B en presencia de APOE-ε4 (Bullido et al, 2006)

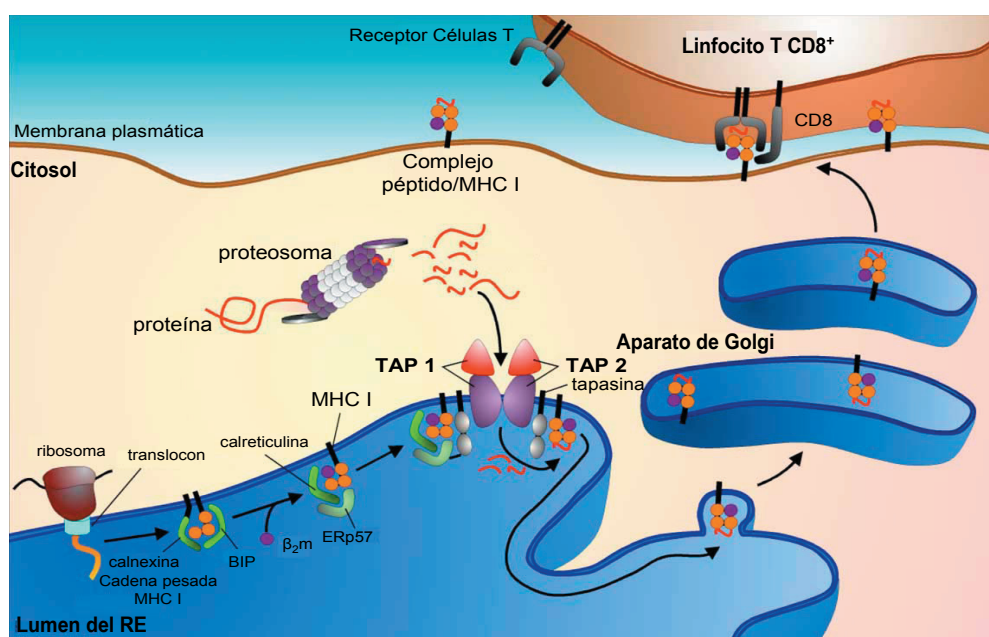


Figura 19. Ruta de presentación de antígenos del MHC I. Imagen adaptada de (Abele y Tampe, 2006).

partículas del MHC I (Lankat-Buttgereit y Tampe, 2002) (figura I9).

El complejo TAP se localiza en la membrana del RE y en el *cis*-Golgi (Kleijmeer et al., 1992). TAP forma parte de un complejo “de carga de péptido” (del inglés *peptide-loading complex*, PLC) en el que están implicados además otras proteínas del RE necesarias para su función y estabilización (Lankat-Buttgereit y Tampe, 2002). El complejo péptido-MHC I es transportado hasta la superficie celular donde es reconocido por los linfocitos CD8⁺-citotóxicos que en el caso de reconocer un antígeno viral procederán a la eliminación de la célula infectada (Abele y Tampe, 2006; York et al., 1994) (Figura I9).

1.7.1. Estructura

TAP pertenece a la superfamilia de los transportadores ABC (del inglés *ATP-Binding Cassette*) caracterizados por requerir la hidrólisis de ATP (Kelly et al., 1992). Este transportador está compuesto por dos subunidades, TAP1 y TAP2, que forman un heterodímero (figura I10), de manera que el transportador sólo es funcional si están presentes ambas subunidades (Meyer et al., 1994). La estructura de este heterodímero está dividida en un dominio citosólico de unión a nucleótidos correspondiente a la zona C-terminal de ambas subunidades y un dominio transmembrana (Nijenhuis y Hammerling, 1996). Este último dominio es el encargado de la unión y transporte de péptidos a través de la membrana del RE, mientras que la hidrólisis de ATP necesaria para este proceso ocurre

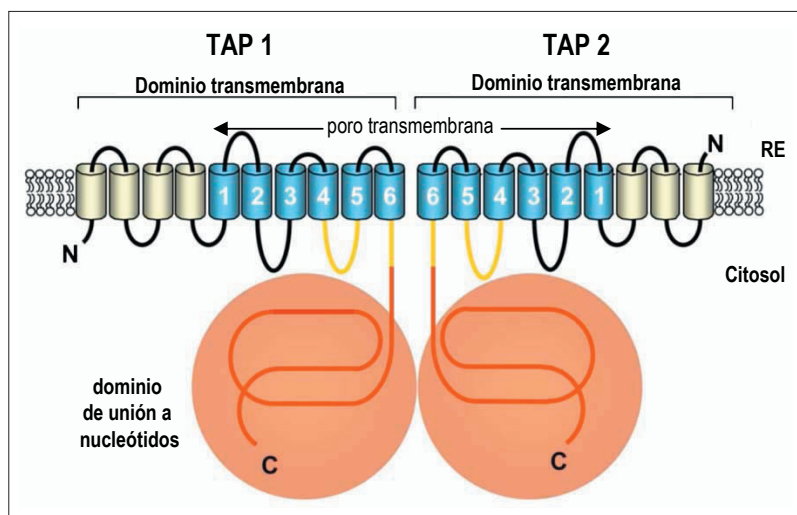


Figura I10. Modelo esquemático del complejo TAP.
Imagen adaptada de (Abele y Tampe, 2006).

en el dominio de unión a nucleótidos (Lankat-Buttgereit y Tampe, 2002).

1.7.2. Mecanismo y selectividad de péptidos

El proceso de transporte consiste en varias etapas. En primer lugar se produce la unión tanto del péptido como del ATP al complejo. TAP une péptidos de 8-16 aminoácidos, aunque la longitud

óptima para el transporte es de 8 a 12 aminoácidos. Además, la especificidad de sustrato está limitada a los tres primeros residuos de la zona N-terminal y al último residuo de la zona C-terminal, de manera que coinciden las preferencias entre el TAP y el MHC I. Sólo los péptidos con una longitud y composición óptimas para el transporte provocan la hidrólisis del ATP. Esta reacción induce un cambio conformacional en el complejo que permite en último término la translocación del péptido (Lankat-Buttgereit y Tampe, 2002).

1.7.3. Estabilización, organización genómica y regulación

TAP interacciona con el MHC I mediante una proteína denominada tapasina que se encuentra embebida en la membrana del RE (Grande et al., 1997). La tapasina interacciona con TAP facilitando la unión de los péptidos al MHC I, y estabilizando los niveles de TAP. Además existe una regulación entre las dos subunidades de TAP: TAP2 sólo es estable en presencia de TAP1, de modo que en ausencia de ésta TAP2 se degrada inmediatamente aunque se pueda detectar su mRNA (Keusekotten et al., 2006).

Los genes de *TAP1* y *TAP2* están localizados en el cromosoma 6, concretamente en el locus del MHC II (Trowsdale et al., 1991). Ambos genes contienen 11 exones y entre ellos comparten aproximadamente un 35% de homología en todas las especies examinadas (Lankat-Buttgereit y Tampe, 2002).

Se ha propuesto que *TAP1* y *TAP2* responden a distintas vías de regulación a nivel de RNA mensajero y a distintos factores de transcripción, aunque hay que destacar que en ambos casos se produce una inducción de su expresión en respuesta a interferon- γ (IFN- γ) (Ayalon et al., 1998; Ma et al., 1997). *TAP1* también es sobreexpresado en respuesta a TNF- α (Nagy et al., 1998), donde su promotor presenta la peculiaridad de que es un promotor bidireccional encargado del control de la transcripción tanto de *TAP1* como de *LMP2* (gen que codifica una proteína del proteosoma) (Lankat-Buttgereit y Tampe, 2002). El promotor de *TAP2* ha sido estudiado en menor profundidad, aunque se sabe que presenta una organización única comparada con otros genes del locus MHC de modo que el codón de iniciación de la traducción se encuentra en el exón 2 del gen (Guo et al., 2002; Wright et al., 1995).

Se ha descrito que tanto *TAP1* como *TAP2* son genes polimórficos en todas las especies examinadas (Gaskins et al., 1992; Heemels et al., 1993), aunque en menor medida que otros genes del locus del MHC (Faucz et al., 2000). En el caso de *TAP1* se han observado cuatro posibles alelos que difieren en los aminoácidos de las posiciones 333 y 637, siendo el alelo *TAP1A* el más frecuente

en la población caucásica (Faucz et al., 2000). En el caso de *TAP2* se han descrito al menos cuatro sitios de cambio en los aminoácidos 379, 565, 665 y 687. En este caso los alelos mayoritarios son *TAP2A* y *TAP2B* (Faucz et al., 2000), que además son los que difieren en mayor medida puesto que se diferencian en los codones 665, donde tan solo se produce un cambio de aminoácido (Thr/Ala) y 687, que en el caso de *TAP2A* codifica para un codón de parada, lo que producirá una proteína 17 aminoácidos más corta (<http://www.anthonynolan.com/HIG/lists/otherlist.html>).

La implicación funcional que estos cambios pueden tener aún no está clara puesto que no se ha descrito ninguna diferencia funcional entre los polimorfismos con respecto a la selectividad de péptidos (Daniel et al., 1997). No obstante, indirectamente se ha intentado abordar el estudio de posibles diferencias funcionales mediante estudios de asociación con diversas enfermedades con resultados dispares. En algunos trabajos concluyen que no hay asociación o que ésta se debe al desequilibrio de ligamiento con otros genes del locus HLA, mientras que en otros trabajos sí que encuentra relación con enfermedades autoinmunes o en la respuesta a patógenos (Daniel et al., 1997; Hayney et al., 1997).

1.7.4. Enfermedades y TAP

Existen pocos estudios sobre enfermedades provocadas por defectos en TAP, no obstante su mal funcionamiento se ha asociado a algunas enfermedades genéticas, a enfermedades autoinmunes e incluso al desarrollo de tumores.

La enfermedad genética más representativa asociada al TAP es una variante del síndrome linfocítico de Bare de tipo 1 (Gadola et al., 2000), donde mutaciones tanto en *TAP1* como en *TAP2* provocan una disminución en los niveles de MHC I. Los pacientes con esta patología presentan lesiones necróticas en la piel que cursan con granulomatosis e infecciones bacterianas recurrentes en el tracto respiratorio. Estos pacientes aparentemente no son más susceptibles a infecciones virales que individuos inmunocompetentes, sin embargo presentan una situación inmunológica anormal con altos niveles de células NK reactivas en sangre y niveles muy bajos de linfocitos T CD8⁺.

Se ha descrito que la ausencia de TAP puede contribuir a la disminución de los niveles de MHC I, provocando una respuesta autoinmune de las células NK, en procesos como diabetes de tipo 1, síndrome de Sjogren, en la enfermedad de Graves o en el síndrome de Hashimoto, donde se ha visto una baja expresión de mRNA de *TAP1* y *TAP2* (Fu et al., 1998).

Por último, en determinados tumores hay una disminución del nivel de expresión del mRNA de *TAP1* producida en algunos casos por mutaciones en el propio gen o en regiones reguladoras de

la transcripción (Chen et al., 1996; Seliger et al., 1997). Como consecuencia de la disminución de la expresión de *TAP* se produce, una vez más, una disminución en los niveles de MHC I en la superficie celular que permite a las células tumorales escapar del sistema inmune (Lankat-Buttgereit y Tampe, 2002).

Muchos virus, en particular aquellos que establecen latencia o infecciones persistentes, han desarrollado elaborados mecanismos para eludir el sistema inmune. Estas estrategias previenen o retrasan el reconocimiento de las células infectadas mediante el bloqueo de la vía de la presentación de antígenos del MHC I entre otros mecanismos. Algunos virus como el adenovirus tipo 12 o el papilomavirus tipo 18 producen una disminución de la expresión de *TAPI* (Bennett et al., 1999; Vambutas et al., 2000). El VIH también impide el translocamiento de péptidos al retículo endoplásmico, aunque no se conoce bien el mecanismo (Kutsch et al., 2002). Los virus más estudiados son los pertenecientes a la familia de los herpesvirus: el HSV-1 bloquea la translocación de péptidos mediante la proteína viral ICP47 (York et al., 1994), el citomegalovirus expresa una glicoproteína transmembrana (Us6) que previene la unión de ATP a TAP (Hewitt et al., 2001), el herpesvirus murino γ 68 también afecta a este complejo promoviendo su degradación (Stevenson et al., 2000) y el virus de Epstein Barr (EBV) impide la translocación de péptidos al retículo (Ressing et al., 2005).

1.7.5. HSV-1 y TAP

El HSV-1 utiliza múltiples mecanismos para evadir el sistema inmune. La proteína inmediatamente temprana ICP47 inhibe específicamente al complejo TAP, lo que evita la translocación a la membrana plasmática del complejo péptido-MHC-I. ICP47 es una proteína de 88 aminoácidos codificada por el gen viral Us12 que se encuentra bajo el control de un promotor de expresión inmediatamente temprana (York et al., 1994). El dominio activo de ICP47 comprende desde el residuo 3 hasta el 34, el cual al interactuar con la membrana del retículo endoplásmico adopta una conformación de hélice-bucle-hélice (Aisenbrey et al., 2006) (figura I11). Esta estrategia viral permite evitar la rápida degradación de la proteína por el proteosoma y al unirse a TAP impide la translocación de péptidos (Aisenbrey et al., 2006; Galocha et al., 1997). Sin embargo, aún queda por dilucidar cuáles son los residuos de TAP implicados en la unión de ICP47.

La interacción ICP47-TAP es específica de especie. De hecho se ha descrito que ICP47 inhibe con 100 veces más afinidad el TAP humano que el murino (Jugovic et al., 1998; Tomazin et al., 1998), aunque la mayoría de los estudios que se han llevado a cabo para conocer el mecanismo de la inhibición de TAP han sido realizados *in vitro*, en su mayoría utilizando cultivos celulares de

fibroblastos humanos (Fruh et al., 1995; Hill et al., 1995; Tomazin et al., 1998; York et al., 1994). Jugovic y colaboradores compararon sistemas celulares provenientes de distintas especies animales, concluyendo que los mejores modelos para estudiar la interacción TAP-ICP47 serían el perro, el cerdo y el mono (Jugovic et al., 1998), modelos habitualmente poco disponibles para la experimentación con HSV-1. No obstante, el ratón es un modelo válido para el estudio de la infección con HSV-1 y existen múltiples trabajos donde se ha estudiado la relación con el sistema inmune. Sin embargo, tan solo existe un trabajo *in vivo* de un modelo de infección neural en ratón donde analizan la inhibición de los linfocitos CD8⁺ por medio de la proteína ICP47 (Goldsmith et al., 1998), aunque la relación de

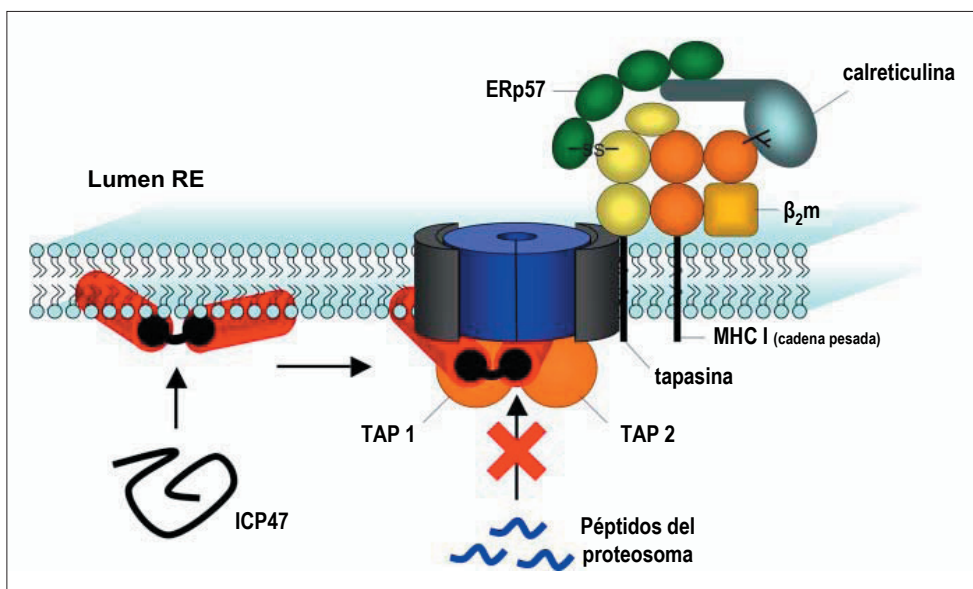


Figura I11. Esquema de la interacción de ICP47 y TAP. La proteína ICP47 viaja rápidamente a la membrana del retículo endoplásmico para evitar la proteólisis por el proteosoma. Imagen adaptada de (Aissembrey, 2006)

Objetivos

2. Objetivos

Los objetivos planteados en la presente tesis fueron los siguientes:

- 1. Análisis de la influencia de la ruta de infección del HSV-1 en la colonización del sistema nervioso.** Estudio comparativo entre la ruta hematológica mediante la utilización de las vías *intravenosa* e *intraperitoneal*, y la ruta neural mediante las vías *intranasal* y de *abrasión del morro*.
- 2. Evaluación de la influencia de la cepa viral en la infección del HSV-1.** Estudio de la infección con las cepas virales HSV-1 KOS y F tras la infección hematológica y neural.
- 3. Estudio del efecto de la proteína viral ICP47 en la infección hematológica del HSV-1.** Análisis de la influencia de la proteína viral ICP47 en un modelo *in vivo* de infección hematológica mediante el uso de un virus defectivo en la proteína ICP47.
- 4. Implicación de la proteína *tap1* murina en la infección del HSV-1.** Análisis de la expresión del gen *tap1* murino como consecuencia de la infección y estudio de su relación con la proteína viral ICP47.
- 5. Generación de tres líneas transgénicas que expresen los genes humanos *TAP1A*, *TAP2A* y *TAP2B* independientemente, y que expresen las variantes alélicas del complejo TAP humano.**

Materiales y Métodos

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos

Todos los reactivos y productos que se utilizaron fueron de grado analítico, y suministrados por casas comerciales especializadas. Así, el etanol, butanol, xilol, ácido Etilen-Diamino-Tetraacético (EDTA), Tween-20, cloruro sódico, cloruro cálcico, cloruro magnésico, cloruro potásico, hidróxido sódico, hidróxido potásico, paraformaldehído, ácido clorhídrico, bicarbonato sódico, acrilamida, bisacrilamida, isopropanol, glicina y glicerol fueron obtenidos por la casa comercial Merck (Alemania). La albúmina de suero bovino (BSA), el dimetilsulfóxido (DMSO), el dietilpirocarbonato (DEPC), el azul de bromofenol, el Triton X-100 y el trizma base fueron suministrados por Sigma-Aldrich (EE.UU.). La N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED), el persulfato amónico y el sulfato sódico de dodecilo (SDS) fueron obtenidos de Bio-Rad (Alemania). La agarosa fue suministrada por Invitrogen™ (EE.UU.), el formaldehído por Fluka (EE.UU.) y la parafina (P.F. 56-58°C) por Panreac (España).

Además de los reactivos generales mencionados anteriormente, se han utilizado otros más específicos cuya procedencia se indica en los apartados correspondientes.

3.1.2. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados se muestran en las siguientes tablas:

Tabla MM1. Anticuerpos primarios						
Nombre	Origen	PM antígeno	Epítipo	Casa comercial	concentración	
					WB	IHQ
Anti-TAP1m	Policlonal cabra	70 KDa	Extremo carboxi-terminal TAP1 murino	Santa Cruz (EE.UU.)	1/100	
Anti-TAP1h	Policlonal conejo	70 KDa	Residuos 735-748 TAP1 humano	StressGene (Canadá)	1/1 000	
Anti-TAP2	Policlonal conejo	75 KDa	Residuos 21-239 TAP2 humano	Santa Cruz (EE.UU.)	1/250	
Anti-TAP2-435	Monoclonal ratón	75 KDa	TAP2 humano	Cedido por Dr. Van Endert	1 µg/µl	
Anti-TAP2-429	Monoclonal ratón	75 KDa	TAP2 humano	Cedido por Dr. Van Endert	1 µg/µl	
Anti-TAP2B	Policlonal ratón	75 KDa	Extremo carboxi-terminal TAP2B humano	Santa Cruz (EE.UU.)	1/100	
Anti- α -tubulina	Monoclonal ratón	58 KDa	Extremo carboxi-terminal de la α -tubulina	Sigma (EE.UU.)	1/10 000	
Anti-HSV-1	Policlonal conejo		Glicoproteínas de la envuelta viral	DAKO (Dinamarca)		1/100

WB: Western-Blot; IHQ: Inmunohistoquímica; PM: Peso Molecular

Tabla MM2. Anticuerpos secundarios				
Nombre	Molécula acoplada	Casa comercial	Concentración	
			WB	IHQ
Caballo anti-ratón	peroxidasa	Vector lab.(EE.UU.)	1/50 000	
Cabra anti-conejo	peroxidasa	Nordic (EE.UU.)	1/50 000	
Conejo anti-cabra	peroxidasa	Pierce (EE.UU.)	1/50 000	
Burro anti-conejo	biotina	Amersham Pharmacia Biotech (España)		1/250

WB: Western-Blot; IHQ: Inmunohistoquímica; PM: Peso Molecular

3.1.3. Vectores de clonaje

Los vectores de clonaje se detallan a continuación:

MoPrP.Xho (Borchelt et al., 1996)

Se trata de un vector de expresión utilizado específicamente para la generación de ratones transgénicos que contiene el promotor de la proteína prión murina, de manera que el gen clonado tendrá una expresión preferentemente neuronal (figura MM1).

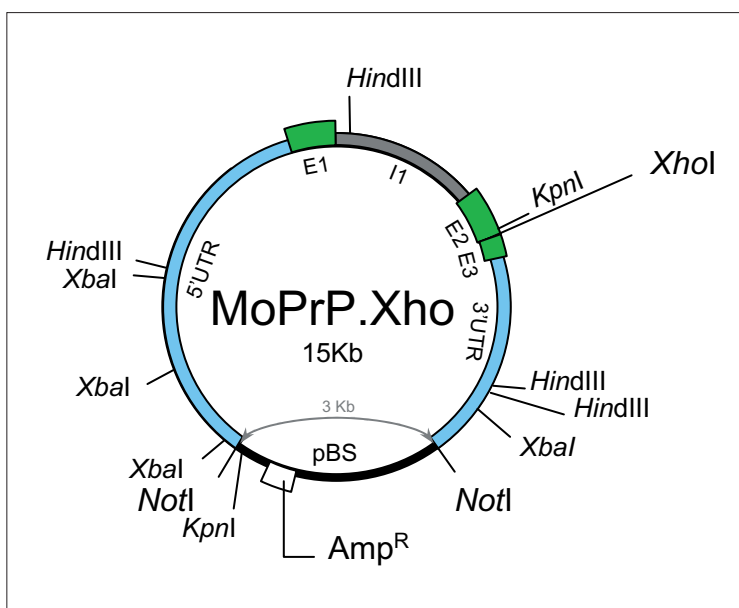


Figura MM1. Esquema del vector MoPrP.Xho. En el esquema se muestran las estructuras génicas más importantes del vector, así como algunas de las dianas de restricción. (pBS: pBlueScript)

pcDNA3 (Invitrogen™, EE.UU.)

Este vector representa una buena herramienta de expresión en un sistema eucariota puesto que el DNA insertado en el sitio de multiclonaje queda controlado por un promotor de citomegalovirus (CMV). Además, el sitio de multiclonaje queda flanqueado por promotores T7 y Sp6, que permiten la secuenciación del inserto. Contiene genes de resistencia a ampicilina y a neomicina.

pCR™II (Invitrogen™, EE.UU.)

Este plásmido permite el clonaje directo de cualquier producto de PCR. Se suministra de forma lineal con dos timidinas desapareadas en sus extremos. La timidina sirve como extremo cohesivo para cualquier producto amplificado por PCR, puesto que deja una adenina en sus extremos 3'. Este vector contiene un sitio de multiclonaje flanqueando los extremos, que a su vez está flanqueado por las secuencias de los promotores T7 y SP6, que permiten la secuenciación del inserto. El vector contiene dos genes de resistencia a antibióticos: ampicilina y kanamicina.

3.1.4. Virus

Durante el estudio se utilizaron varias cepas de HSV-1. La cepa HSV-1 KOS, fue amablemente cedida por el Dr. Luis Carrasco del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. También se utilizaron la cepa HSV-1 F, obtenida de la *American Type Culture Collection* (EE.UU.) y un mutante de delección de ICP47, cedida por el Dr. Roizman (Mavromara-Nazos et al., 1986).

3.1.5. Células

Se utilizó la línea celular Vero, establecida a partir de células de riñón de mono verde africano para la titulación del HSV-1 como se describe en el apartado 3.2.2. Para su propagación y mantenimiento se crecieron en monocapa en un medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma, EE.UU.), aminoácidos no esenciales, piruvato sódico, glutamina y antibióticos para evitar su contaminación, en un incubador a 37°C y un porcentaje de CO₂ del 7 %.

Se utilizó la línea celular HEK293, de origen humano para ensayos de expresión. Para su propagación y mantenimiento las células se crecieron en monocapa en condiciones similares a las utilizadas con las células Vero.

Además se utilizaron tres líneas de linfoblastos de origen humano obtenidas de *Coriell Cell Repositories* (EE.UU.): una línea homocigota *TAP2A*, denominada AG10598, otra homocigota para *TAP2B*, denominada AG09182, y una deficiente en los genes *TAP1* y *TAP2*, denominada T2. Estas líneas celulares fueron mantenidas en suspensión en un medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (Sigma, EE.UU.), aminoácidos no esenciales, piruvato sódico, glutamina y antibióticos para evitar su contaminación, en un incubador a 37°C y un porcentaje de CO₂ del 7%.

3.1.6. Animales

Para los experimentos de infección con HSV-1 se inocularon diferentes tipos de ratones (*Mus musculus*. Hembras adultas, de entre 8 y 14 semanas de edad). Se utilizaron los siguientes ratones de la cepa C57BL/6J:

- Cuatrocientos noventa y un ratones salvajes obtenidos de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, MA, EE.UU.)
- Cincuenta y siete ratones deficientes en el gen *tap1* (*tap* ^{-/-}) generados según el protocolo de Tonegawa (Van Kaer et al., 1992) y obtenidos de The Jackson Laboratory (denominados B6.129S2-*tap1*^{tmlArp/J})

Para la obtención de ratones transgénicos congénitos son necesarios al menos 6 cruces con una línea de ratones consanguínea. Para ello se utilizaron, adicionalmente, 75 ratones de la línea C57BL/6J obtenidos de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, MA, EE.UU.).

3.2. Métodos

3.2.1. Manipulación de los ratones

Todos los experimentos se realizaron según los métodos descritos en el acta de procedimientos científicos para animales de laboratorio de la Unión Europea (1986) (Wootton y Flecknell, 1987). Los animales fueron manipulados y alojados bajo las condiciones de las normas generales establecidas (B.O.E. nº252 de 21 de octubre de 2005. Real decreto 1201/2005). Los ratones pasaron un periodo de cuarentena de al menos 4 semanas en un laboratorio destinado a tal efecto en el animalario del CBM. Desde su llegada hasta el punto final de los experimentos los ratones se mantuvieron en condiciones estériles, con ciclos de luz y oscuridad alternativos de 12 horas, con agua y alimentos estándar *ad libitum* (Teklad global 18% protein rodent diet, Mucedola, Italia). Tras el periodo de cuarentena, los animales se trasladaron al laboratorio con nivel de bioseguridad 2 del animalario, donde se les practicaron los diferentes procedimientos. Los animales fueron marcados individualmente para su identificación y posterior seguimiento diario.

3.2.2. Manipulación de virus

El HSV-1 de las diferentes cepas, fue cultivado, propagado y titulado sobre monocapa de células Vero (células de riñón de mono verde africano) en el laboratorio de nivel de bioseguridad 2 del CBM, donde posteriormente fueron almacenados a -70°C.

La infectividad del HSV-1 se valoró mediante el recuento de placas de lisis en monocapa de células Vero en medio semisólido (DMEM con 2% de suero fetal de ternera y agar al 0.7%) optimizando un método descrito previamente (Carrascosa et al., 1982). Las células se crecieron en placas M24 hasta preconfluencia en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de ternera y antibiótico (gentamicina). Se realizaron diluciones seriadas de orden 10 del inóculo viral en medio libre de suero, las cuales se añadieron sobre la monocapa celular (150 µl por pocillo) tras retirar el medio de cultivo. Después de una hora de adsorción, se añadió 1 ml por pocillo de medio semisólido y se dejaron en el incubador a 37°C. Las placas se revelaron a las 48 horas post-infección, por tinción con cristal violeta al 1% en formaldehído al 5% durante toda la noche. Después de lavar con agua, se procedió al recuento de las placas de lisis. El título del virus se expresa en unidades formadoras de placa (ufp) por mililitro (ml).

3.2.3. Infección de los ratones

En este estudio se utilizaron varias vías de inoculación para mimetizar las distintas rutas de infección. La ruta hematológica se llevó a cabo mediante dos formas: *inoculación intravenosa*, donde el virus es depositado directamente en el torrente sanguíneo, e *intraperitoneal*, por inyección en la cavidad peritoneal (Burgos et al., 2002a; Johnson, 1964; Ramírez, 2006). En el caso de la ruta neural, se realizó mediante dos formas de administración: *inoculación intranasal*, que mimetiza la infección a través del sistema olfativo (Esiri y Tomlinson, 1984; Kern, 1999; Tomlinson y Esiri, 1983), y de *abrasión del morro* (Sawtell y Thompson, 1992a; Sawtell y Thompson, 1992b), donde se produce la infección a través del nervio trigémino (Davis y Johnson, 1979) (figura MM2).

3.2.3.1. Inoculación intravenosa

Los ratones fueron inmovilizados y, sin anestesia previa, fueron inoculados mediante una inyección en la vena caudal con 100 μ l de una suspensión de HSV-1 en tampón fosfato salino (PBS).

3.2.3.2. Inoculación intraperitoneal

Se inyectaron 100 μ l de volumen de una suspensión de HSV-1 en PBS en la cavidad intraperitoneal de los ratones sin anestesia previa.

3.2.3.3. Inoculación intranasal

Los ratones se anestesiaron previamente mediante una inyección intraperitoneal (15 ml/kg de peso) de una

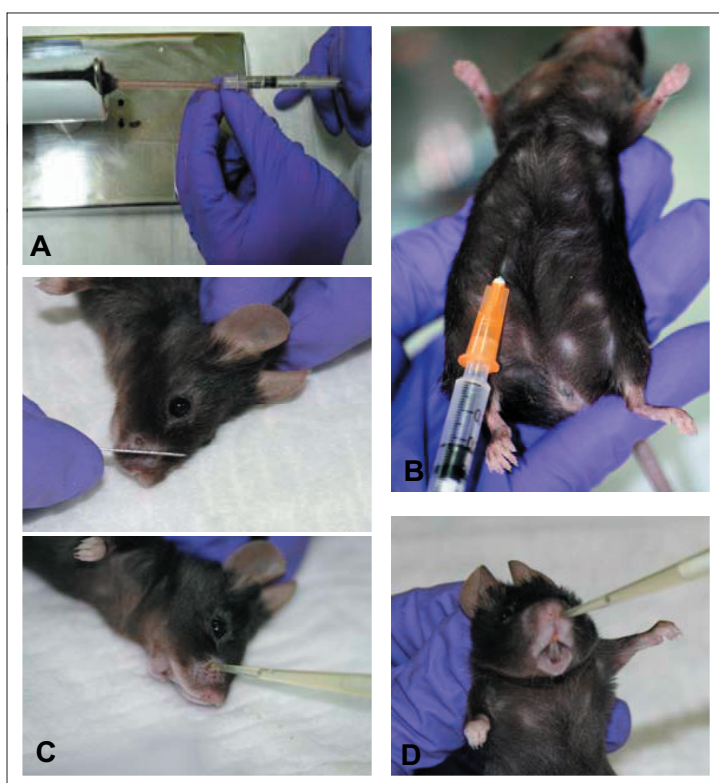


Figura MM2. Ratones infectados por las distintas vías de inoculación. A) Inoculación intravenosa, B) inoculación intraperitoneal, C) inoculación por abrasión del morro y D) inoculación intranasal.

solución en suero fisiológico Braun (Braun Medical SA, Barcelona, España) con 2% de Rompun® (Bayer, Alemania) y 50 mg/ml de Ketolar® (Parke-Davis, EE.UU.). A continuación fueron inoculados bilateralmente con 10 μ l de volumen de una suspensión de HSV-1 en PBS en cada orificio nasal.

3.2.3.4. Inoculación por abrasión del morro

Los ratones fueron anestesiados previamente del mismo modo que en la inoculación intranasal. A continuación se les realizó una herida a ambos lados del morro mediante abrasión con un bisturí, depositándose posteriormente 10 μ l de una suspensión de HSV-1 en PBS en ambas heridas, para que

finalmente se dio la absorción del inóculo.

En todos los casos, se incluyeron ratones sin infectar como controles, que fueron inoculados con el mismo volumen en cada caso de PBS estéril (*MOCK*). Los animales fueron marcados individualmente para su identificación y posterior seguimiento diario.

3.2.4. Disección y tratamiento de las muestras para extracción de DNA, RNA y proteínas

3.2.4.1. Sangrado y disección de los animales

Todos los ratones fueron sangrados por punción con pipeta *Pasteur* en la vena ocular, previamente a su sacrificio humanitario. La sangre fue almacenada a -70°C en presencia de EDTA al 9% para evitar su coagulación.

Los animales fueron luego sacrificados individualmente mediante sobredosis de CO_2 inhalado en una cubeta estanca, para proceder a continuación a la disección y recogida de órganos. Se diseccionaron los siguientes órganos y tejidos: gónadas, glándula adrenal, médula espinal y encéfalo. Los encéfalos fueron divididos en cuatro partes groseras que denominamos de forma arbitraria: *mesencéfalo* (que además del mesencéfalo, incluye el bulbo raquídeo, el puente y los colículos superior e inferior), *corteza* (que incluye el cortex cerebral, el hipocampo y los bulbos olfatorios), el *diencefalo* (que incluye el tálamo y el hipotálamo) y el *cerebelo* (Ramírez, 2006) (figura MM3). Los órganos fueron congelados inmediatamente en nieve carbónica y almacenados a -70°C en un laboratorio de nivel 2 de bioseguridad.

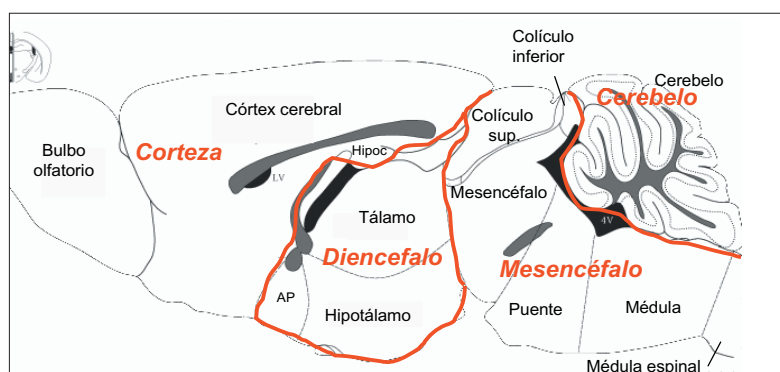


Figura MM3. Esquema de la disección del encéfalo en corteza, diencefalo, mesencéfalo y cerebelo. (Esquema adaptado de “The mouse brain in stereotaxic coordinates”, Keith B.J. Franklin, 1997)

3.2.4.2. Homogeneización de órganos

Los diferentes órganos fueron homogeneizados mecánicamente en tubos eppendorf® de 1.5 ml en 400 μl de PBS estéril (con DEPC al 0.1%) utilizando el homogeneizador Retsch® MM300 (Retsch, Alemania).

3.2.4.3. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se utilizó un protocolo de extracción en columna (*High Pure PCR Template Preparation Kit*, Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania) a partir de 50 µl de la muestra homogeneizada o de la sangre. El DNA purificado en la columna fue eluido dos veces con agua mQ estéril. Las muestras obtenidas se conservaron a -20°C.

3.2.4.4. Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA total se utilizó de nuevo un protocolo de extracción en columna (*High Pure RNA Isolation*, Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Partimos de 50 µl de homogenado del encéfalo. El RNA fue eluido en 50 µl de H₂O con DEPC al 0.1% y analizado en un gel de agarosa o en el *NanoDrop* (ND-1000 Spectrophotometer) (NanoDrop Technologies, Delaware, EE.UU.).

En el caso de la extracción de RNA de los cultivos celulares se utilizó el reactivo Tripure® (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) que se basa en un método de extracción fenólica.

3.2.4.5. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas partimos de 50 µl de las muestras homogeneizadas que fueron lisadas en hielo durante 30 minutos con solución de lisis (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.5% Triton X-100 y cóctel de inhibidores de proteasas [Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania]).

En el caso de los cultivos celulares, en primer lugar se tripsinizaron las células para levantarlas de la placa. Posteriormente se centrifugaron a 1000Xg y se lisaron con solución de lisis.

Los lisados (procedentes tanto de células como de tejido) fueron centrifugados a 1870Xg durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron hervidos durante 3 minutos con solución de carga (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.5 M ditioneitol, 10% SDS, 0.5% azul de bromofenol, 50% glicerol).

La cantidad de proteína de los lisados se midió mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) (Bio-Rad Protein Assay, Munich, Alemania) o de ácido bicínico (BCA) (Smith et al., 1985) (BCA Protein Assay, Pierce, EE.UU.) según el experimento.

3.2.5. PCR cuantitativa a tiempo real

El DNA viral de los distintos tejidos se cuantificó mediante PCR cuantitativa. Para ello se utilizaron dos protocolos distintos. En el primer caso se cuantificó un fragmento del genoma del HSV-1 mediante la detección de la fluorescencia emitida por el fluoróforo intercalante SYBR Green I®.

El segundo protocolo de cuantificación se basó en la detección de la fluorescencia emitida por un fluoróforo unido a una sonda TaqMan-MGB®.

3.2.5.1 PCR cuantitativa con SYBR Green I®

La PCR cuantitativa se llevó a cabo en un termociclador *Light Cycler*® (Roche Diagnostics Ltd, Lewes, Gran Bretaña) siguiendo el protocolo puesto a punto previamente en el laboratorio (Burgos et al., 2002b). Para la detección de genomas virales se amplificó un fragmento del gen de la *timidin kinasa (tk)* de 110 pares de bases (pb). Para la cuantificación se realizó una recta patrón con concentraciones conocidas de copias virales. La cantidad de DNA viral fue expresada como número de genomas virales.

Como control endógeno se amplificó un fragmento del gen de la β -actina de ratón de 379 pb. Del mismo modo, se optimizó una recta patrón con diluciones de concentración conocida de DNA genómico de ratón, expresando los resultados en nanogramos de DNA.

La carga viral se expresó como el número de genomas virales, cuantificados con la PCR de la *tk*, dividido por 100 ng de DNA genómico, cuantificados con la PCR del gen murino de la β -actina.

Las reacciones fueron optimizadas para un volumen final de 10 µl, con 2 µl de DNA y la mezcla de reacción conteniendo: *Fast Star DNA Master SYBR Green* (Roche Diagnostics Ltd, Lewes, Gran Bretaña), MgCl₂, oligonucleótidos (directo y reverso) y agua mQ estéril hasta completar el volumen final de la reacción. En la tabla MM3 se especifican las secuencias de los oligonucleótidos utilizados. Las condiciones específicas de cada reacción se detallan en la tabla MM4.

Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado.

Tabla MM3			
Nombre	Oligonucleótido directo (5'-3')	Oligonucleótido reverso (5'-3')	Tamaño amplicón
<i>timidin kinasa</i>	ATACCGACGATCTGCACCT	TTATTGCCGTGCGG	110 pb
β -actina	AACCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGATGACC	CCAGGGAGGAAGAGGATGCGGC	379 pb

Tabla MM4								
Oligonucleótido	Preinc.	Amplificación				Desnat.	Concentración	
		Ciclos	Desnat.	Anillamiento	Extensión		Oligonucleótidos	MgCl ₂
<i>tk</i>	95°C 10 min	50	95°C 15s	60°C 5s	72°C 10s	De 65° a 95°C (0.1°C/s)	0.5 µM	2 mM
β -actina		45	95°C 30s	55°C 30s	72°C 40s			

3.2.5.2. PCR cuantitativa con sondas Taqman-MGB®

Las distintas reacciones se pusieron a punto en el sistema *ABI Prism 7900HT SD*® (Applied Biosystem, EE.UU.) con un volumen de reacción de 10 µl conteniendo 2 µl de DNA y una mezcla *PCR universal* (Applied Biosystem, EE.UU.) con los siguientes oligonucleótidos (Ramírez, 2006):

Directo (5'-3'): CGTACGCGATGAGATCAATAAAAGG

Reverso (5'-3'): GCTCCGGGTCGTGCA

Para la detección del genoma viral se utilizó una sonda Taqman-MGB® específica de una secuencia incluida en el gen viral Us12: (5'-3') AGGCGGCCAGAACC.

Se realizó el mismo protocolo para cuantificar el DNA genómico del ratón, para lo que se utilizó un ensayo prediseñado para el gen de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (*gapdh*) (código: Mm99999915_gl, Applied Biosystem, EE.UU.).

Se utilizaron las mismas rectas patrón que en la PCR cuantitativa desarrollada en el Light Cycler®. Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado.

Para la caracterización de los ratones transgénicos tras la primera fase de la RT-PCR (transcripción inversa del RNA en cDNA, apartado 3.2.6.), se realizó la amplificación específica de cada cDNA mediante PCR cuantitativa con el sistema *ABI Prism 7900HT SD*® (Applied Biosystem, EE.UU.).

Se utilizaron los ensayos prediseñados específicos de los genes humanos humanos *TAP1* (código del ensayo: Hs00184465_m1) y *TAP2* (Hs00241060_m1). Como control endógeno se utilizó un ensayo prediseñado del gen *18s* de ratón (código del ensayo: Hs99999901_s1).

3.2.6. RT-PCR (transcripción reversa y amplificación del cDNA por PCR)

En primer lugar se cuantificó y se comprobó el estado del RNA extraído en columna mediante el *nanodrop* (NanoDrop Technologies, EE.UU.) o en un gel de agarosa.

Para la primera fase de la RT-PCR (o transcripción reversa del RNA total en cDNA), se utilizaron los reactivos y especificaciones del kit GeneAmp®RNA PCR (Applied Biosystems, EE.UU.). Para ello se puso a punto la reacción con las condiciones que se detallan en la tabla MM5.

Tras la primera fase de la RT-PCR (transcripción inversa del RNA en cDNA, apartado 3.2.6.), la segunda etapa correspondió a la amplificación específica de cada cDNA. Para ello se añadieron a cada tubo el MgCl₂, el tampón PCR II y los oligonucleótidos específicos en las condiciones puestas a punto previamente para cada reacción. Asimismo los ciclos y temperaturas de la PCR fueron los optimizados para dichas reacciones (tabla MM6).

Tabla MM5	
Reactivos	Concentración final
MgCl ₂	5 mM
PCR tampón II	1x
Mezcla dNTPs	1 mM
Inhibidor de RNAasa	1 U/ μ l
Transcriptasa inversa MuLV	2.5 U/ μ l
Oligo d(T) ₁₆	2.5 μ M
H ₂ O-DEPC	Hasta 20 μ l
RNA	\leq 1 μ g RNA total

1 ciclo		
1 hora 42°C	5 min 99°C	5 min 4°C

3.2.7. Inmunomarcaje de proteínas tras transferencia proteica (*Western-Blot*)

3.2.7.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

Las electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se realizaron según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). El porcentaje de acrilamida utilizado en los geles fue del 8%. Como marcadores de peso molecular se emplearon los marcadores coloreados RainbowTM (Amersham Pharmacia Biotech, España) de alto peso molecular (250, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15 y 10 KDa).

3.2.7.2. Electrotransferencia

De acuerdo con el método de Towbin (Towbin et al., 1979), las proteínas separadas en geles de poliacrilamida-SDS se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa (Bio-Rad, Alemania), con un tamaño de poro de 0.45 μ m, durante 120 minutos con una corriente de 1.3 mA/cm² del gel mediante un método de transferencia electroforética semi-seca. Posteriormente, para poder observar las proteínas transferidas, se tiñó la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau S. Finalmente la membrana se incubó con el tampón de saturación correspondiente durante toda la noche a 4°C, con objeto de minimizar las uniones inespecíficas de los anticuerpos. La disolución de saturación fue de BSA al 3% en tampón fosfato salino conteniendo Tween-20 al 0.2% (PBST), o de leche en polvo (Central Lechera Asturiana, España) al 10% en PBST, en función del diseño experimental.

3.2.7.3. Inmunodetección y revelado

Después de la saturación, la membrana se incubó dos horas a temperatura ambiente y con agitación con el anticuerpo primario, que según el caso fue diluido en BSA al 1% o en leche al 1% en PBST en función de la disolución de saturación utilizada. Las membranas fueron lavadas tres

veces con PBST e incubadas con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa y diluido en BSA al 1% o en leche al 1%. Finalmente, la unión de los anticuerpos se reveló utilizando un método quimioluminiscente en el que la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario cataliza la oxidación del reactivo luminol en presencia de H_2O_2 (ECL de Amersham Pharmacia Biotech, España).

La cuantificación de las bandas se realizó mediante densitometría utilizando el densitómetro GS-710 *Calibrated Imaging Desitometer* (Bio-Rad, Alemania).

3.2.8. Perfusión y tratamiento de las muestras para inmunohistoquímica

En primer lugar, se anestesiaron los ratones mediante inyección intraperitoneal de la mezcla descrita en el apartado 3.2.3.3. Posteriormente fueron perfundidos intraventricularmente con 10 ml de PBS estéril seguidos de 10 ml de formaldehído al 10% (Tsurutani et al., 2003).

3.2.8.1. Disección de órganos

Los órganos fueron extraídos de igual manera que en apartado 3.2.4.1. a excepción del encéfalo, al que se le realizó un corte sagital dividiéndolo en dos partes iguales. Los órganos extraídos se introdujeron en casetes para facilitar los pasos siguientes.

3.2.8.2. Preparación de las muestras

Las muestras se fijaron en formaldehído al 10%. Posteriormente se realizaron varios lavados con PBS para eliminar el fijador y a continuación fueron sometidas a un proceso de deshidratación seriada en las siguientes condiciones:

- I. Etanol 70%: 30 minutos en agitación.
- II. Etanol 80%: 30 minutos en agitación.
- III. Etanol 96%: 30 minutos en agitación.
- IV. Etanol 100%: 30 minutos en agitación.
- V. Etanol 100%: 1 hora en agitación.
- VI. Butanol 100%: 1 hora en agitación.
- VII. Butanol 100%: durante toda la noche en agitación.
- VIII. Butanol 100%: 2 horas en agitación.

Tras la deshidratación, se procedió a la inclusión de las muestras en parafina:

- IX. Parafina (P.F. 56-58°C): 2 horas en estufa a 60°C.
- X. Parafina (P.F. 56-58°C): toda la noche en estufa a 60°C.
- XI. Parafina (P.F. 56-58°C): 3 horas en estufa a 60°C.

Los casetes de inclusión fueron situados en moldes con parafina en la estufa a 60°C. A continuación se sacaron a temperatura ambiente hasta el solidificado de la parafina. Pasado este tiempo los bloques de parafina con las muestras fueron separados de los moldes y se almacenaron en un lugar fresco y seco. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de 6 µm de grosor de los órganos embebidos en parafina. Estos cortes fueron desparafinados, hidratados e incubados con 0.1 M de tampón citrato (pH 6.0) durante un minuto en una olla a presión convencional para desenmascarar el antígeno (Norton et al., 1994) o alternativamente fueron incubados con 10 mg/ml de proteinasa K en PBS durante 30 minutos a 37°C.

3.2.8.3. Inmunohistoquímica de campo claro

Tras el tratamiento con el tampón citrato, los cortes fueron lavados con tampón tris-salino (TBS). En el caso del revelado con peroxidasa, los cortes se incubaron previamente con H₂O₂ al 3% para bloquear la peroxidasa endógena. Las preparaciones fueron entonces incubadas con suero normal de cabra (NGS) en TBS conteniendo Triton X-100 al 0.05% (TBST) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras este tratamiento, se incubaron con el anticuerpo primario diluido en NGS al 3% en (TBST) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizaron lavados con TBS y fueron incubados con el anticuerpo secundario diluido en NGS al 0.3% en TBST durante una hora a temperatura ambiente. Tras un nuevo lavado en TBST, los cortes se incubaron con el complejo avidina-biotina-fosfatasa o avidina-biotina-peroxidasa (Dako, Barcelona, España) durante 45 minutos a temperatura ambiente y se revelaron usando el Kit *AP-res substrate* o *DAB PLUS substrate* (Zymed Laboratorios Inc., EE.UU.). Finalmente, las muestras se contratiñeron con hematoxilina de Mayer para resaltar la arquitectura celular. Estas muestras fueron montadas con cubreobjetos utilizando un medio de montaje acuoso, *Aquatex* (Meck, Bärmstabt, Alemania).

En todos los experimentos se llevaron a cabo controles negativos para descartar marcajes inespecíficos. Se utilizaron muestras de animales *MOCK* y se incluyeron secciones de cada muestra sin anticuerpo primario o sin anticuerpo secundario. Además, se examinaron al menos 3 cortes por muestra.

Para visualizar las muestras se utilizó el microscopio de fluorescencia *Zeiss Axiovert 135* (Zeiss, Alemania) y las imágenes se adquirieron con una cámara *SPOT RT Slider* (Diagnostic, EE.UU.) y su tratamiento se llevó a cabo con el software *Adobe Photoshop 7.0*.

3.2.9. Generación de plásmidos

Para la generación de los vectores necesarios para este trabajo, se han utilizado las técnicas habituales de biología molecular (Sambrook et al., 1989):

- Técnicas de extracción y purificación de DNA plasmídico
- Estrategias de clonaje: utilización de enzimas de restricción, ligación, desfosforilación de DNA plasmídico...
- Desarrollo de bacterias competentes
- Electroforesis de DNA
- Mutagénesis dirigida

3.2.10. Transfección de células

En el caso de células adherentes (HEK293) se sembraron un número de células suficiente para obtener un 90% de confluencia en el momento de transfectar, en un medio carente de antibióticos. El DNA fue diluido en Opti-MEM® I *Reduced Serum Medium* (Gibco®, España). Este DNA fue mezclado con Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™, EE.UU.) en una relación DNA-Lipofectamine™ 2000 de 1:4. Posteriormente, se retiró el medio DMEM, añadiéndose en su lugar medio Opti-MEM. A continuación las células se incubaron con el complejo DNA-Lipofectamine™ 2000. A las 5 horas de la transfección se agregó medio DMEM suplementado al cultivo. Las células fueron mantenidas en un incubador a 37°C y al 7% de CO₂.

3.2.11. Generación de los ratones transgénicos mediante microinyección

Las construcciones de los vectores de expresión de los tres transgenes MoPrP.Xho-*TAPIA*, MoPrP.Xho-*TAP2A* y MoPrP.Xho-*TAP2B* se obtuvieron mediante técnicas de biología molecular como se describe en el apartado 4.3.1. Estas tres construcciones fueron microinyectadas mediante técnicas clásicas en ratones mixtos CBA-C57BL/6J por parte de la empresa Affigen (España). Una vez obtenida la primera generación de cada línea de transgénico, se genotiparon mediante PCR, se seleccionaron y se procedió a la sucesión de cruces con ratones C57BL/6J para conseguir la congenicidad de la cepa (figura MM4).

Finalmente se cruzaron con ratones deficientes en el gen *tap1* (B6.129S2-*tap1*^{tmlArp/J}) obtenidos de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, EE.UU.) para obtener ratones transgénicos sin *tap1* murino.

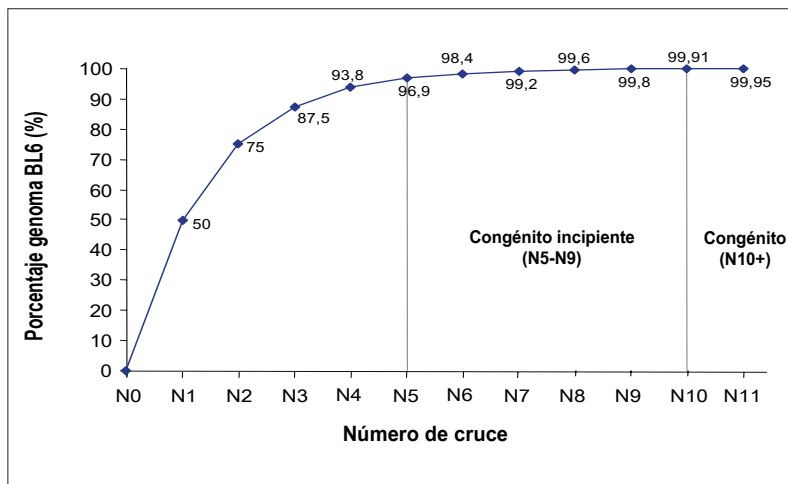


Figura MM4. Porcentaje de fondo genético C57BL6 en función del número de cruces.

3.2.12. Mantenimiento de las colonias

Durante los cruces para la expansión de las líneas transgénicas y durante los cruces con C57BL/6J, los ratones se mantuvieron en condiciones estériles, con ciclos de luz y oscuridad alternativos de 12 horas, con agua y alimentos estándar *ad libitum* (Teklad global 18% protein rodent diet, Mucedola, Italia). Una vez detectada la preñez de la hembra, ésta se separó y se acondicionó la cubeta para el parto.

Las crías se mantuvieron con la madre hasta los 21 días post-parto, momento en el que se destetaron, se identificaron y se separaron por sexos.

Para el genotipado de la progenie, en el momento del destete, se les realizó una biopsia caudal con objeto de extraer una muestra de DNA.

3.2.12.1. Extracción del DNA genómico de los ratones

El DNA se extrajo a partir de la muestra de cola obtenida en el momento del destete. En primer lugar se incubó la biopsia de cola durante toda la noche a 56°C con 750 µl de una solución que contuvo NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), EDTA 100 mM (pH 8.0), SDS 1% y proteinasa K 0.5 mg/ml. Posteriormente se realizó una agitación del tubo durante 5 minutos para homogeneizar la muestra, añadiendo entonces 250 µl de NaCl saturado, mezclando y centrifugando a máxima velocidad en una microfuga durante 10 minutos. Posteriormente se transfirieron 750 µl del sobrenadante con 500 µl de isopropanol, mezclando varias veces por inversión, volviendo a centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos. El sobrenadante fue retirado por aspiración, y el precipitado lavado con 500 µl de etanol al 70%. Tras una nueva centrifugación durante 5 minutos a máxima velocidad, el sobrenadante

fue retirado cuidadosamente y, tras eliminar los restos de etanol, el precipitado fue resuspendido en 150 μ l de agua mQ estéril.

3.2.12.2. Análisis mediante PCR

Para el genotipado de los ratones se eligió la técnica de la PCR debido a su alta especificidad y rapidez. En el caso del análisis de la presencia o ausencia del transgén, se pusieron a punto las distintas reacciones en el sistema *ABI Prism 7900HT SD*[®] (Applied Biosystem, EE.UU.) utilizando ensayos prediseñados específicos de los genes humanos *TAP1* (código del ensayo: Hs00184465_m1) y *TAP2* (Hs00241060_m1). En el caso de *TAP2* el mismo ensayo es válido para *TAP2A* y *TAP2B*.

Alternativamente se utilizaron varias parejas de oligonucleótidos para el genotipado de los ratones transgénicos (tabla MM5). En las figuras MM5 y MM6 se representa la organización genómica de los tres genes, *TAP1A*, *TAP2A* y *TAP2B* donde han sido indicadas las posiciones de las distintas parejas de oligonucleótidos.

Para analizar la presencia de gen *tap1* murino se puso a punto una PCR con las condiciones que se reflejan en la tabla MM5. Las condiciones específicas en las que se utilizaron los diferentes componentes se detallan en la tabla MM6.

Tabla MM5					
Nombre	Oligonucleótido directo (5'-3')	Posición en el gen	Oligonucleótido reverso (5'-3')	Posición en el gen	Tamaño amplicón
RNA-TAP1	ATGGCTAGCTCTAGGT GTCCC	+1	TCATTCTGGAGCATCTGCAG	+ 2 227	2 247 pb
RNA-TAP2	ATGCGGCTCCCTGACC TGAGA	+1	TCAGTCCATCAGCCGC TGCTG	+ 2 119	2 140 pb
MUTAG-TAP2B-2021	GCTCACAGGCTGCAGGCA GTTCCAGCGGCC	+ 2 006	-	-	-
MUTAG-TAP2B-2087	TGCCCAGCTCCAGGAGGGA CAGGACCT	+ 2 074	-	-	-
TAP1-kozak	ACGGCTCGAGATTATGGCTA GCTCTAGGTGTCCC	- 13 (exón 1)	AGTAGCCTGGTGCTAT CCGCG	Exón 1	392 pb
TAP2-kozak	CGGGGTACCGGGATTAT GCGGCTCCCTGACCTGAGA	- 15 (exón 1)	GAAAAGCTGCTCCCG GATCCG	Exón 3	690 pb
PrP 107 fw	CATTCTGCCTTCTAGT GGTACC	Extremo 5'	-	-	-
PrP 172 rev	GCGAAGGAACAAGCA GGAAGG	Extremo 3'	-	-	-
TAP1m-Intron4	TGTTCTCTGGTCCTTGCTTC	3' Intron 4	-	-	-
TAPKO	CTTGGGTGGAGAGGCTATTC	-	AGGTGAGATGACAG GAGATC	-	280 pb
TAP1-RTmouse	CATGCACGGCCGTGTGCACA	Exón 3	GTCCAGACTTCAGCCA CGTAA	Exón 5	1861 pb
TAP1	AACGGTTGGCTCCAAGAGC GAAAACGC	Exón 1	GTATCGGCTGAGCCATCTTG TAGAATC	Exón 2	434 pb
TAP2	AAGATGATAAGGTGATGG	Exón 9	TGAACTGCAGCCTGTGAG CAATC	Exón 11	285 pb
TAP1-RT	CGTGCACAGCCACTT GCAGG	Exón 3	GTCCAGGAGTTGACT GCATAG	Exón 5	476 pb
TAP2-RT	TCACGTGCTCCCCAGCCAG	Exón 1	ACGAGCAGGTACAAG GCGCG	Exón 5	877 pb

Tabla MM6												
	Preinc.	Amplificación				Elongac.	Concentración					
Oligonucl.	1 ciclo	Ciclos	Desnat.	Anillamiento	Extensión	1 ciclo	Oligonucl.	MgCl ₂				
<i>RNATAP1</i>	95°C 3 min	50	95°C 30s	59°C 30 s	72°C 30 s	72°C 5 min	0.15 µM	2 mM				
<i>RNATAP2</i>												
<i>TAP1</i>		35		94°C 20s			60°C 30 s	72°C 30 s	72°C 5 min	0.4 µM	1.5 mM	
<i>TAP2</i>												
<i>TAP1Kozak</i>												
<i>TAP2Kozak</i>												
<i>TAP1-RT</i>												
<i>TAP2-RT</i>												
<i>TAP1m-In4/ TAP1-RTm</i>			55°C 30 s			0.25 µM						
<i>TAP KO</i>	94°C 3 min	12	94°C 20s	64°C (-0.5°C/ciclo)	72°C 35 s	72°C 2 min	0.5 µM	2 mM				
		25		58°C 30 s	72°C 35 s							

3.2.13. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos entre grupos fueron realizados utilizando el test exacto de Fisher o el de la *t* de Student (especificado en cada caso) para muestras de varianza desigual. Todos los valores que muestran la carga de DNA viral fueron expresados como la media ± error estándar de la media (SEM). Los datos considerados significativos se indican en el pie de figura con el p-valor correspondiente.

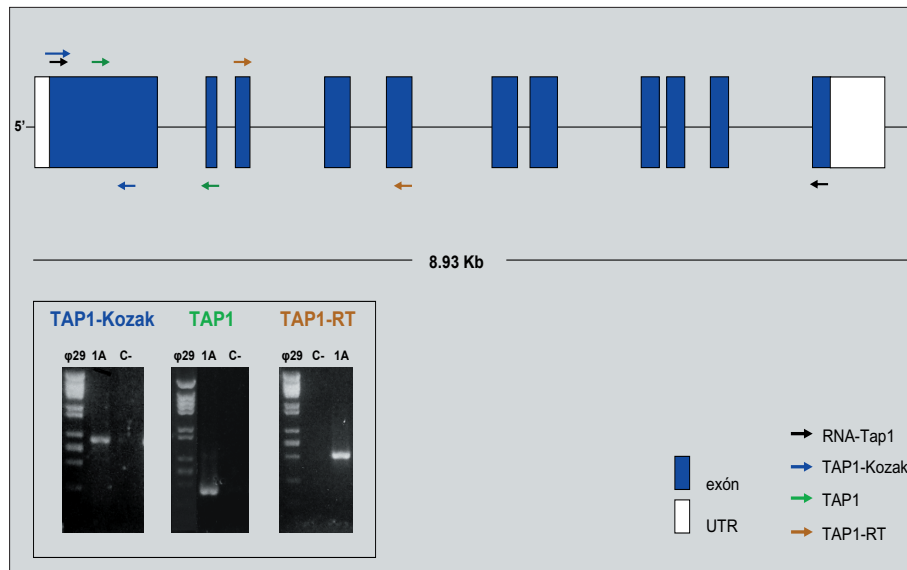


Figura MM5. Organización genómica de *TAP1*. En la parte superior del esquema se representa la organización genómica del gen *TAP1* en los diferentes exones e intrones, así como la posición de las distintas parejas de oligonucleótidos utilizadas en el clonaje y el genotipado de los ratones. En el recuadro se muestran varios geles representativos de las PCR donde se analizaron ratones TAP1A (1A) y ratones salvajes (C-).

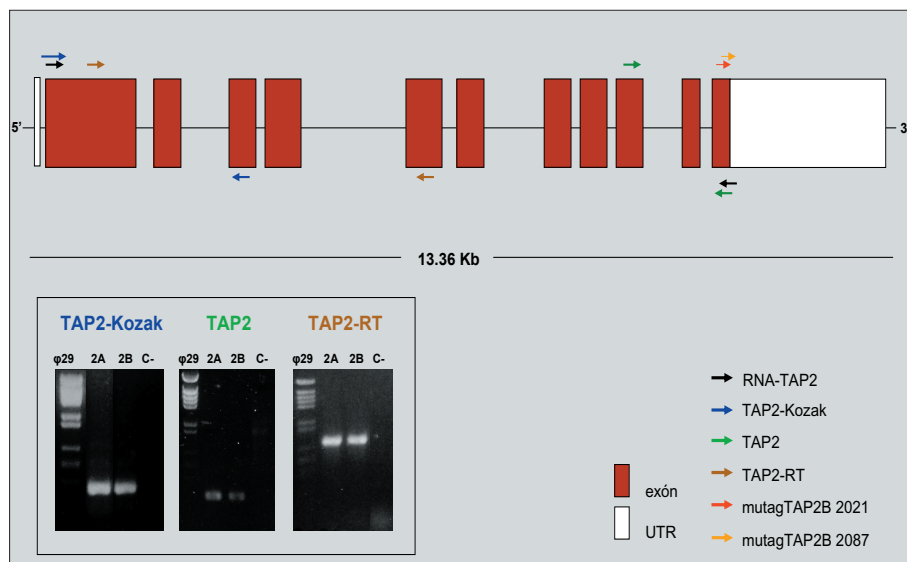


Figura MM6. Organización genómica de *TAP2*. En la parte superior del esquema se representa la organización genómica del gen *TAP2* en los diferentes exones e intrones, así como la posición de las distintas parejas de oligonucleótidos utilizadas en el clonaje, el genotipado de los ratones y para la mutagénesis dirigida. En el recuadro se muestran varios geles representativos de las PCR donde se analizaron ratones TAP2A (2A), TAP2B (2B) y ratones salvajes (C-).

Resultados

4. Resultados

4.1. Optimización del método de detección del genoma viral

La determinación de la carga viral se analizó mediante PCR cuantitativa debido a su extremada sensibilidad y reproducibilidad. Para ello se utilizaron los sistemas Light Cycler® y ABI Prism 7900HT SD® puestos a punto previamente en el laboratorio (Ramírez, 2006).

La cuantificación de las cargas virales se llevó a cabo mediante la amplificación de un fragmento del gen de la *timidin kinasa* (*tk*) del virus HSV-1, a partir de DNA viral extraído de células Vero infectadas con concentraciones conocidas de copias virales: 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 y 5×10^1 copias del genoma por unidad de volumen (μl) (figura R1). Las condiciones específicas de la PCR se detallan en las tablas MM3 y MM4. Se comprobó la identidad del producto de PCR por su temperatura de desnaturalización (o *melting*), por el tamaño del amplificado en gel de agarosa y mediante análisis de restricción.

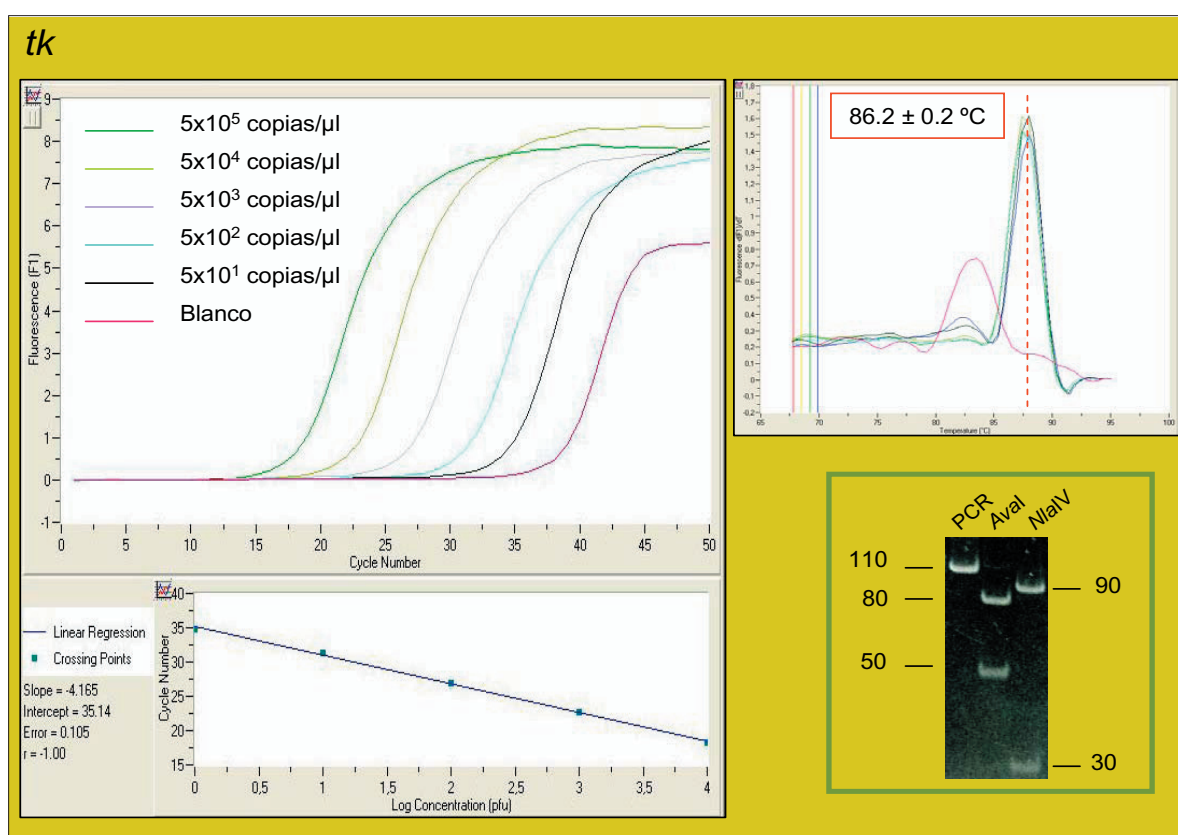


Figura R1. Optimización de la PCR de *timidin kinasa* con el sistema Light Cycler®. La gráfica superior izquierda muestra el aumento de fluorescencia emitida por SYBR Green I® en relación a los ciclos de amplificación. La gráfica inferior izquierda muestra la recta de regresión del número de ciclos frente al logaritmo de la concentración de DNA molde expresada en nanogramos (ng). La gráfica de la parte superior derecha muestra la variación de la fluorescencia emitida por el SYBR Green I® con respecto a la temperatura. En el recuadro se muestra un gel con el producto de la PCR y el resultado de la digestión de este producto con las enzimas de restricción *AvaI* y *NlaIV* (los números expresan los pares de bases de los fragmentos obtenidos como consecuencia de la digestión).

RESULTADOS

En todos los casos, la cuantificación viral se normalizó con respecto al DNA genómico de ratón. Para ello, se diseñó una PCR que amplifica un fragmento del gen de la β -actina (tablas MM3 y MM4), utilizando diluciones seriadas con concentraciones conocidas de DNA genómico: 10, 5, 1, 0.2 y 0.04 ng/ μ l (figura R2). De modo similar a la *tk* viral, la identidad del fragmento amplificado se comprobó por la temperatura de desnaturalización, por el tamaño del amplificado en gel de agarosa y mediante digestión enzimática.

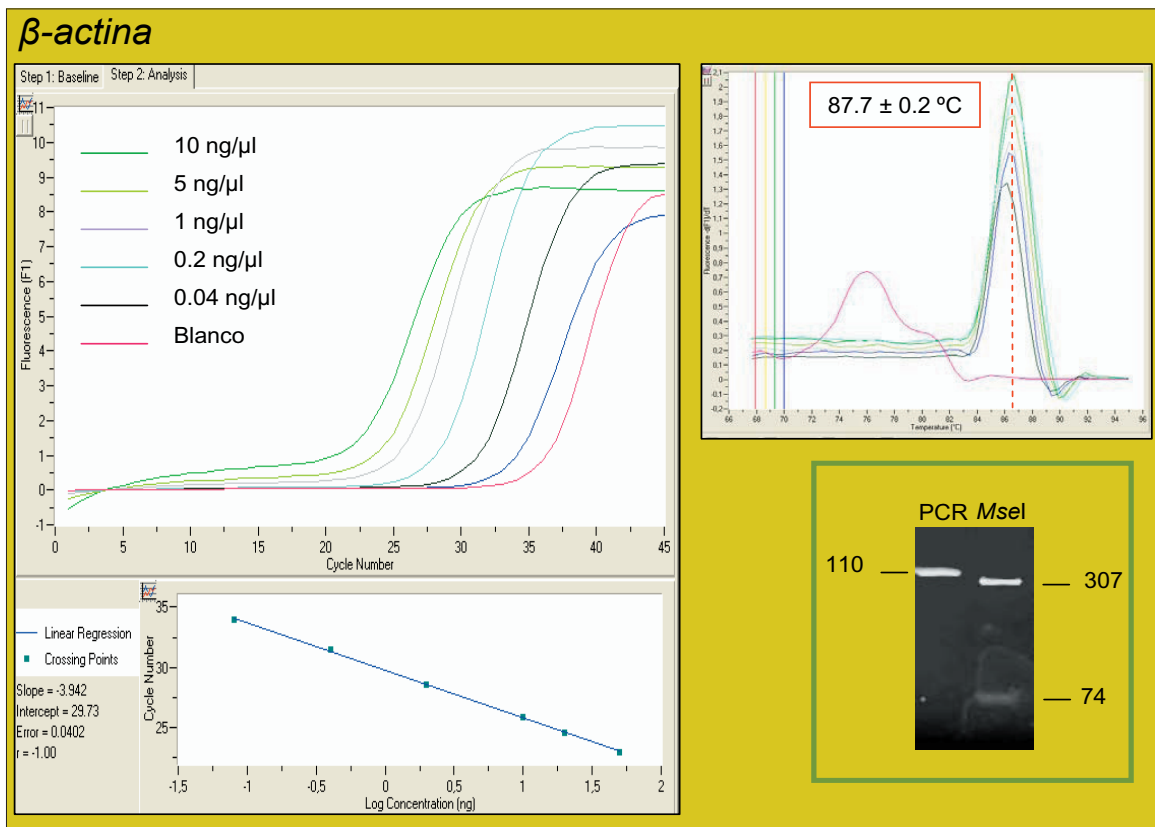


Figura R2. Optimización de la PCR de β -actina con el sistema Light Cycler[®]. La gráfica superior izquierda muestra el aumento de fluorescencia emitida por SYBR Green I[®] en relación a los ciclos de amplificación. La gráfica inferior izquierda muestra la recta de regresión del número de ciclos frente al logaritmo de la concentración de DNA molde expresada en nanogramos (ng). La gráfica de la parte superior derecha muestra la variación de la fluorescencia emitida por el SYBR Green I[®] con respecto a la temperatura. En el recuadro se muestra un gel con el producto de la PCR y el resultado de la digestión de este producto con la enzima de restricción *Mse*I. (los números expresan los pares de bases de los fragmentos obtenidos como consecuencia de la digestión).

En el sistema ABI Prism 7900HT SD[®] se diseñaron dos sondas Taqman-MGB[®] específicas para cuantificar el DNA viral: una que específicamente reconoce un amplificado del gen viral Us12, y, para normalizar esta cuantificación, una sonda que se une a un fragmento del gen murino de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (*gapdh*) (Ramírez, 2006). La cuantificación fue realizada usando las mismas curvas de DNA viral y de genómico de ratón mencionadas anteriormente (figura R3).

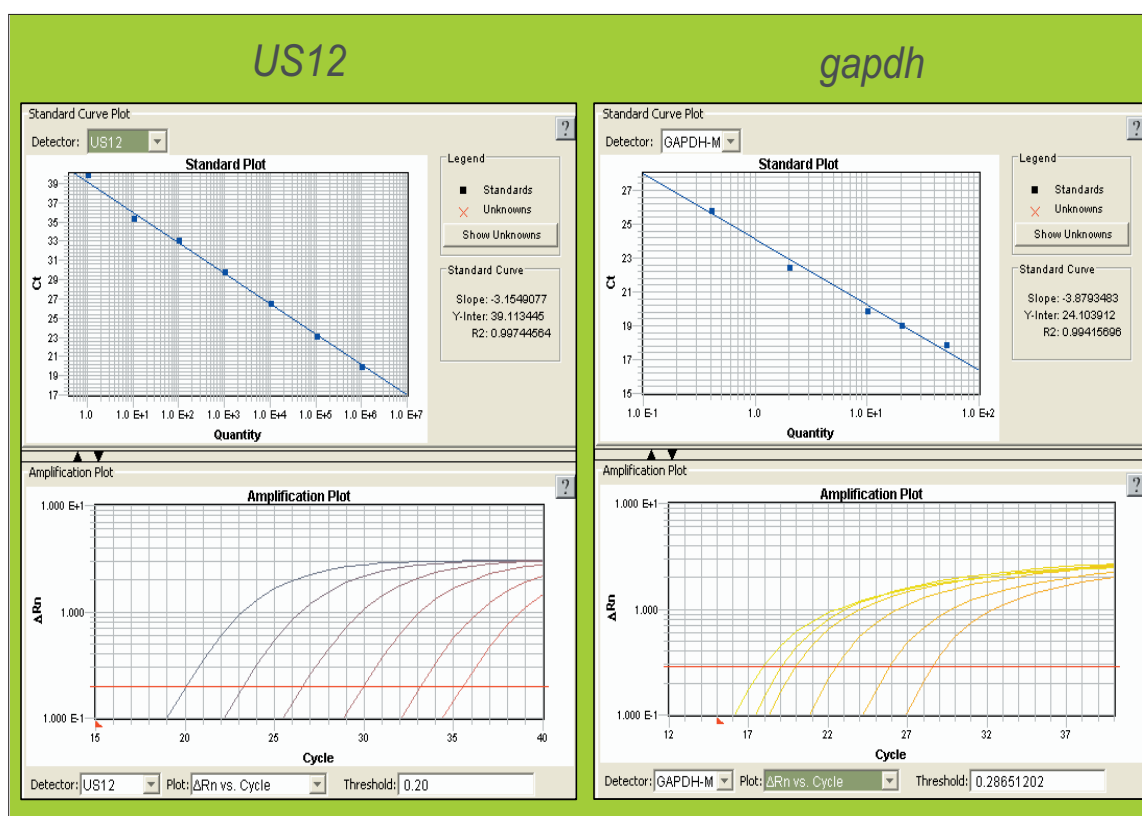


Figura R3. Amplificación de DNA viral y de DNA genómico con el sistema ABI Prism 7900HT SD®. Las gráficas en la parte superior muestran las rectas de regresión del número de ciclos frente al logaritmo de la concentración de DNA molde expresada en nanogramos (ng). Las gráficas de la parte inferior muestran el aumento de fluorescencia emitida por la sonda TaqMan-MGB® específica para cada gen en relación a los ciclos de amplificación.

4.2. Caracterización de la infección de HSV-1

Varias especies de animales han servido como modelos de infección para el HSV-1: ratón, conejo, mono o cobaya (Norgren y Lehman, 1998), pero el ratón es el modelo más ampliamente utilizado debido a su bajo coste de mantenimiento que permite trabajar con un número de animales suficiente para aportar datos estadísticamente significativos. Además, la disponibilidad de una gran variedad de ratones transgénicos permite abordar un completo estudio de la interacción del virus con su hospedador. Sin embargo, el modelo murino presenta algunas limitaciones como son la reactivación *in vivo* del virus (Sawtell y Thompson, 1992b), y las inherentes al uso de un hospedador no natural para el HSV-1 (Kern, 1999).

El estudio de la infección está condicionado por la cepa de virus utilizada (Norgren y Lehman, 1998), así como por la vía de inoculación empleada (Kern, 1999). De hecho, el HSV-1 puede acceder al sistema nervioso central (SNC) tanto por una ruta hematogena como por una ruta neural (Johnson, 1964), de modo que la primoinfección podría determinar la enfermedad producida por este virus.

Con el objetivo de seleccionar la vía más eficiente en la llegada del virus al cerebro, en el presente trabajo se han estudiado varias rutas de infección del HSV-1 mediante el análisis comparativo de cuatro vías de inoculación: *intravenosa* e *intraperitoneal*, que experimentalmente siguen una ruta de infección hematogena (Aita y Shiga, 2004; Burgos et al., 2002a), e *intranasal* y de *abrasión del morro*, como rutas de infección neurales (Esiri y Tomlinson, 1984; Tomlinson y Esiri, 1983).

4.2.1. Estudio de la ruta hematogena de infección del HSV-1

4.2.1.1. Progresión de la enfermedad en la infección hematogena

Con el objetivo de monitorizar y analizar el progreso de la infección hematogena por las distintas vías de inoculación, se realizó un estudio comparativo entre ratones infectados por vía intraperitoneal (i.p.) e infectados por vía intravenosa (i.v.) con el virus HSV-1 KOS. Además, se incluyó como control un grupo de ratones *MOCK* que fueron inoculados con solución salina. Tras la infección, los animales fueron observados hasta 10 días post-infección (d.p.i.) (figura R4). Mientras que los animales *MOCK* no presentaron ningún síntoma de enfermedad, los animales infectados cursaron con aislamiento social, progresando con escoliosis y protuberancias en la espalda, afectación de la capacidad de movimiento, seguida de parálisis total y acusada hipotermia. Este proceso de enfermedad finalizó en todos los casos con la muerte del animal.

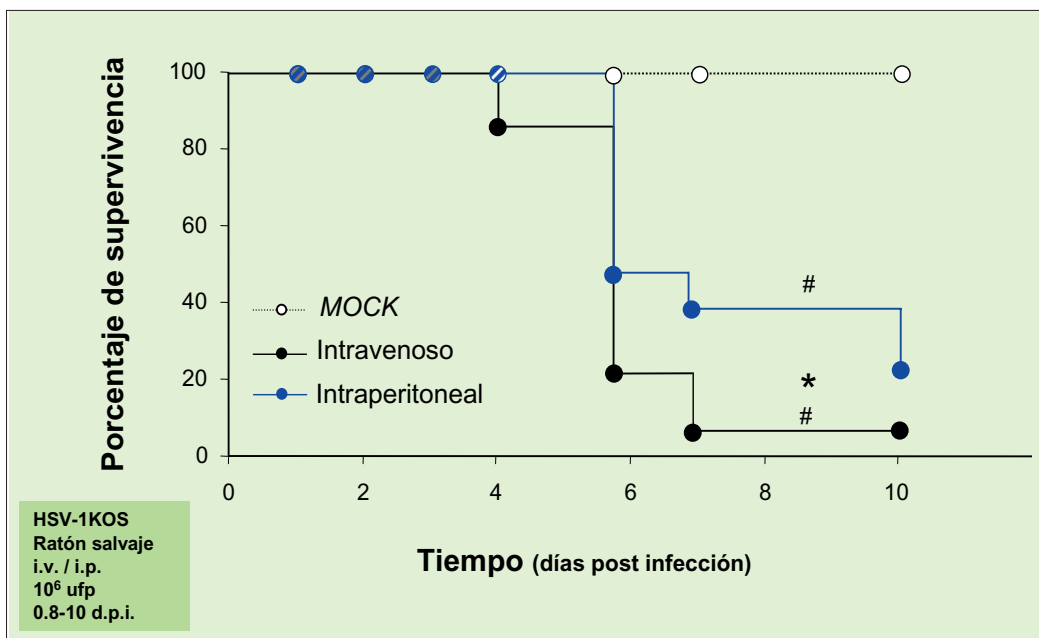


Figura R4. Supervivencia de ratones infectados por vía hematogena con HSV-1. Gráfica Kaplan-Meier que muestra el índice de supervivencia a lo largo del tiempo (0.8 a 10 d.p.i.) de 60 ratones correspondientes a ratones *MOCK* (en blanco) y a ratones inoculados con 10⁶ ufp de HSV-1 KOS, por vía intravenosa (en negro) o por vía intraperitoneal (en azul). Se utilizó el test de χ^2 para comparar las curvas de supervivencia de los animales inoculados por las distintas vías (* $p < 0.01$) y con respecto a los *MOCK* (# $p < 0.01$).

Aunque los cursos de la enfermedad y la sintomatología fueron similares los índices de supervivencia dependieron de la vía de inoculación elegida (figura R4). Los ratones infectados por vía intravenosa permanecieron asintomáticos hasta 3 días post-infección; a 4 d.p.i. encontramos un 86% de supervivencia en este grupo, disminuyendo radicalmente a 5.7 d.p.i. hasta un 21%. A partir de 7 d.p.i. la supervivencia se mantuvo en un 7%. Por su parte, la infección en los ratones inoculados por vía intraperitoneal siguió un curso más lento, permaneciendo asintomáticos hasta el día 4 post-infección. A 5.7 d.p.i. el índice de supervivencia fue de un 46%, llegando hasta un 23% a 10 d.p.i. En términos generales el porcentaje de supervivencia de los ratones infectados por vía intraperitoneal fue significativamente mayor que los animales inoculados por vía intravenosa ($p < 0.05$).

De estos resultados se concluye que la infección por vía intravenosa es significativamente más eficiente que la intraperitoneal en relación a la patología asociada, ya que con una dosis equivalente de inóculo viral el curso de la enfermedad se adelanta, afectando además a la supervivencia total.

4.2.1.2. Efecto de la vía de inoculación en la cuantificación de la carga viral

Tras el análisis de la sintomatología, se realizó un estudio comparativo de la cuantificación de la carga viral detectada en los diferentes órganos como consecuencia de la vía de inoculación hematogena empleada. Para ello, se analizó la carga viral en sangre, ovarios, glándula adrenal, médula espinal y encéfalo. Éste último fue dividido en cuatro áreas que arbitrariamente denominamos: *corteza*, *mesencéfalo*, *diencéfalo* y *cerebelo* como ha sido descrito en el apartado 3.2.4.1.

4.2.1.2.1. Efecto de la vía de inoculación hematogena en la infección aguda a 4 d.p.i.

Tras la infección hematogena (por vía i.p. o i.v.), los animales fueron sacrificados en dos puntos temporales cuya selección se basó en dos situaciones extremas en relación a la enfermedad y a la mortalidad observadas en la curva de supervivencia: el punto de 4 d.p.i. fue escogido debido a su bajo índice de mortalidad en ambas vías de inoculación, mientras que el punto de 5.7 d.p.i. presenta una acusada mortalidad en ambos casos (figura R4).

A 4 d.p.i. el análisis de carga viral reveló una mayor cantidad de DNA viral en los órganos de los ratones inoculados por vía i.v. en comparación con la vía i.p. En la sangre se detectaron altos niveles de DNA viral, independientemente de la vía utilizada, lo que confirma el carácter hematogeno de ambos tipos de inoculación. No obstante, la inoculación i.v. presentó una carga viral significativamente mayor que la i.p. ($p < 0.05$) (figura R5). Del mismo modo, el DNA viral detectado en la glándula adrenal alcanzó niveles significativamente mayores en los ratones infectados por vía i.v. Los ovarios de estos ratones presentaron una menor carga viral con respecto a los ratones infectados por vía i.p. Este hecho

podría deberse a que en una infección más eficiente el punto de máxima detección de DNA viral en este órgano se encontraría en un tiempo anterior al analizado. Como se puede observar en la figura R5, en el sistema nervioso se apreciaron mayores diferencias que en los órganos periféricos entre las dos vías debido al neurotropismo del virus. En el caso particular del encéfalo, los ratones infectados por vía intravenosa presentaron niveles virales de hasta 1 000 veces más que en los infectados por vía intraperitoneal. El análisis de las cargas virales en los ganglios trigéminos reveló, de nuevo, una mayor eficiencia de la vía intravenosa en el acceso al sistema nervioso periférico (SNP).

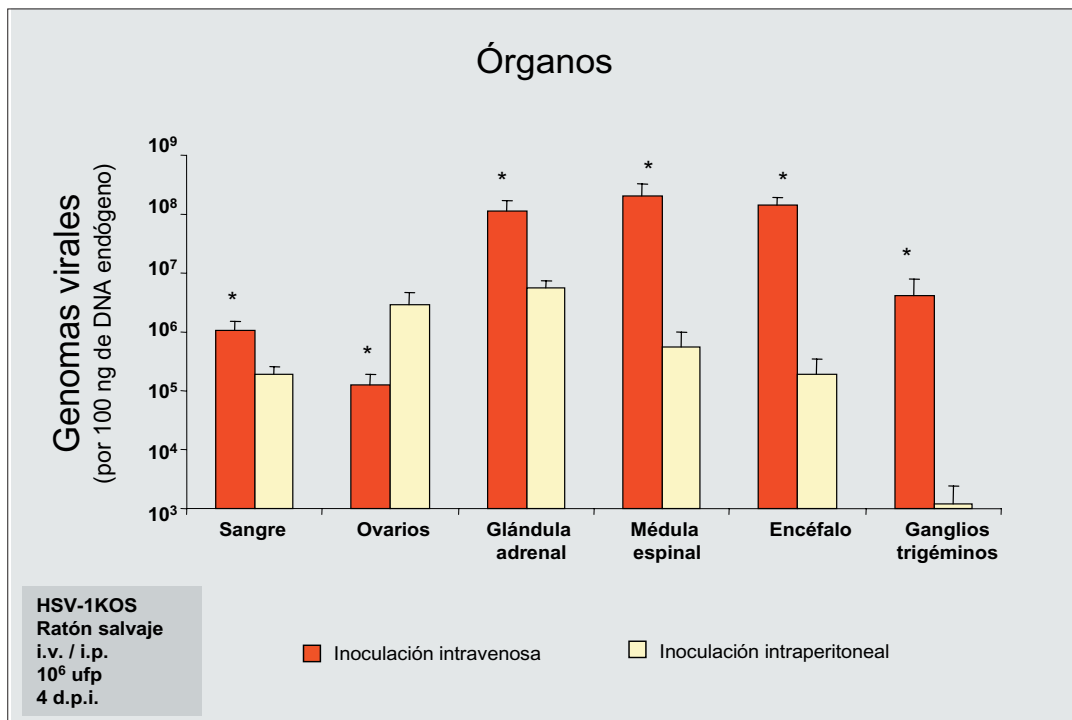


Figura R5. Cuantificación de la carga de DNA viral en la ruta de infección hematológica a 4 d.p.i. Las barras representan la media ± SEM de la cuantificación de DNA viral (expresado como genomas virales y normalizado con respecto a 100 ng de DNA genómico). Se inocularon 10 ratones por vía intravenosa (en rojo) y 5 ratones por vía intraperitoneal (en blanco). En ambos casos se infectaron con 10⁶ ufp de HSV-1 KOS y se sacrificaron a 4 d.p.i. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la carga viral entre ambas vías de inoculación en los diferentes órganos (* p<0.05).

En el análisis del encéfalo en las cuatro regiones arbitrarias previamente definidas, se observó que el área principalmente infectada en ambas condiciones fue el *mesencéfalo*, seguido del *diencéfalo*, la *corteza* y por último el *cerebelo*. Los niveles de virus detectados fueron significativamente mayores en todas las regiones del encéfalo de los ratones infectados por vía i.v. en relación a los infectados por vía i.p. (p<0.05) (figura R6).

Estos resultados indican que la vía intravenosa presenta una mayor eficiencia en la infección, que se hace más evidente en el SN. Además, demuestran que ambas vías siguen la misma ruta de invasión, confirmando la secuencia hematológica previamente descrita en nuestro laboratorio para la inoculación intraperitoneal (Burgos et al., 2002a; Ramírez, 2006).

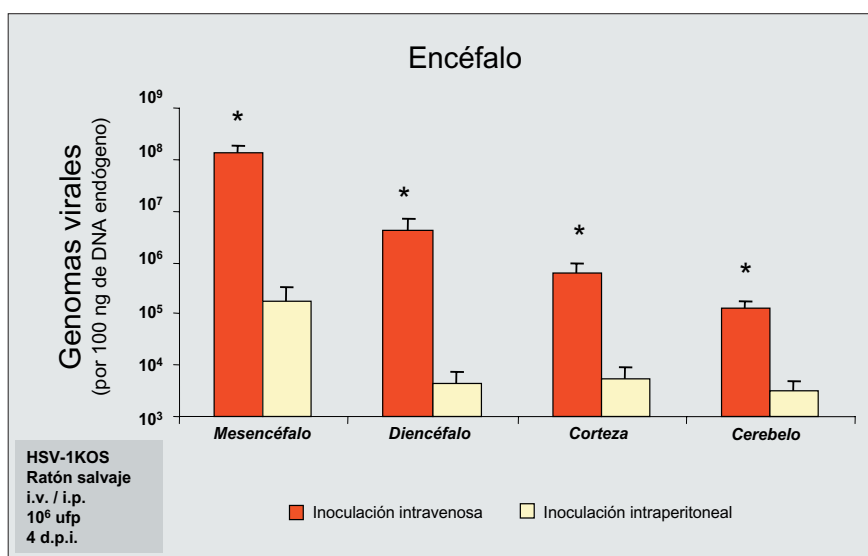


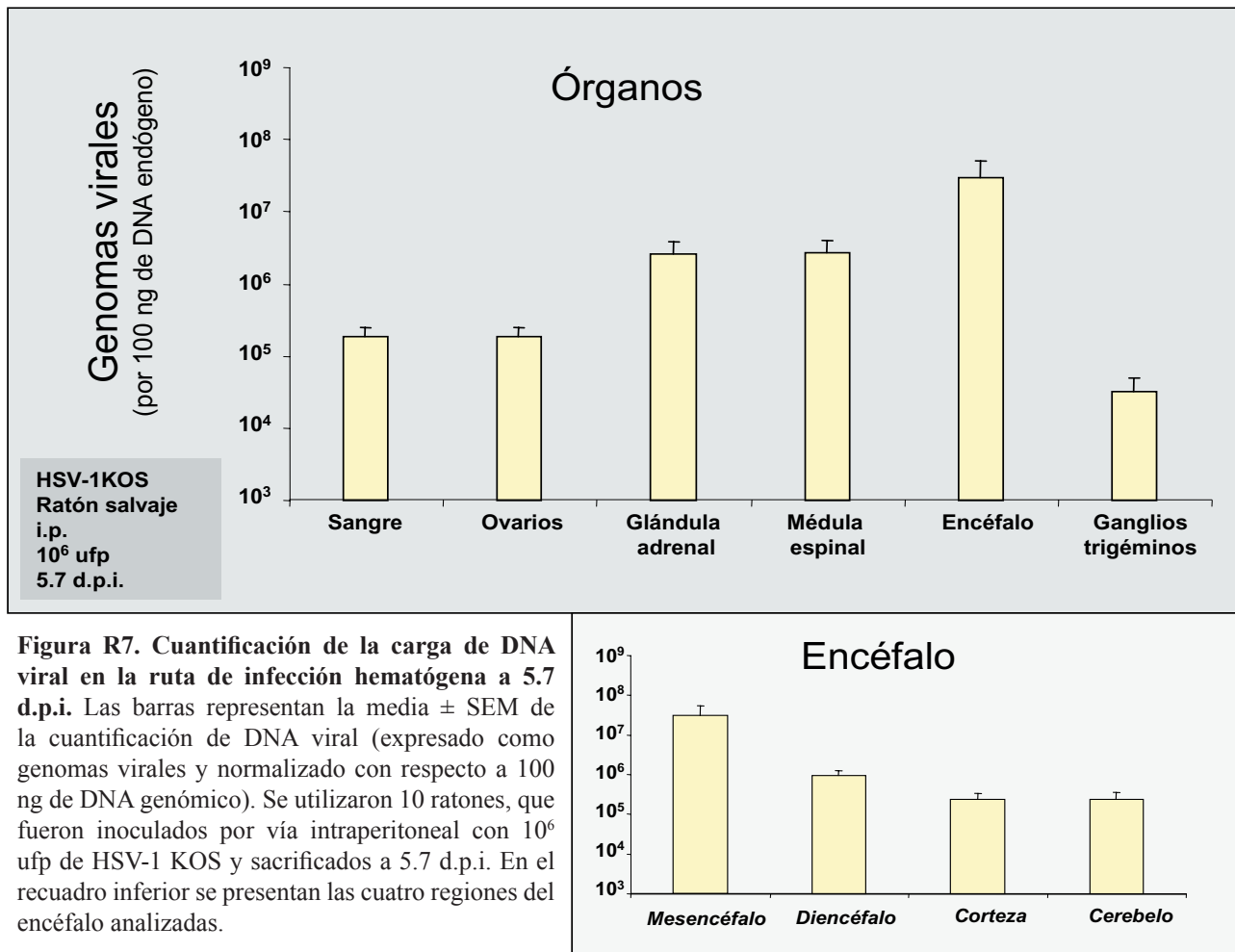
Figura R6. Cuantificación de la carga de DNA viral en el encéfalo en la ruta de infección hematológica a 4 d.p.i. Las barras representan la media \pm SEM de la cuantificación de DNA viral (expresado como genomas virales y normalizado con respecto a 100 ng de DNA genómico) de las cuatro regiones del encéfalo analizadas. Se infectaron 10 ratones, por vía intravenosa (en rojo) y 5 por vía intraperitoneal (en blanco). En ambos casos se infectaron con 10⁶ ufp de HSV-1 KOS y se sacrificaron a 4 d.p.i. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la carga viral entre ambas vías de inoculación en los diferentes órganos (* $p < 0.05$).

4.2.1.2.2. Efecto de la vía de inoculación hematológica en la infección aguda a 5.7 d.p.i.

En este punto temporal los ratones infectados por vía intravenosa presentaron un índice de supervivencia de tan solo un 21%, y de éstos el 100% presentó graves síntomas de enfermedad, por lo que no se incluyeron en el estudio.

El análisis de la carga viral en los órganos de los ratones infectados intraperitonealmente (figura R7) indica de nuevo el carácter hematológico de la infección. El virus fue detectado en sangre a 5.7 d.p.i. con unos niveles similares a los detectados a 4 d.p.i. (comparación de las figuras R5 y R7). Del mismo modo, se detectó el DNA viral en los ovarios y en las glándulas adrenales, aunque en los ovarios los niveles de virus fueron menores que a 4 d.p.i. lo que se corresponde con la entrada del virus al sistema nervioso central (Burgos et al., 2002a; Ramírez, 2006). De hecho, los niveles virales en médula espinal, encéfalo y ganglios trigéminos fueron mayores que a 4 d.p.i., pero similares a los detectados en estos mismos órganos infectados por vía intravenosa (comparación de las figuras R5 y R7), lo que indica una anticipación en la ruta de invasión del virus en la inoculación intravenosa frente a la intraperitoneal.

En una disección más detallada del encéfalo, se observó la presencia de genomas virales en todas las zonas cerebrales analizadas, donde el *mesencéfalo* fue de nuevo la región principalmente infectada seguida del *diencéfalo*, la *corteza* y en último lugar el *cerebelo* (figura R7) sugiriendo, otra vez, el orden de neuroinvasión seguido por el virus tras la infección hematógica.



Los resultados obtenidos en este estudio muestran el carácter hematógico de las dos vías de inoculación utilizadas. En la ruta hematógica el virus alcanza el SNC desde el torrente sanguíneo a través de órganos periféricos como la glándula adrenal o el ovario mediante sus conexiones anatómicas con la médula espinal, como ya ha sido descrito previamente en nuestro laboratorio (Burgos et al., 2002a; Ramírez, 2006). Desde la médula espinal el virus alcanza el *mesencéfalo*, desde donde coloniza los ganglios trigéminos y regiones más distales del cerebro. La distribución del DNA viral en el encéfalo sugiere un orden de neuroinvasión del virus desde el *mesencéfalo* hasta regiones más profundas como el *diencéfalo*, la *corteza* y el *cerebelo*.

El estudio comparativo de la carga viral en las dos vías de inoculación indica que la vía intravenosa es más eficiente en la neuroinvasión lo que se correlaciona con la anticipación de los síntomas clínicos por esta vía.

4.2.1.3. Estudio inmunohistoquímico de la infección hematológica en el cerebro

Tras el análisis de la cuantificación de la carga viral de los ratones infectados por la ruta hematológica (por vía i.v e i.p.) se realizó un estudio inmunohistoquímico para la detección de antígenos virales en el encéfalo de ratón. Este análisis se llevó a cabo en la fase de infección aguda debido a que es cuando se produce la transcripción de los genes virales. El virus fue detectado mediante inmunohistoquímica en cortes sagitales seriados de cerebro utilizando el anticuerpo anti-HSV-1 (tabla MM1), que reconoce las principales glicoproteínas presentes en la envuelta viral.

El análisis inmunohistoquímico de la infección por las dos vías de inoculación hematológicas (i.p. e i.v.) reveló detección de antígenos virales de forma exclusiva en los ratones infectados por vía intravenosa. La ausencia de marcaje en los ratones infectados por vía intraperitoneal fue consecuencia de la menor sensibilidad de la técnica de inmunohistoquímica en relación a la PCR cuantitativa. No obstante, en trabajos previos realizados en el laboratorio se detectaron antígenos virales tras la inoculación intraperitoneal mediante la utilización de otro anticuerpo que reconoce la proteína viral VP16 (Ramírez, 2006). Esto indica que el anticuerpo anti-VP16 es más sensible y que para la detección con el anticuerpo anti-HSV-1 debe superarse un umbral mínimo de infección más alto que para VP16.

El marcaje positivo con el anticuerpo anti-HSV-1 estuvo restringido en todos los casos a los animales que presentaron avanzados síntomas de enfermedad. En la figura R8 se muestran micrografías representativas de las distintas regiones del encéfalo. El análisis inmunohistoquímico mostró la presencia de antígenos virales predominantemente en la región *mesencefálica*, donde observamos la presencia del virus en la médula, el puente y el *mesencéfalo*. También fue observado en el *diencefalo*, concretamente en el tálamo y el hipotálamo.

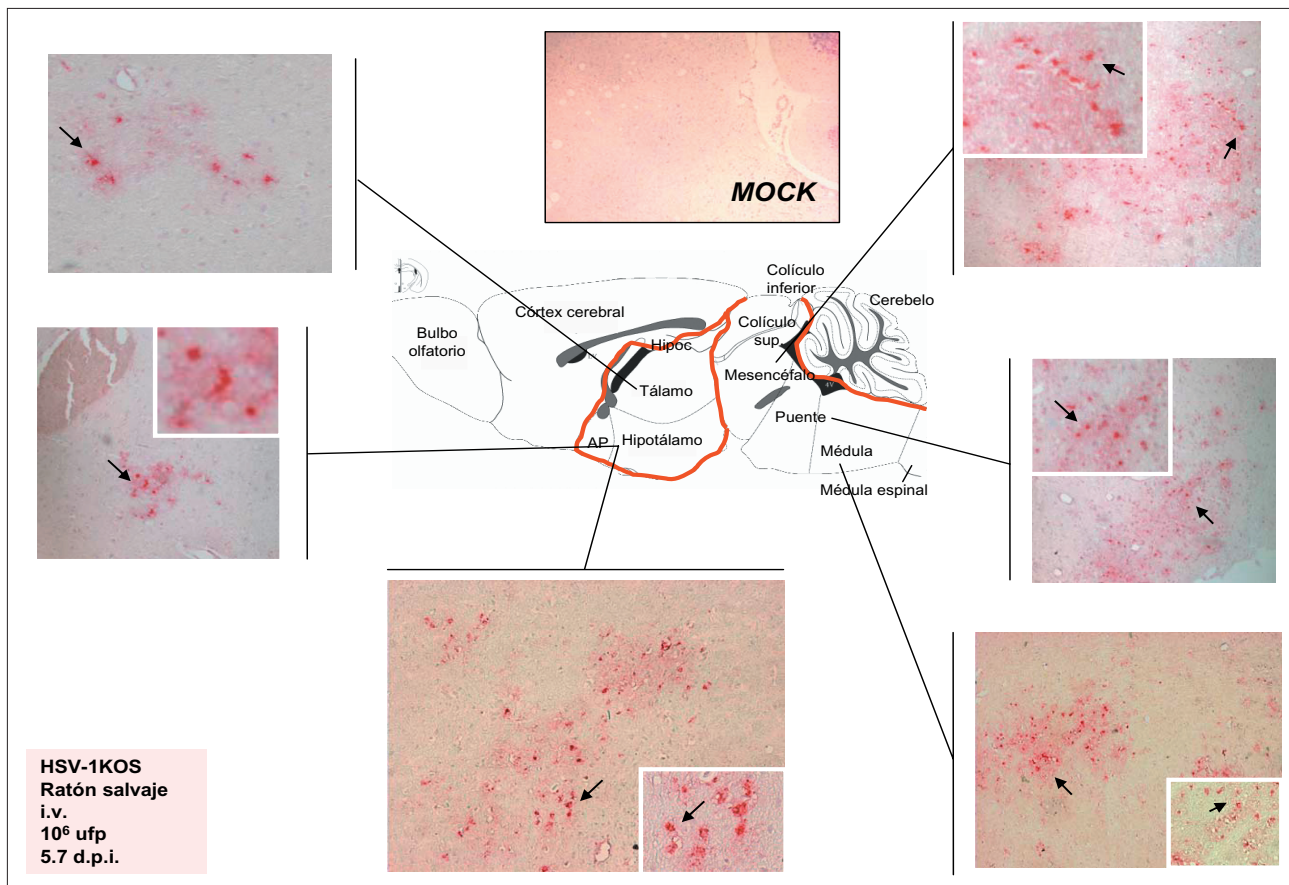


Figura R8. Detección inmunohistoquímica de HSV-1 en las diferentes regiones del encéfalo tras la inoculación intravenosa. Se inocularon 5 ratones por vía intravenosa con 10^6 ufp de HSV-1 KOS y se sacrificaron a 5.7 d.p.i. El virus se detectó mediante el anticuerpo anti-HSV-1. Los insertos muestran una ampliación de la zona de interés (las flechas indican el marcaje celular).

Estos resultados demuestran la mayor eficiencia de la vía intravenosa en la infección por HSV-1 donde se observó una distribución viral predominante en el *mesencéfalo*, pero que prosiguió hasta zonas más profundas del encéfalo, como el tálamo y el hipotálamo. El marcaje negativo en otras zonas del cerebro pudo deberse al menor número de copias alcanzado en esas regiones como ha mostrado el análisis cuantitativo.

4.2.1.4. Estudio comparativo de la infección hematogena de las cepas virales HSV-1 KOS y F

Las distintas cepas de virus presentan comportamientos diferentes como consecuencia de la capacidad replicativa del virus (Sawtell et al., 1998), la ruta de inoculación empleada (Dix et al., 1983) o la evasión del sistema inmune del hospedador (Lewandowski et al., 1993; Neumann et al., 2003) entre otros factores. Se ha descrito que las cepas KOS y F difieren en su virulencia tras la infección neural de ratones BALB/c (Lewandowski et al., 1993). Sin embargo, ambas cepas persisten en el cerebro, si bien los autores postulan que sus diferencias en la virulencia se deben a la interacción del virus con los linfocitos CD4⁺.

En el presente trabajo se ha desarrollado un estudio comparativo tras la inoculación hematogena de las cepas KOS y F. Para ello se inocularon ambos virus por vía intravenosa, puesto que es la vía más eficiente de acceso del virus al sistema nervioso (SN). A 4 d.p.i. el 55% de los ratones inoculados con la cepa KOS presentaron síntomas severos de enfermedad, similares a los descritos en el apartado 4.2.1.1., mientras que los inoculados con la cepa F permanecieron asintomáticos durante todo el estudio. De estos datos se deduce que la cepa KOS es más virulenta que la cepa F tras la infección hematogena.

La figura R9 muestra el estudio comparativo de las cargas virales a 4 d.p.i. tras la infección con ambas cepas virales. Las evidencias clínicas se correlacionaron con la carga viral detectada en los diferentes órganos, puesto que los ratones infectados con KOS presentaron niveles virales significativamente mayores que los inoculados con F en cada uno de los órganos analizados ($p < 0.05$). Esta diferencia es evidente desde la sangre y en los órganos periféricos como el ovario o la glándula adrenal. Las regiones pertenecientes al sistema nervioso como la médula espinal, el encéfalo y los ganglios trigéminos presentaron diferencias más evidentes aún que los órganos periféricos (figura R9, tabla anexa).

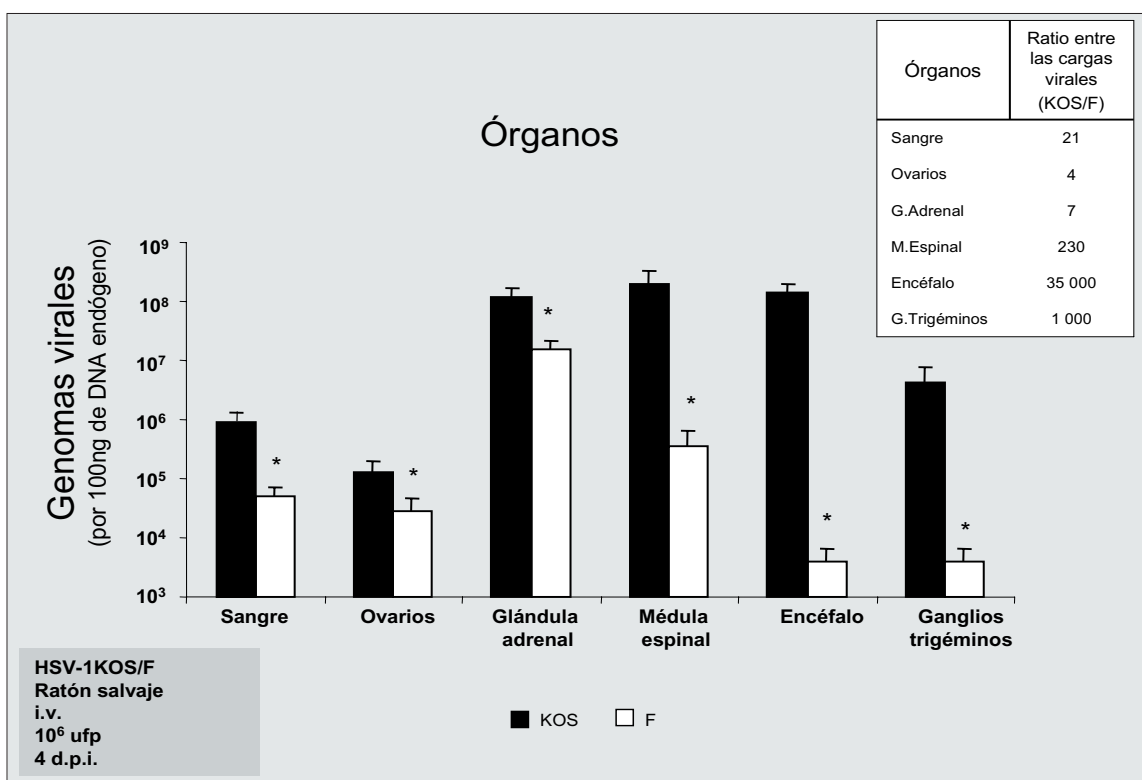


Figura R9. Estudio comparativo de las cepas HSV-1 KOS y F tras la infección hematogena. Las barras representan la media \pm SEM de la cuantificación de DNA viral (expresado como genomas virales y normalizado con respecto a 100 ng de DNA genómico) de los órganos de 10 ratones infectados con 10^6 ufp de HSV-1 KOS (en negro) y 5 ratones infectados con 10^6 ufp de HSV-1 F (en blanco). En ambos casos los ratones fueron inoculados por vía intravenosa y se sacrificaron a 4 d.p.i. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la carga viral obtenida en los diferentes órganos entre ambas cepas ($*p < 0.05$).

El encéfalo fue el órgano donde existió una mayor diferencia en las cargas virales, siendo la cepa KOS más neuroinvasiva que la F. La región principalmente infectada en ambos casos fue el *mesencéfalo* (figura R10), donde en los ratones infectados con KOS la carga viral alcanzó valores significativamente mayores ($p < 0.05$).

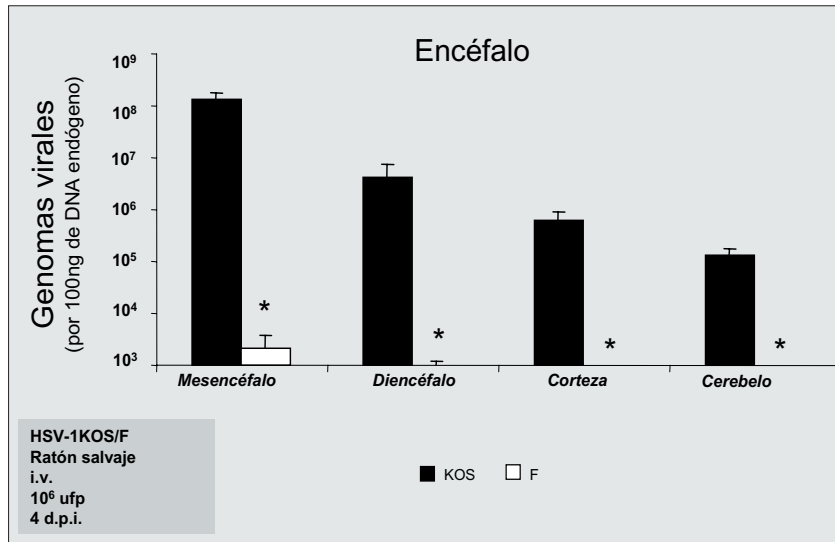


Figura R10. Estudio comparativo de las cepas HSV-1 KOS y F en el encéfalo tras la infección hematogena. Las barras representan la media \pm SEM de la cuantificación de DNA viral (expresado como genomas virales y normalizado con respecto a 100 ng de DNA genómico) de las cuatro regiones del encéfalo de 10 ratones infectados con 10⁶ ufp de HSV-1 KOS (en negro) y 5 ratones infectados con 10⁶ ufp de HSV-1 F (en blanco). En ambos casos los ratones fueron inoculados por vía intravenosa y se sacrificaron a 4 d.p.i. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la carga viral obtenida en las diferentes regiones entre ambas cepas (* $p < 0.05$).

Atendiendo a estos resultados podemos concluir que la cepa HSV-1 KOS es más virulenta que la cepa HSV-1 F tras la infección hematogena, ya que los animales infectados con KOS presentaron síntomas de enfermedad, mientras que los infectados con HSV-1 F permanecieron asintomáticos durante todo el estudio. Asimismo, podemos concluir que la cepa KOS fue mucho más invasiva tras la infección hematogena, puesto que se detectó una mayor carga viral en todos los órganos de los ratones infectados que se hace especialmente evidente en el SN.

4.2.1.5. Cinética del HSV-1 F en la infección hematogena

Los resultados obtenidos en el apartado anterior indican que el virus HSV-1 F sigue una ruta hematogena tras la infección i.v. Este estudio fue ampliado mediante una cinética de infección con esta cepa viral con el objetivo de realizar una comparación con datos previos de nuestro laboratorio donde se ha demostrado la ruta hematogena de la cepa KOS tras la inoculación intraperitoneal (Burgos et al., 2002a; Ramírez, 2006). Además, el análisis de la cinética de la cepa F permitirá establecer los parámetros óptimos de infección que servirán para futuros estudios comparativos con una cepa mutante en el gen Us12 (gen que codifica para la proteína ICP47) generada a partir de la cepa F (Mavromara-Nazos et al., 1986).

Tras la inoculación de los ratones por vía intravenosa se monitorizó la evolución de la infección hasta 10 días post-infección. De nuevo, no se observaron síntomas de enfermedad en los ratones infectados. De este modo comprobamos que la cepa F se presenta como una cepa menos

virulenta que la cepa KOS a lo largo de toda la cinética, como se observó al contrastar estos datos con los obtenidos previamente en el apartado 4.2.1.4. y con datos previos del laboratorio (Burgos et al., 2002a; Ramírez, 2006).

El análisis de la carga viral reveló la presencia del genoma viral en sangre de forma constante a lo largo del tiempo (figura R11), lo que supone una viremia constante que confirma datos previos donde se demostró este mismo comportamiento con la cepa KOS tras la inoculación i.p. (Burgos et al., 2002a; Ramírez, 2006). De igual forma, los ovarios y la glándula adrenal se conforman como órganos diana en la entrada del virus al sistema nervioso (Burgos et al., 2005; Ramírez, 2006). En los ovarios la carga viral presenta un pico a 2 d.p.i., momento en el que empiezan a decaer los niveles virales en este órgano hasta hacerse indetectables a partir del día 6 post-infección. El máximo punto de carga viral en la glándula adrenal corresponde a 3 d.p.i., aunque ya se detecta a 0.8 d.p.i., decayendo posteriormente. Fue en este punto temporal, al disminuir los niveles de DNA viral en glándula adrenal, cuando se aprecia un aumento en la carga de DNA viral en la médula espinal y comienza a detectarse el genoma viral en el encéfalo, lo que indica la entrada masiva del virus al SN. El máximo de carga viral en encéfalo en esta cinética correspondió a 10 d.p.i. Por último la carga viral en los ganglios trigéminos se restringió entre los días 2 y 4 post-infección.

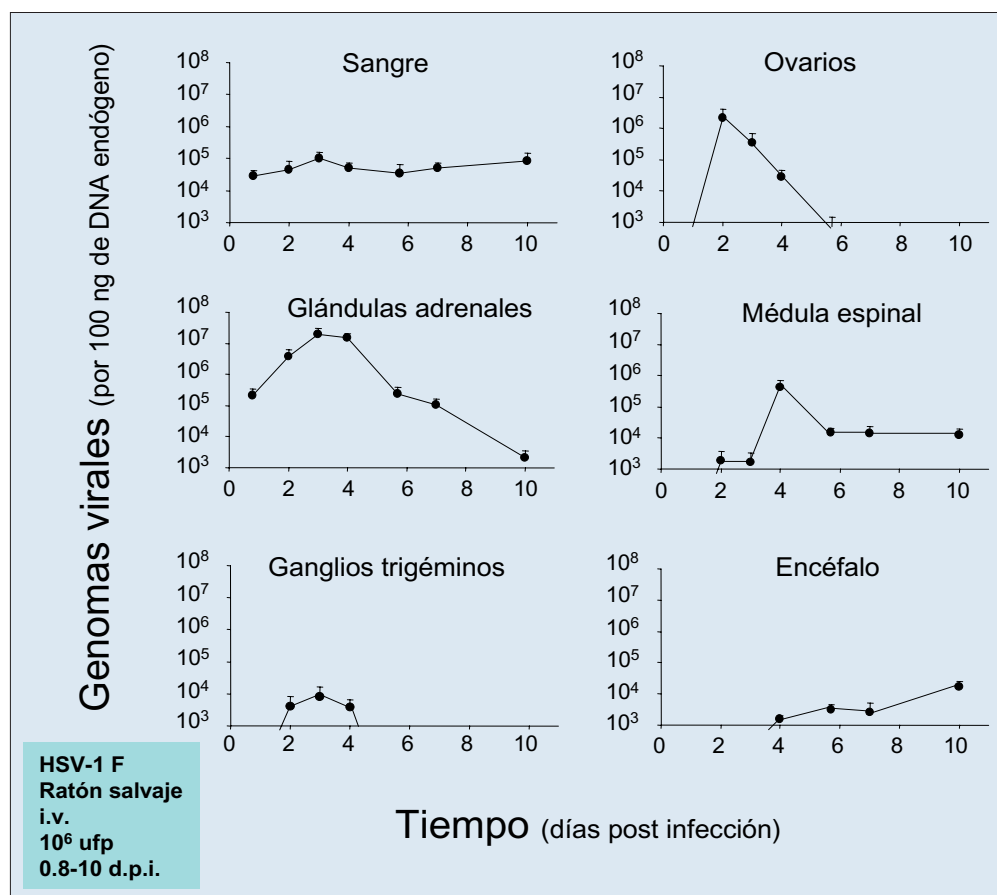


Figura R11. Cinética de la infección hematogena con la cepa HSV-1 F. Se inocularon 35 ratones con 10^6 ufp de HSV-1 F por vía intravenosa. Se sacrificaron y diseccionaron a diferentes puntos temporales (desde 0.8. hasta 10 d.p.i). Las líneas representan la media \pm SEM del número de copias virales (normalizadas por 100 ng de DNA genómico de ratón) detectadas en cada órgano.

A partir de los datos obtenidos en esta cinética de infección, se determinó el punto temporal de 10 d.p.i. para posteriores experimentos de infección aguda con el virus HSV-1 F debido a que es el momento de mayor carga viral en el encéfalo, órgano de especial interés en este trabajo.

Este estudio confirma la menor virulencia de la cepa F, puesto que ha sido llevado a cabo a tiempos más largos que en el análisis comparativo de las dos cepas mostrado en el apartado anterior. Además se ha definido la ruta hematogena seguida por el virus F comprobándose que coincide con la descrita previamente para la cepa KOS (Burgos et al., 2002a; Ramírez, 2006).

4.2.1.6. Curva de dosis de HSV-1 F

Para evaluar la influencia de la dosis de virus inoculada en la eficiencia de la infección del virus HSV-1 F, se llevó a cabo un estudio comparativo con tres dosis de inoculación diferentes: 10^6 , 10^7 y 10^8 ufp.

Los animales fueron sacrificados a 10 d.p.i., punto temporal seleccionado porque presentó la máxima carga viral en el encéfalo. En este punto temporal, todos los animales permanecieron asintomáticos, independientemente de la dosis inoculada, lo que corrobora una vez más la baja neurovirulencia de esta cepa viral.

En la figura R12 se refleja la carga viral detectada en función de la dosis de inoculación. Aquí se puede observar que las tres dosis estudiadas presentaron un mismo patrón de infección independientemente de la dosis inoculada. La sangre presentó la mayor concentración de DNA viral proporcionalmente a la dosis inoculada, seguida por el sistema nervioso: médula espinal, encéfalo y ganglios trigéminos, lo que indica el neurotropismo del HSV-1, y confirma la conexión anatómica y funcional entre la sangre y el SNC (Burgos et al., 2002a; Johnson, 1964).

En un análisis más detallado del cerebro (figura R12), se observó que el *mesencéfalo* fue la región donde se detectó más carga viral, seguido del *diencefalo*, la *corteza* y finalmente el *cerebelo*. El orden de colonización se repitió en las tres dosis, excepto en el caso del *cerebelo* donde el HSV-1 fue detectado únicamente con la mayor de las dosis.

Con la dosis de inoculación de 10^8 ufp, los niveles virales detectados en las tres regiones del SN alcanzaron valores similares, lo que sugiere que se ha alcanzado un punto de saturación en la infección. Por este motivo elegimos la dosis de 10^7 ufp que claramente se encuentra en la fase de infección aguda y que además asegura la colonización del SN.

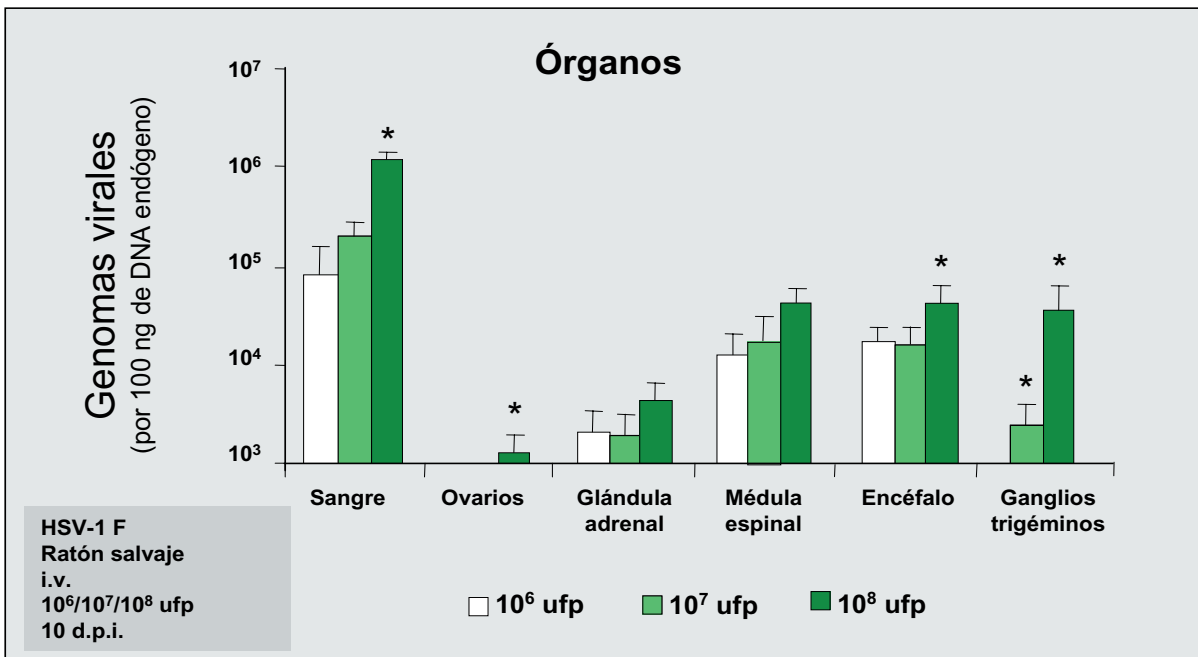
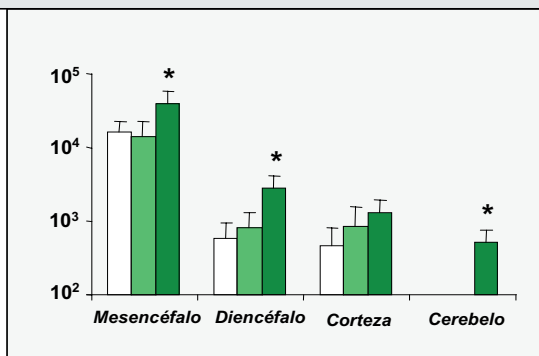


Figura R12. Carga de DNA viral en función de la dosis de inoculación. Las barras representan la media ± SEM del número de copias de virus (normalizado por 100 ng de DNA genómico de ratón) de las regiones de 21 ratones infectados con 10⁶ ufp (en blanco), 10⁷ ufp (en verde claro) y 10⁸ ufp (en verde oscuro) de HSV-1 F. Los ratones fueron inoculados por vía intravenosa y sacrificados y diseccionados a 10 d.p.i. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la carga viral obtenida en los diferentes órganos con respecto a la condición de 10⁶ ufp (*p<0.05). En el recuadro inferior se presentan las cuatro regiones del encéfalo analizadas.



Los resultados obtenidos en este estudio muestran a la cepa F como menos neurovirulenta que la cepa KOS. Esta característica se correlaciona con la baja neuroinvasividad demostrada por la cepa F, que en ningún momento alcanzó los niveles de carga viral detectados en el encéfalo de ratones infectados con KOS, ni siquiera con la dosis de inoculación más alta de virus F, donde a pesar de alcanzarse mayores cargas virales en sangre que en la infección con KOS, la colonización del SN fue mucho menor (comparación de las figuras R9 y R12).

La comparación de los datos obtenidos en la cinética de infección con datos previos del laboratorio, demuestra que ambas cepas siguen la misma ruta hematogena de infección, donde cabe destacar la conexión entre la sangre y el SN y la conformación de los ovarios y la glándula adrenal como órganos diana para el acceso del virus al SN tras la inoculación hematogena de cualquiera de las dos cepas.

4.2.2. Estudio de la ruta neural de infección del HSV-1

La ruta neural está aceptada como el modo de infección más común para el HSV-1. Esta ruta de infección da lugar a fiebres frías como consecuencia de la reactivación del virus en el lugar

de primoinfección (Whitley, 1996). Como aproximación experimental, se han descrito varias vías de inoculación que mimetizan la infección neural en el modelo murino donde el acceso del virus se produce a través del nervio trigémino (Davis y Johnson, 1979) que se puede alcanzar mediante una herida en el morro del animal (por *abrasión del morro*) (Sawtell y Thompson, 1992a) por donde el virus infecta la rama mandibular del nervio trigémino (Esiri y Tomlinson, 1984; Johnson, 1998; Roizman, 1990), o mediante la infección a través del sistema olfativo y de la rama maxilar del nervio trigémino, mediante la inoculación *intranasal* (Barnett et al., 1993; Tomlinson y Esiri, 1983).

4.2.2.1. Progresión de la enfermedad en la infección neural

Con el objetivo de monitorizar y analizar la progresión de la infección neural, realizamos un estudio comparativo entre ratones infectados por vía intranasal (i.n.) y por abrasión del morro (a.m.). Como control se incluyeron ratones *MOCK* inoculados con solución salina. Tras la infección, los animales fueron observados durante 10 días (figura R13). Mientras que los animales *MOCK* no presentaron síntomas de enfermedad, los ratones afectados por la infección, independientemente de la vía de inoculación utilizada, presentaron en primer lugar encefalitis en la zona frontal de la cabeza, con queratitis oculares ocasionales. Eventualmente, la enfermedad cursó con escoliosis, parálisis y finalmente la muerte del animal, aunque en la mayoría de los casos este cuadro agudo remitió y los animales se recuperaron.

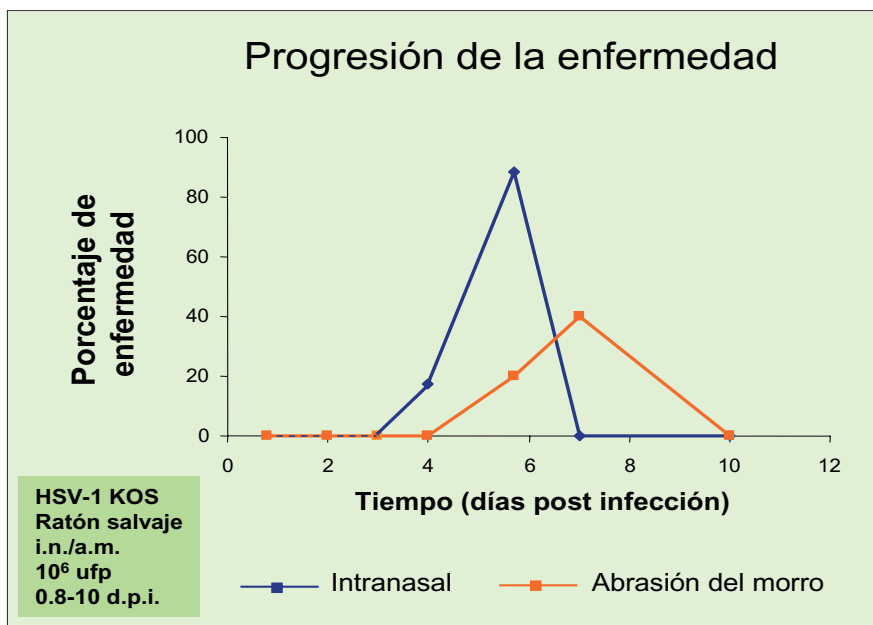


Figura R13. Progresión de la enfermedad en animales infectados por la ruta neural mediante dos vías de inoculación. Las líneas muestran el porcentaje de animales enfermos con respecto al tiempo en ratones inoculados por vía intranasal (línea azul) e inoculados por abrasión del morro (línea naranja) con 10⁶ ufp de HSV-1 KOS.

El curso de la enfermedad en las dos vías de inoculación siguió perfiles de enfermedad similares (figura R13). A 4 d.p.i. alrededor del 20% de los ratones infectados por vía i.n. presentaron síntomas de enfermedad, alcanzando un máximo de un 90% a día 5.7 post-infección. En los ratones infectados por a.m. la aparición de los síntomas clínicos siguió un curso más lento puesto que hasta

5.7 d.p.i. no se observaron animales enfermos (20% de los animales), alcanzándose un pico de un 40% de enfermedad a 7 d.p.i.

Según lo observado en este estudio, la vía de inoculación intranasal resulta más eficiente que la de abrasión del morro, puesto que hay un adelantamiento de la sintomatología y un mayor porcentaje de animales afectados por la infección.

4.2.2.2. Estudio de la ruta neural en la fase de infección aguda

Tras el análisis de la progresión de la enfermedad, se realizó un estudio comparativo de la carga de DNA viral similar al llevado a cabo para la ruta hematógena. Para ello, se compararon las dos vías de inoculación neurales a 4 y 5.7 d.p.i., puntos temporales fijados previamente para el estudio de la fase aguda de la infección hematógena y que se eligieron aquí con objeto de comparar las dos rutas de infección en las mismas condiciones experimentales. Además, el punto temporal de 5.7 d.p.i. es especialmente interesante puesto que presentó un porcentaje de enfermedad significativamente diferente en ambas vías de inoculación. Adicionalmente, se realizó un estudio comparativo en la fase de latencia de la infección neural a 37 d.p.i., tiempo suficiente para el establecimiento de la latencia del HSV-1 (Roizman, 1996; Roizman y Sears, 1987), con el objetivo de comparar la ruta neural con la hematógena, estudio que fue desarrollado previamente en nuestro laboratorio tras la inoculación intraperitoneal (Burgos et al., 2006b; Ramírez, 2006).

4.2.2.2.1. Efecto de la vía de inoculación en la cuantificación de la carga viral a 4 d.p.i.

El análisis de la carga viral en este punto temporal mostró que los ganglios trigéminos y el encéfalo fueron los órganos que presentaron una mayor carga viral en las dos vías de inoculación, revelando valores muy similares independientemente de la vía seleccionada.

En la inoculación intranasal, el virus alcanzó la médula espinal y el ovario, mientras que en la de abrasión del morro se detectó el genoma viral en la glándula adrenal. En ambos casos el virus alcanzó el torrente sanguíneo donde se detectó una carga viral similar. Los niveles virales de los órganos periféricos fueron mucho menores que en el SN, debido al neurotropismo del HSV-1, aunque el virus acaba alcanzando el torrente sanguíneo a través de la glándula adrenal o de los ovarios, que de nuevo se conforman como órganos diana para la distribución del virus desde el SN hasta la sangre.

El análisis del encéfalo dividido en las cuatro regiones habituales (figura R15) reveló que la región con mayor carga viral fue el *mesencéfalo* independientemente de la vía de inoculación utilizada. El desarrollo de la infección en las dos vías presentó diferencias significativas en la distribución viral en el encéfalo, puesto que en la vía de abrasión del morro, la carga viral en el *diencefalo* fue

mayor que en la *corteza*, mientras que en la vía intranasal la *corteza* y el *diencéfalo* no presentaron diferencias significativas. El *cerebelo* fue la región menos infectada en las dos vías lo que indica que es la última región alcanzada en el proceso de colonización.

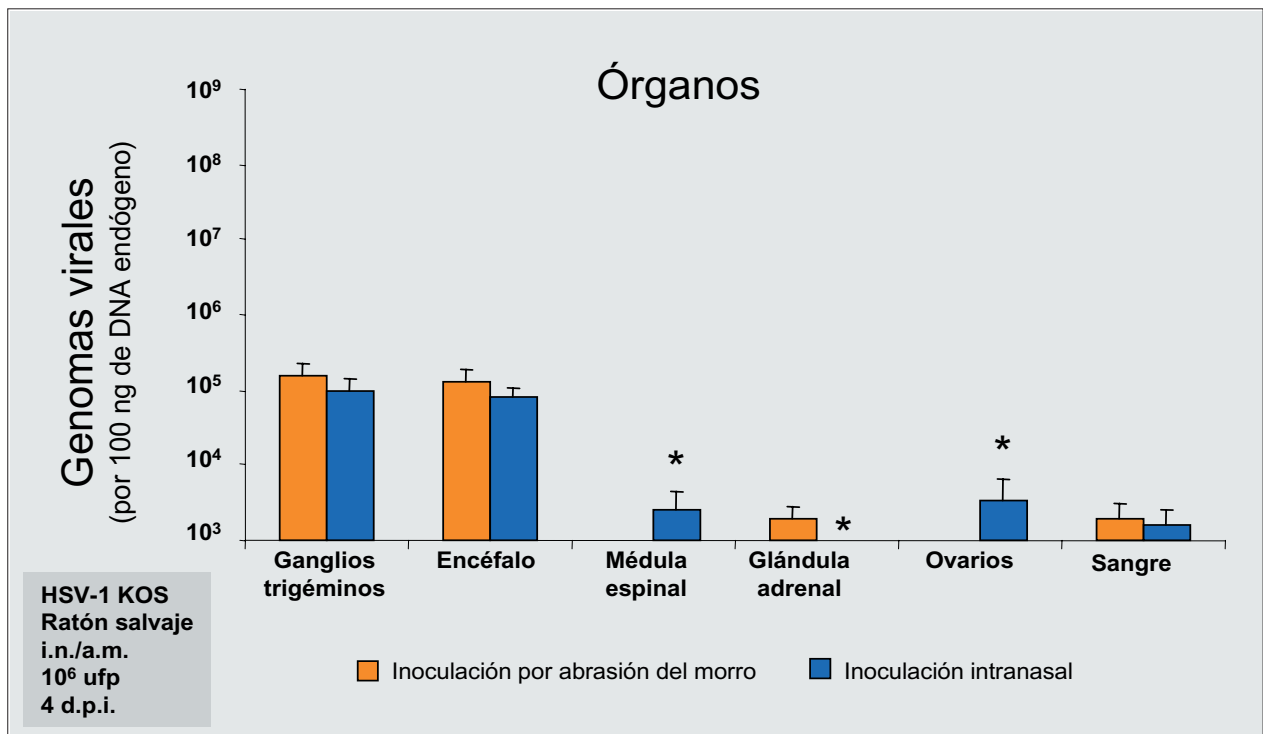


Figura R14. Estudio comparativo de la vía de inoculación mediante cuantificación del DNA viral en la ruta de infección neural a 4 d.p.i. Las barras representan la media ± SEM del número de copias virales (normalizado por 100 ng de DNA genómico de ratón). Se infectaron 33 ratones por abrasión del morro (en naranja) y por vía intranasal (en azul). En ambos casos se inocularon con 10⁶ ufp de HSV-1 KOS y se sacrificaron a 4 d.p.i. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la carga viral entre ambas vías de inoculación obtenida en los diferentes órganos (* p<0.005).

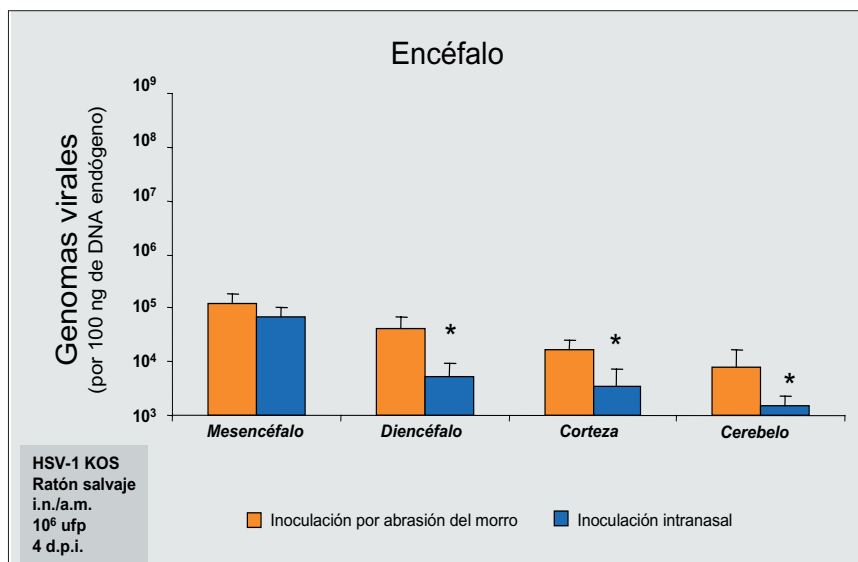


Figura R15. Estudio comparativo de la vía de inoculación en el encéfalo mediante cuantificación del DNA viral en la ruta de infección neural a 4 d.p.i. Las barras representan la media ± SEM del número de copias virales (normalizado por 100 ng de DNA genómico de ratón). Se infectaron 33 ratones por abrasión del morro (en naranja) y por vía intranasal (en azul). En ambos casos se inocularon con 10⁶ ufp de HSV-1 KOS y se sacrificaron a 4 d.p.i. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la carga viral entre ambas vías de inoculación obtenida en los diferentes órganos (* p<0.005).

Estos resultados sugieren que en la ruta neural el virus, independientemente de la vía de inoculación, infecta principal e inicialmente al sistema nervioso, debido al neurotropismo del HSV-1. No obstante, en el punto final de la infección acaba alcanzando el torrente sanguíneo a través de órganos periféricos como la glándula adrenal o el ovario, lo que de nuevo confirma la conexión anatómica entre el SN y la sangre. La infección preferencial de los ganglios trigéminos y del *mesencéfalo*, independientemente de la vía de inoculación, indicó que estas regiones son comunes en el acceso del virus por ambas vías, lo que se corresponde con la conexión anatómica del nervio trigémino con el ganglio y de éste con la región *mesencefálica*. No obstante, estas dos vías neurales presentan diferencias en el patrón de distribución en otras regiones más profundas del encéfalo, lo que sugiere que existen diferencias en la neuroinvasión de las regiones distales. Estudios previos han descrito que tras la inoculación intranasal el virus accede al SNC a través de los bulbos olfatorios (Tomlinson y Esiri, 1983), que en la disección del encéfalo llevada a cabo en este estudio se encuentran englobados en la *corteza*, lo que explicaría la equivalencia en las cargas virales entre el *diencéfalo* y esta región. Esta entrada del virus al SNC es complementaria al acceso por el nervio trigémino que conduce al virus a la región *mesencefálica*.

4.2.2.2. Efecto de la vía de inoculación en la cuantificación de la carga viral a 5.7 d.p.i.

El análisis de la carga viral a 5.7 d.p.i. mostró que, al igual que en el punto temporal anterior, los ganglios trigéminos y el encéfalo fueron las regiones con mayor nivel viral (figura R16), lo que indica de nuevo el neurotropismo viral y además confirma la ruta de invasión neural. Sin embargo, se observó un aumento significativo ($p < 0.005$) de la carga viral en el encéfalo de los ratones infectados por vía intranasal en relación al pico de enfermedad en este grupo de ratones inoculados por a.m. (ver figura R13) y a la disminución de los niveles de virus en los ganglios trigéminos.

En la médula espinal se produjo un incremento de DNA viral en los ratones inoculados mediante la vía intranasal. Este aumento se correlacionó con la aparición del virus en la glándula adrenal, que presentó unos niveles virales significativamente mayores que en los ratones inoculados por abrasión del morro ($p < 0.05$) y con una mayor presencia de DNA viral en la sangre de los ratones inoculados por vía intranasal.

Todos estos resultados indican que la ruta de colonización del virus tras la infección neural sigue una secuencia desde los ganglios trigéminos hasta el encéfalo, la médula espinal, la glándula adrenal y finalmente llega al torrente sanguíneo.

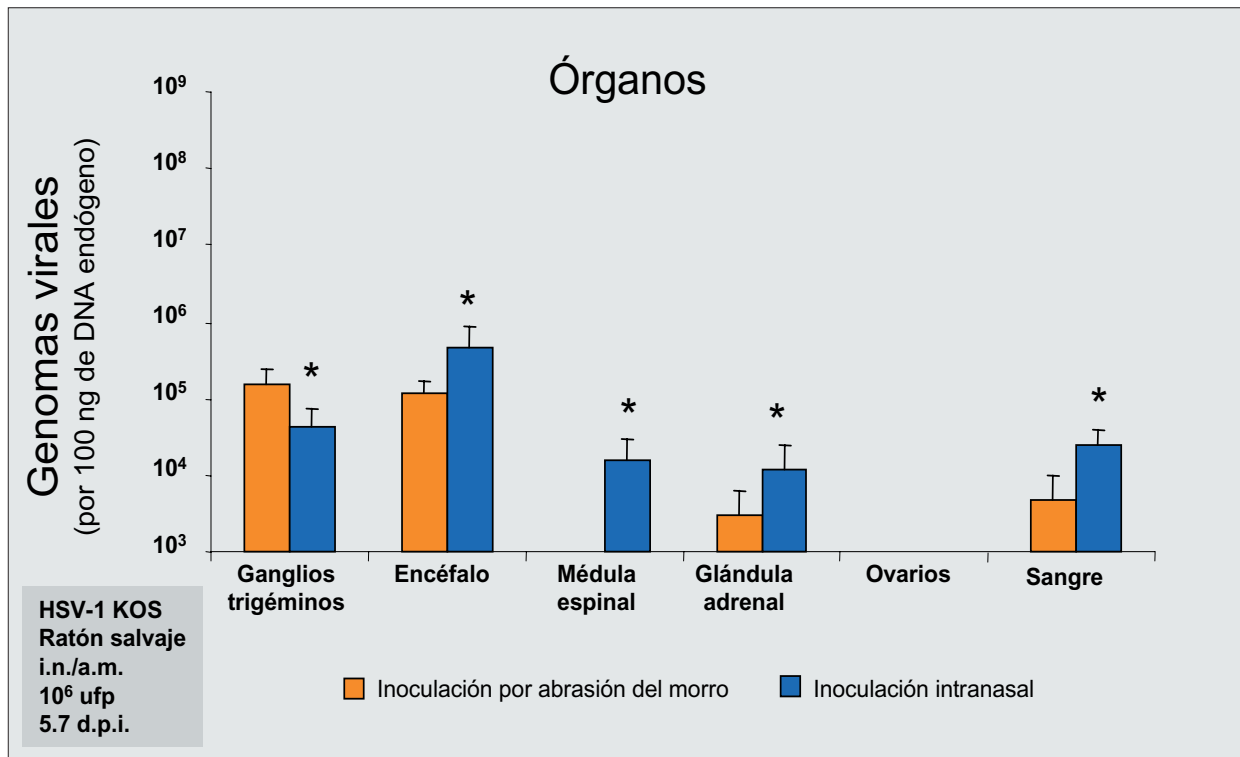


Figura R16. Estudio comparativo de la vía de inoculación mediante cuantificación del DNA viral en la ruta de infección neural a 5.7 d.p.i. Las barras representan la media ± SEM del número de copias virales (normalizado por 100 ng de DNA genómico de ratón). Se infectaron 19 ratones por abrasión del morro (en naranja) y por vía intranasal (en azul). En ambos casos se inocularon con 10⁶ ufp de HSV-1 KOS y se sacrificaron a 5.7 d.p.i. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la carga viral obtenida en los diferentes órganos (* p<0.05).

Los resultados obtenidos en este punto temporal sugieren que la vía intranasal es más eficiente en la invasión del virus puesto que se alcanzaron mayores cargas virales en el sistema nervioso y en la sangre, lo que se correlaciona con un mayor porcentaje de animales enfermos con respecto a los infectados por abrasión del morro (p<0.05).

En la figura R17 se muestra una representación de la cuantificación del DNA viral en el encéfalo. Aquí se observa que a 5.7 d.p.i. la región con mayor carga viral fue el *mesencéfalo* independientemente de la vía de inoculación utilizada, siendo en la vía intranasal donde se alcanzaron mayores niveles virales. En la vía de abrasión del morro la carga viral del *diencefalo* disminuyó significativamente con respecto a 4 d.p.i. mientras que en la *corteza* sus valores aumentaron, lo que indica que el virus sigue una ruta de colonización desde el *mesencéfalo* a través del *diencefalo* hasta la *corteza*. En la vía intranasal, se produjo un incremento de la carga viral en todas las regiones analizadas con respecto al punto temporal anterior.

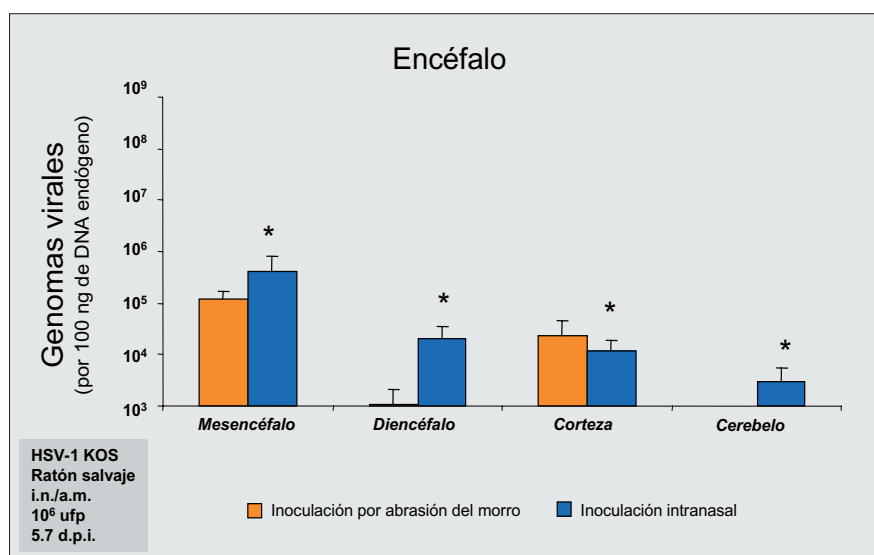


Figura R17. Estudio comparativo de la vía de inoculación en el encéfalo mediante cuantificación del DNA viral en la ruta de infección neural a 5.7 d.p.i. Las barras representan la media \pm SEM del número de copias virales (normalizado por 100 ng de DNA genómico de ratón). Se infectaron 19 ratones por abrasión del morro (en naranja) y por vía intranasal (en azul). En ambos casos se inocularon con 10^6 ufp de HSV-1 KOS y se sacrificaron a 5.7 d.p.i. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la carga viral entre ambas vías de inoculación obtenida en los diferentes órganos (* $p < 0.05$).

El análisis comparativo de la distribución del virus tras las dos vías de inoculación sugiere que en la vía de abrasión el acceso del virus al encéfalo se produce mayoritariamente a través del *mesencéfalo*, desde donde el virus accede al *diencéfalo* y desde aquí a la *corteza*. Sin embargo en la vía intranasal se observó una distribución diferencial probablemente debida al acceso del virus a través de los bulbos olfatorios y del *mesencéfalo* (Johnson, 1998; Tomlinson y Esiri, 1983). Este estudio comparativo sugiere que las dos vías neurales presentan una infección preferente del sistema nervioso, donde las regiones que presentan mayor carga viral son los ganglios trigéminos y el *mesencéfalo*.

El análisis de las cargas virales indica que tras la infección neural, independientemente de la vía de inoculación, el virus sigue una ruta de colonización donde alcanza en primer lugar el ganglio trigémino, desde donde accede al cerebro a través del *mesencéfalo*, lo que permite su distribución a zonas más profundas del encéfalo como el *diencéfalo*, la *corteza* y el *cerebelo*. Tras la inoculación intranasal el virus adicionalmente accede al SNC además a través de los bulbos olfatorios desde donde alcanza igualmente otras regiones de la *corteza*, el *diencéfalo* y el *cerebelo*. Seguidamente, el virus llega al torrente sanguíneo a través de órganos periféricos como el ovario y la glándula adrenal que permiten su acceso a través de las conexiones anatómicas de estos órganos con la médula espinal (Gerendai y Halasz, 2000; Hill et al., 1986).

Por último, los datos obtenidos en la comparación de las cargas virales reveló que los ratones infectados por vía intranasal presentan mayores niveles virales en los órganos analizados, que junto con la aceleración en los síntomas clínicos presentados, sugieren que esta vía intranasal es más eficiente que la de abrasión del morro.

4.2.2.2.3. Estudio inmunohistoquímico de la infección neural en el cerebro

Una vez realizado el análisis cuantitativo de la carga de DNA viral en ambas rutas, se llevaron a cabo estudios inmunohistoquímicos en cortes de cerebro para detectar la presencia de antígenos virales en la fase aguda tras la infección neural. Del mismo modo que en el apartado 4.2.1.3., se realizó una exploración del virus en cortes sagitales seriados de cerebro de ratones infectados por ambas vías neurales utilizando el anticuerpo anti-HSV-1 (tabla MM1) (figura R18).

En esta fase de la infección se detectaron antígenos virales en los cerebros de animales infectados por vía intranasal. Este marcaje se restringió a la región del *mesencéfalo*, concretamente al tallo cerebral y siempre en aquellos animales que presentaron encefalitis. De nuevo, los resultados muestran que los datos obtenidos en el análisis cuantitativo de la carga viral (apartado 4.2.2.2.) se correlacionan con el análisis inmunohistoquímico, donde sólo en el caso de la infección intranasal detectamos el virus en la región que correlativamente presenta una mayor cantidad de DNA viral.

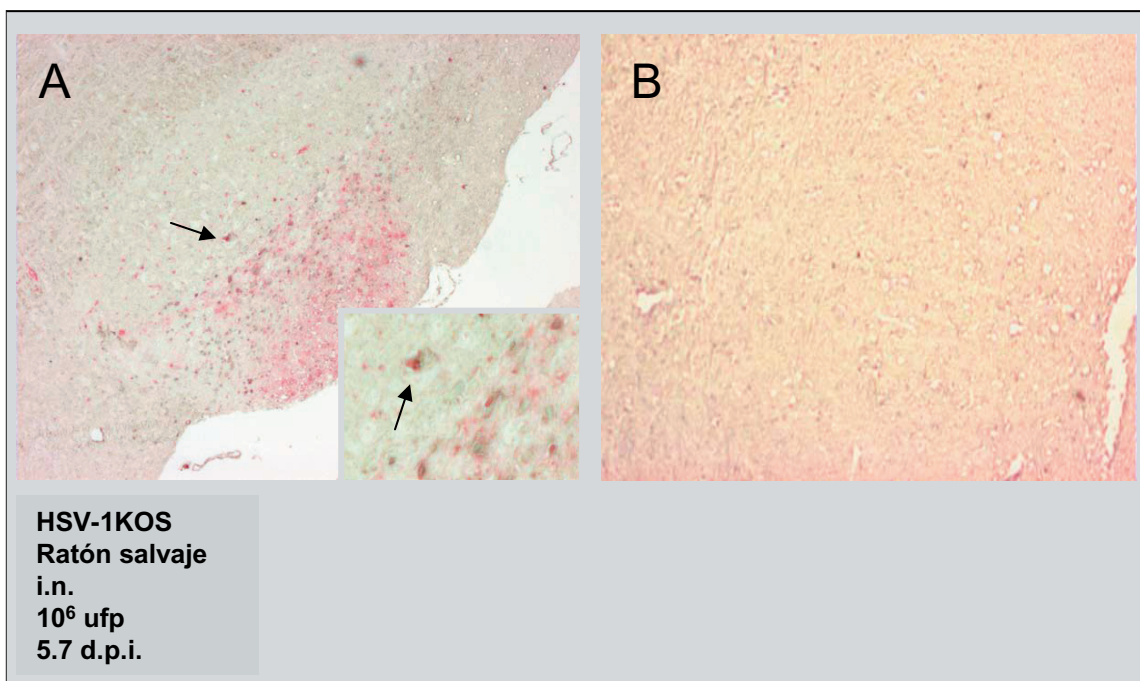


Figura R18. Detección inmunohistoquímica de HSV-1 en el encéfalo tras la inoculación intranasal. Se inocularon 5 ratones por vía intranasal con 10⁶ ufp de HSV-1 KOS y se sacrificaron a 5.7 d.p.i. En A, se muestra el marcaje detectado con el anticuerpo anti-HSV-1 en el tallo cerebral. En B, se muestra una micrografía de la misma región que en A de un ratón *MOCK* representativo. (las flechas indican el marcaje celular).

4.2.2.3. Estudio de la ruta neural en la fase de latencia

Tras la fase de infección aguda, el HSV-1 entra en fase de latencia aproximadamente 21 días después de la inoculación (Roizman, 1990; Roizman y Sears, 1987). Se ha demostrado que los ganglios trigéminos constituyen una de las regiones preferenciales del virus para el establecimiento de la latencia (Decman et al., 2005; Miller et al., 1998; Roizman, 1990). En el presente estudio, se analizaron ratones infectados por vía neural a 37 días post-infección, tiempo suficiente para asegurar la presencia del virus en forma latente. Además de los ganglios trigéminos, se incluyeron en el estudio el resto de órganos analizados en la infección aguda.

En la fase de latencia se observó una tendencia muy similar en las cargas virales analizadas en las dos vías neurales. En ambos casos la detección viral quedó restringida a los ganglios trigéminos y al encéfalo, mientras que la sangre presentó cantidades residuales de genoma viral (figura R19). Los niveles de carga viral en los ganglios trigéminos y en el encéfalo disminuyeron significativamente con respecto a los detectados en la fase aguda de la infección. Esta disminución fue más acusada en los ganglios trigéminos que en el encéfalo, donde las cargas virales variaron en más dos órdenes de magnitud frente a la detectada en la fase aguda (figura R19, tabla anexa).

La presencia del DNA viral en sangre durante la latencia podría deberse a reactivaciones puntuales procedentes del ganglio trigémino como se ha sugerido previamente, puesto que ambas regiones presentan tendencias paralelas en la carga viral durante los diferentes procesos de infección (Burgos et al., 2005; Ramírez, 2006).

En la figura R19 se muestra un análisis pormenorizado del encéfalo, donde se observó que el *mesencéfalo* fue la región con mayor carga viral independientemente de la vía de inoculación, mientras que no se detectó DNA viral en ninguna otra región, excepto en la *corteza* de ratones infectados latentemente por abrasión del morro alcanzando menores niveles de virus.

Los resultados obtenidos en este estudio revelaron un comportamiento similar de las dos vías de infección neural durante la fase de latencia. Además, muestran a los ganglios trigéminos y a la región *mesencefálica* como regiones preferentes para el establecimiento de la latencia, independientemente de la vía utilizada. Estos resultados concuerdan con varios trabajos publicados previamente, donde se demuestra la presencia del virus latente en los ganglios trigéminos y en el tallo cerebral de ratones infectados por vía neural (Cabrera et al., 1980; Chen et al., 2006; Lewandowski et al., 2002; Sequiera et al., 1979). Por último, los datos obtenidos muestran la presencia del virus en la sangre de los ratones infectados por ambas vías neurales, que se ha propuesto que procede de reactivaciones puntuales

desde el ganglio trigémino (Burgos et al., 2005). Esta viremia podría explicar la alta seroprevalencia del HSV-1 en la población como consecuencia de la infección neural.

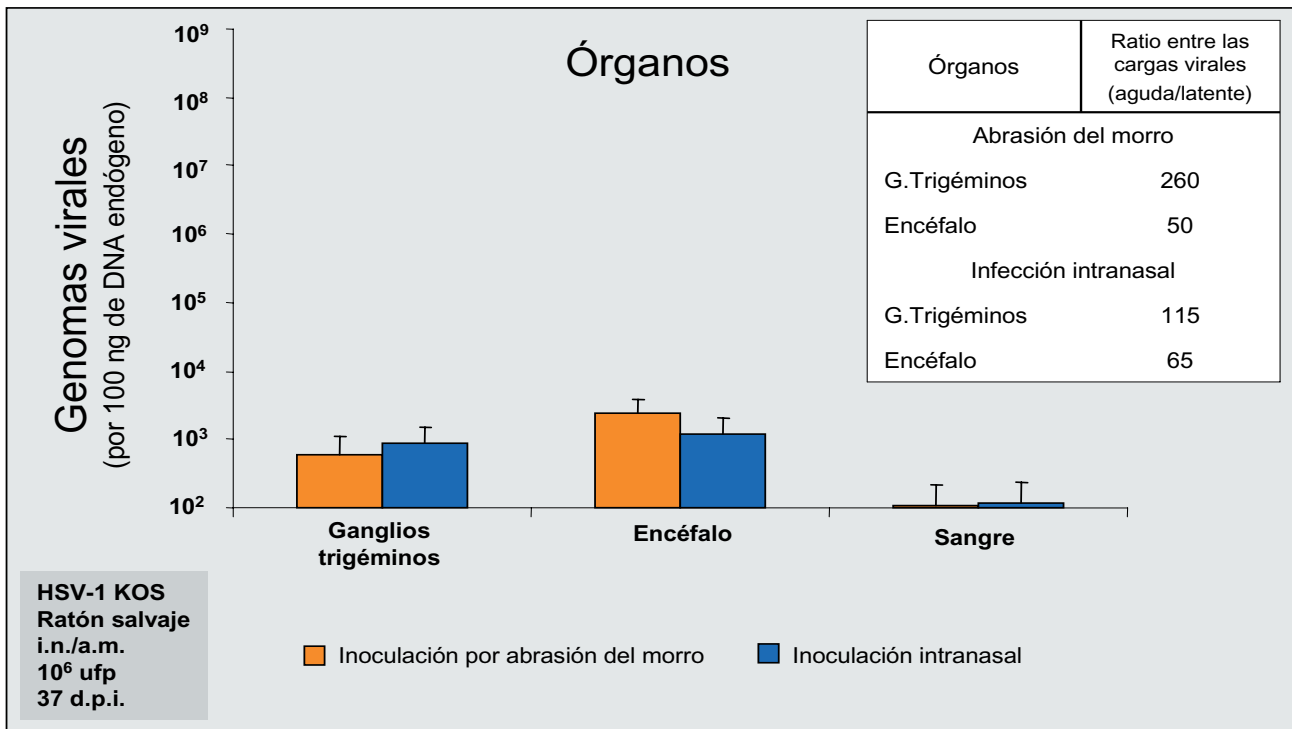
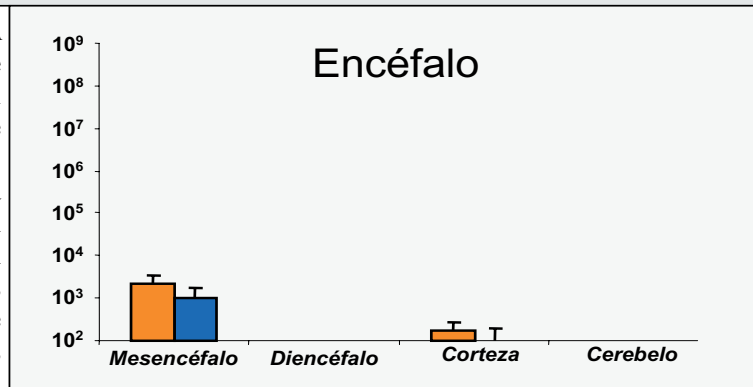


Figura R19. Cuantificación de la carga de DNA viral en la ruta de infección neural en la fase de latencia. Las barras representan la media \pm SEM del número de copias virales (normalizado por 100 ng de DNA genómico de ratón). Se infectaron en total 13 ratones, por abrasión del morro (en naranja) y por vía intranasal (en azul). En ambos casos se infectaron con 10^6 ufp de HSV-1 KOS y se sacrificaron a 37 d.p.i. En el recuadro inferior se presentan las cuatro regiones del encéfalo analizadas. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la carga viral obtenida en en las dos condiciones ($p < 0.005$).



4.2.2.4. Efecto de la dosis de HSV-1 KOS en la infección neural

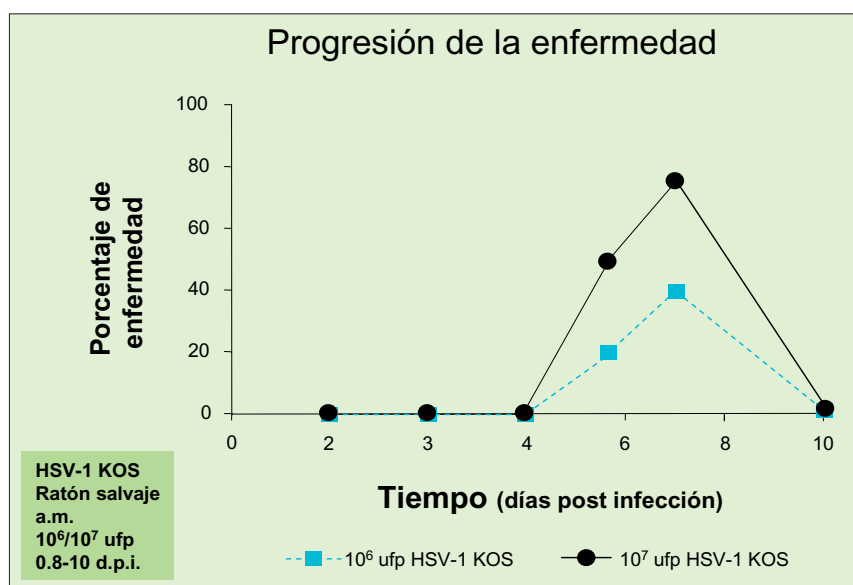
Tras el análisis realizado sobre la ruta neural de infección se seleccionó la vía de abrasión del morro para posteriores estudios. Esta vía resulta ser más interesante ya que mimetiza el proceso de infección primaria más común en humanos, donde la primoinfección a través de la mucosa facial provoca fiebres frías o calenturas (Johnson, 1998; Roizman, 1990).

Una vez seleccionada la vía de inoculación, se realizó un estudio del efecto de la dosis en la infección aguda. Para ello se utilizó el virus HSV-1 KOS con dos dosis de inoculación, 10^6 y 10^7 ufp.

En primer lugar, se comparó la progresión de la enfermedad en los dos grupos de ratones infectados con ambas dosis de virus (10^6 y 10^7 ufp). En los dos casos la sintomatología fue idéntica

a la descrita en el apartado 4.2.2.1., sin embargo, los animales infectados con 10^7 ufp presentaron un mayor porcentaje de enfermedad con respecto a los infectados con 10^6 ufp (figura R20) si bien su aparición siguió un curso temporal similar. A 5.7 d.p.i. se observaron los primeros síntomas de encefalitis en los animales afectados, independientemente de la dosis inoculada. Con 10^7 ufp se obtuvo un porcentaje de encefalitis de más de un 50%, mientras que en los infectados con 10^6 ufp se vieron afectados solamente el 20% de los animales. A 7 d.p.i., el porcentaje de enfermedad aumentó en ambos casos donde alcanzó un 75% en los ratones inoculados con 10^7 ufp, mientras que con la dosis menor se vieron afectados tan solo un 40% de los animales.

Figura R20. Efecto de la dosis de inoculación en la progresión de la enfermedad en la ruta neural. Las líneas muestran el porcentaje de animales enfermos a lo largo del tiempo de 30 ratones inoculados por abrasión del morro con 10^6 ufp (en azul) y 30 ratones inoculados con 10^7 ufp de HSV-1 KOS (en negro).



De estos resultados se deduce que el porcentaje de enfermedad es dependiente de la dosis de inoculación. La dosis de 10^7 ufp produjo mayores niveles de enfermedad si bien el curso temporal de la enfermedad fue similar, observándose la aparición de los primeros síntomas a 5.7 d.p.i. En ambos casos los síntomas remitieron a partir de 7 d.p.i.

4.2.2.4.1. Cinética de HSV-1 KOS con la dosis de 10^6 ufp

Tras el análisis de la sintomatología, se realizó una cinética de infección con ambas dosis de inoculación con objeto de comprobar su influencia en la distribución viral y en la carga viral alcanzada en el SN y en otros órganos que han demostrado un papel fundamental en la infección del HSV-1.

En la figura R21 se muestra la cinética de infección con la dosis de 10^6 ufp, donde se observó que a lo largo de todo el estudio, los órganos que presentaron mayores niveles virales fueron de nuevo los ganglios trigéminos y el encéfalo, lo que concuerda con resultados anteriores. Estas dos regiones mostraron un comportamiento similar, tanto en los niveles de virus detectados como en la progresión de la infección, donde se observó un acusado incremento de la carga viral hasta día 4 post-infección, que corresponde al punto máximo de carga viral alcanzado. A partir de este momento los niveles virales disminuyeron progresivamente hasta 10 d.p.i. En la médula espinal se observó un aumento de la carga viral con un máximo de detección a día 3 post-infección, si bien los niveles virales fueron considerablemente inferiores. La disminución de los niveles de virus en los ganglios trigéminos y en el encéfalo coincidió con la aparición de niveles de virus detectables en la glándula adrenal a 4 d.p.i., presentando un máximo de infección a 5.7 d.p.i. Por último, se detectó el DNA viral en sangre de forma constante desde 2 d.p.i. hasta 5.7 d.p.i., lo que indica una viremia estable. En este punto temporal la carga viral en sangre fue máxima, coincidiendo con un aumento de la carga viral en la glándula adrenal, que indica la salida del virus del SN hacia la sangre a través de este órgano periférico.

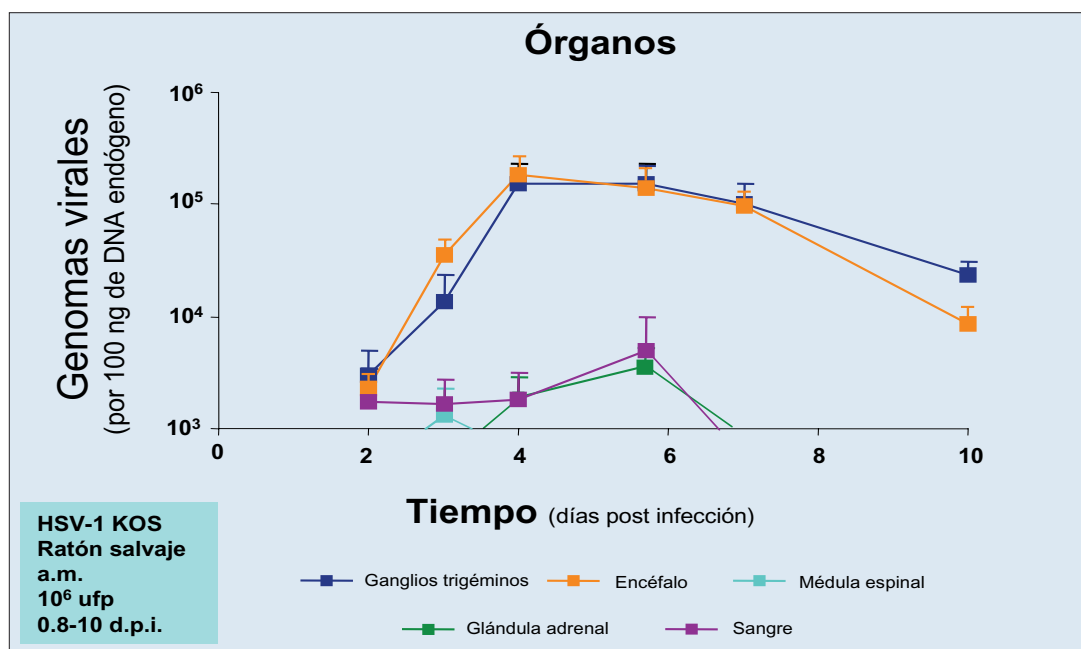


Figura R21. Cinética de la infección neural con 10^6 ufp de HSV-1 KOS. Se inocularon 88 ratones con 10^6 ufp de HSV-1 KOS por abrasión del morro. Las líneas representan la media \pm SEM del número de copias de virus (normalizado por 100 ng de DNA genómico de ratón) en los órganos analizados.

Los resultados de la cinética de 10^6 ufp sugieren un orden de invasión determinado donde el virus coloniza a tiempos tempranos los ganglios trigéminos y el encéfalo desde donde alcanza la glándula adrenal y la sangre a través de la médula espinal. La presencia del virus en sangre

puede deberse a una contaminación de esta vía neural con una vía hematológica en el momento de la inoculación debido a las heridas originadas en la abrasión. No obstante, la coincidencia temporal del aumento de la carga viral en sangre a 5.7 d.p.i. con la disminución del virus en el encéfalo y en los ganglios trigéminos y con el aumento en la glándula adrenal, sugiere que el virus recorre un camino inverso al descrito para la vía de infección hematológica desde el SN hasta la sangre. La viremia observada en la ruta neural podría explicar de los datos epidemiológicos donde se demuestra la alta seroprevalencia del HSV-1 en la población (Whitley y Grann, 1993) que podría explicarse mediante la llegada del virus al torrente sanguíneo tras su reactivación desde los ganglios trigéminos y el encéfalo.

4.2.2.4.2. Cinética de HSV-1 KOS con la dosis de 10^7 ufp

De manera similar al apartado anterior, se llevó a cabo una cinética de infección con 10^7 ufp de virus tras la inoculación por abrasión del morro. Con esta dosis se obtuvo un mayor porcentaje de enfermedad que podría verse reflejado en la distribución y en la carga viral de los órganos infectados.

El análisis de la carga viral tras la infección con 10^7 ufp mostró, de nuevo, una infección preferencial de los ganglios trigéminos y del encéfalo (figura R22). Los ganglios trigéminos presentaron una carga viral significativamente mayor que el encéfalo ($p < 0.05$), sugiriendo que tras la inoculación el virus alcanza en primer lugar a los ganglios trigéminos y posteriormente el encéfalo. Ambas regiones presentaron un comportamiento similar en el proceso de infección, observándose un aumento de la carga viral hasta 5.7 d.p.i. y un aclaramiento posterior. La médula espinal mostró una tendencia similar a la observada en otras regiones del SN, a pesar del retraso en la aparición del virus, lo que indica el orden de neuroinvasión. La comparación de la carga viral detectada con las dos dosis de inoculación demostró que el virus alcanza la médula espinal. El aclaramiento del virus en la médula espinal coincide con el aumento de la carga viral en la glándula adrenal y en el ovario donde se alcanzó un pico de DNA viral a 7 d.p.i. coincidiendo con la mayor viremia de la cinética. Esta dosis de inoculación permitió por primera vez la detección del virus en el ovario de ratones infectados por abrasión del morro. La presencia del virus en la glándula adrenal y en el ovario confirma su papel como órganos diana en la infección del HSV-1 y su conexión anatómica con la médula espinal (Hill et al., 1986b). La presencia del virus en sangre mostró un comportamiento similar al observado con la dosis de 10^6 ufp, de modo que se detectó de forma constante a lo largo del tiempo, lo que indica una viremia constante. A día 7 post-infección presentó un pico de máxima carga viral que coincide con el

máximo de DNA viral observado en la glándula adrenal y el ovario, lo que sugiere que estos órganos son clave en el paso del virus al torrente sanguíneo desde el SN.

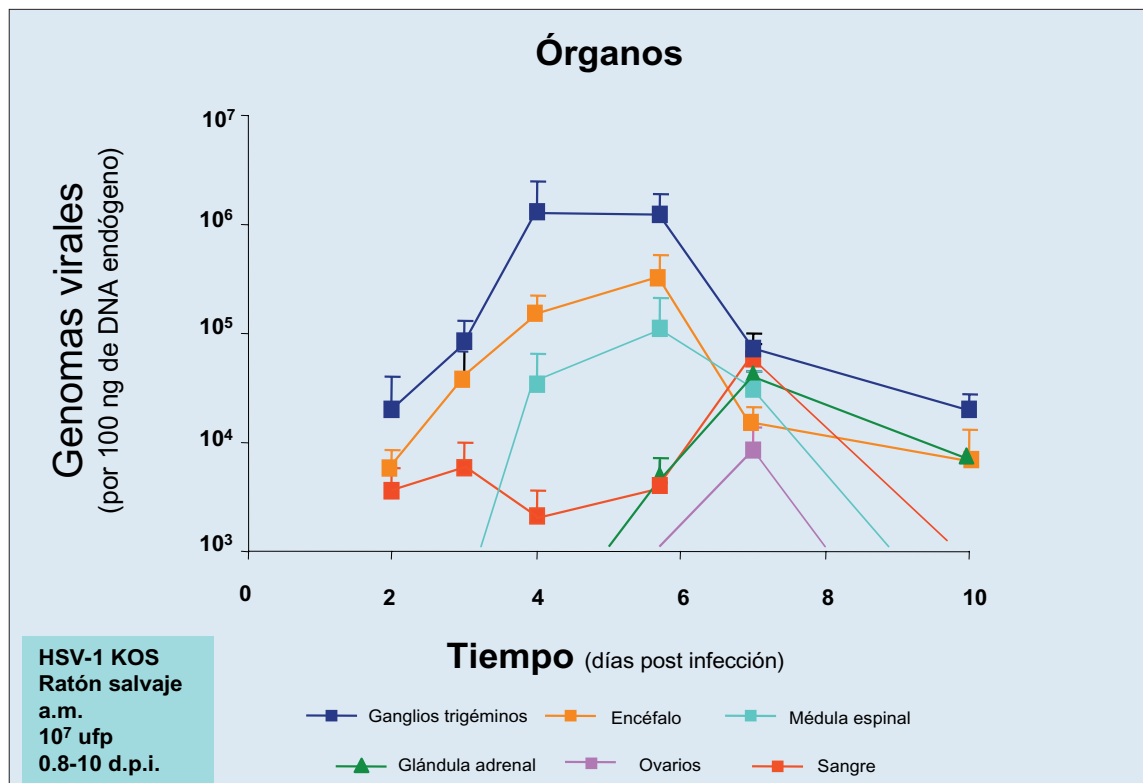


Figura R22. Cinética de la infección neural con 10⁷ ufp de HSV-1 KOS. Se inocularon 78 ratones con 10⁷ ufp de HSV-1 KOS por abrasión del morro. Las líneas representan la media ± SEM del número de copias de virus (normalizado por 100 ng de DNA genómico de ratón) en los órganos analizados.

Los resultados obtenidos en la cinética de infección con las dos dosis de inoculación han mostrado que el encéfalo y los ganglios trigéminos son las regiones infectadas preferencialmente tras la ruta de infección neural. En un análisis pormenorizado del encéfalo (figura R23), se observó que el *mesencéfalo* fue la región principalmente infectada, mientras que la detección del DNA viral en otras regiones del encéfalo fue despreciable. La presencia del virus en el *mesencéfalo* se debe a la conexión anatómica con el ganglio trigémino (Labetoulle et al., 2003), que explica la infección preferencial

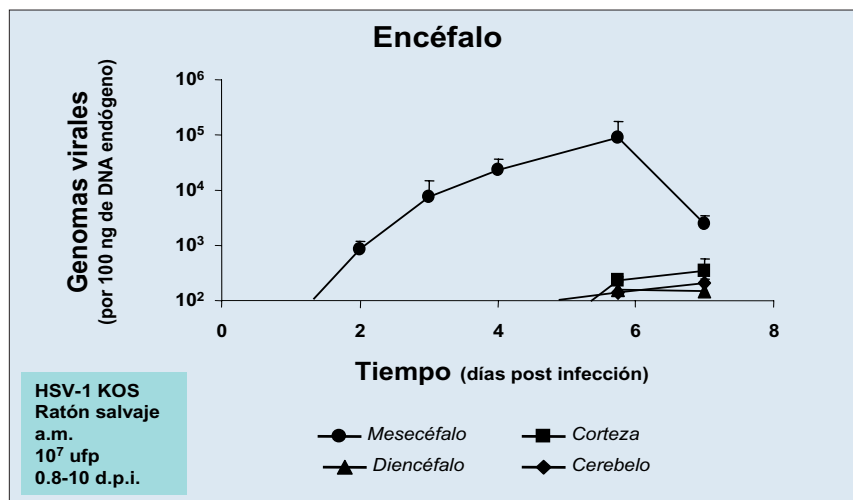


Figura R23. Cinética de la infección neural con 10⁷ ufp de HSV-1 KOS en las distintas regiones del encéfalo. Se inocularon 78 ratones con 10⁷ ufp de HSV-1 KOS por abrasión del morro. Las líneas representan la media ± SEM del número de copias de virus (normalizado por 100 ng de DNA genómico de ratón) en las cuatro regiones del encéfalo.

de esta zona y el comportamiento similar de estas dos regiones del SN en relación a la infección del virus puesto que en todas las condiciones ensayadas han mostrado una alta correlación en las cargas virales (figura R24).

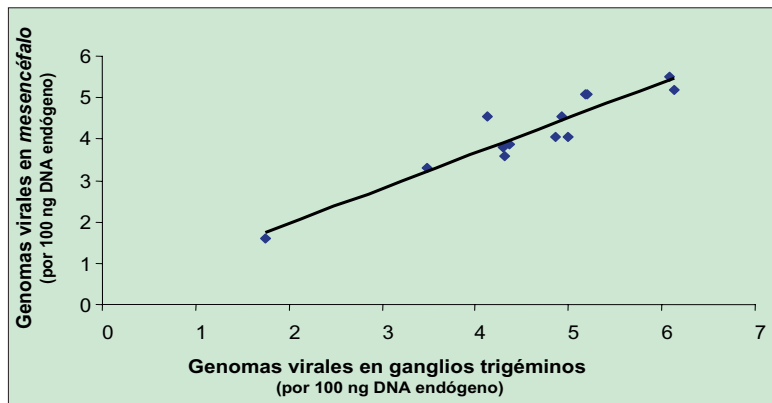


Figura R24. Comparación entre las cargas virales del mesencéfalo y de los ganglios trigéminos en la infección neural. El diagrama representa la relación entre las cargas virales del mesencéfalo y de los ganglios trigéminos de los valores obtenidos en la infección aguda del HSV-1 KOS por la ruta neural. ($r^2= 0.88$).

El análisis comparativo entre el *mesencéfalo* y los ganglios trigéminos con ambas dosis (figura R25) muestra un aclaramiento del virus en los ganglios trigéminos que coincide con un pico de máxima detección en el *mesencéfalo*, lo que sugiere el orden de neuroinvasión desde los ganglios hasta el *mesencéfalo*. Además, con la dosis de 10^7 ufp, se ha comprobado que sólo se produce la invasión eficiente de la médula espinal cuando se alcanzan niveles significativamente superiores en el *mesencéfalo*, lo que indica que el orden de neuroinvasión prosigue desde esta región del encéfalo hasta la médula espinal.

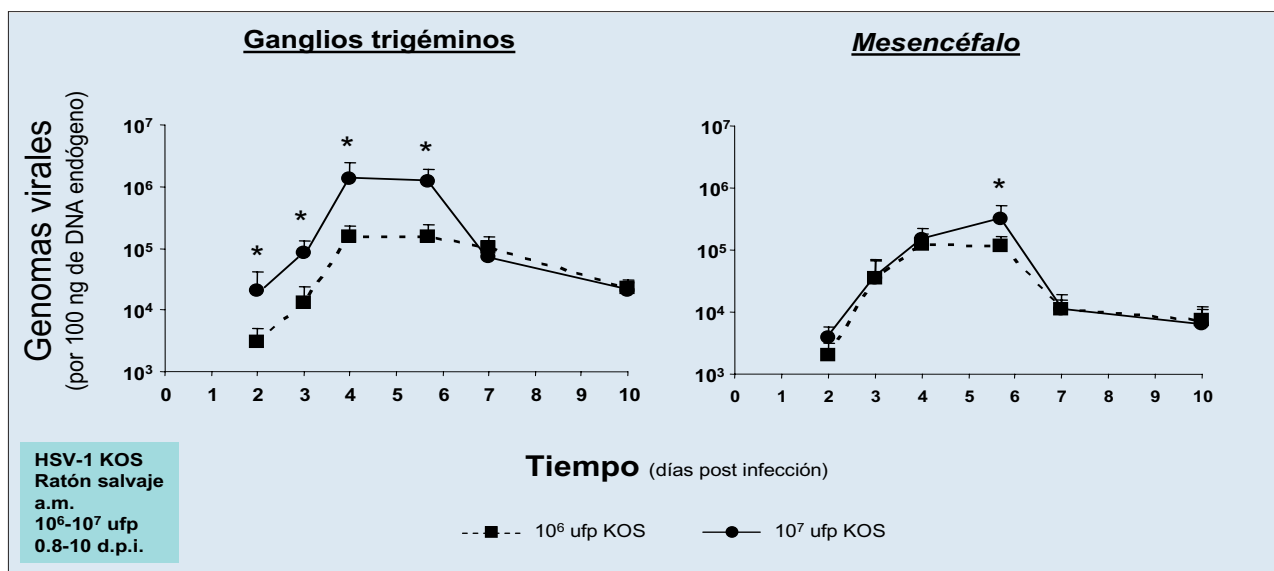


Figura R25. Cinética de la infección neural en el mesencéfalo y en los ganglios trigéminos en función de la dosis inoculada. Se inocularon 88 ratones con 10^6 ufp y 78 ratones con 10^7 ufp de HSV-1 KOS por abrasión del morro. Las líneas representan la media \pm SEM del número de copias de virus (normalizado por 100 ng de DNA genómico de ratón). La gráfica de la izquierda muestra las cargas virales detectadas en los ganglios trigéminos en función de la dosis inoculada. La gráfica de la derecha muestra la carga viral detectada en el mesencéfalo. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la carga viral en los distintas regiones neurales (* $p<0.05$).

En conclusión, los resultados obtenidos en la cinética de infección con las dos dosis de inoculación han permitido establecer el orden de invasión del HSV-1 tras la infección neural

mediante abrasión del morro, de modo que el virus tras la inoculación en la mucosa facial del animal alcanza el ganglio trigémino a través del nervio trigémino (Baringer y Swoveland, 1973) alcanza el *mesencéfalo*. Desde esta región cerebral el virus viaja hasta la médula espinal desde donde infecta órganos periféricos como el ovario y la glándula adrenal que permiten la colonización subsiguiente del torrente sanguíneo. Estos resultados indican que la ruta recorrida por el virus tras la infección neural sigue un patrón de colonización inverso al descrito previamente tras la infección hematogena (Burgos et al., 2002a; Ramírez, 2006) que explica la alta seroprevalencia en la población (Whitley y Grann, 1993) que comúnmente es infectada por esta ruta neural.

4.2.2.5. Estudio comparativo de la infección neural de las cepas HSV-1 KOS y F

Como se ha descrito en el apartado 4.2.1.4., la cepa de virus utilizada en la infección hematogena puede ser determinante para el desarrollo de la infección. Por ello, se analizó el comportamiento de las cepas KOS y F en la ruta de infección neural mediante inoculación por abrasión del morro, con objeto de estudiar si existe alguna diferencia en la infección en función de la cepa utilizada o si por el contrario estas diferencias quedan restringidas a la ruta hematogena.

Los ratones infectados con el virus HSV-1 F presentaron un porcentaje de enfermedad mucho menor que en el caso de los infectados con KOS (figura R26), lo que indica, una vez más, la mayor virulencia de la cepa KOS. En ambos casos la sintomatología fue idéntica a la descrita en el apartado 4.2.2.1., sin embargo, los animales infectados con la cepa KOS a 5.7 d.p.i. presentaron un 50% de enfermedad que a día 7 alcanzó el 80%, mientras que los ratones infectados con la cepa F a 5.7 d.p.i. presentaron un 20% de enfermedad que llegó hasta el 40% a 7 d.p.i., indicando que la aparición de los síntomas es dependiente de la cepa inoculada, siendo menos virulenta la infección con la cepa F.

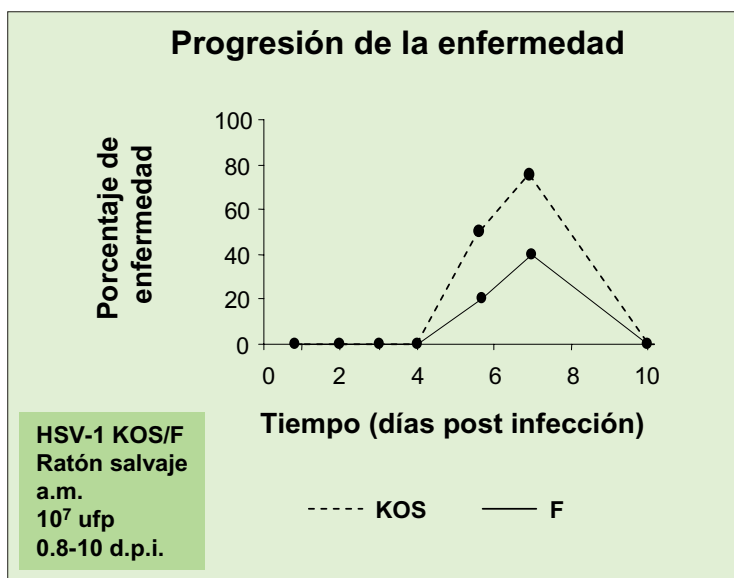


Figura R26. Estudio comparativo de las cepas HSV-1 KOS y F en la progresión de la enfermedad tras la infección neural. Las líneas muestran el porcentaje de animales enfermos a lo largo del tiempo de 30 ratones inoculados con 10⁷ ufp de HSV-1 KOS (línea de puntos) y 35 ratones inoculados con 10⁷ ufp de HSV-1 F (línea continua).

Mediante el análisis de la carga viral se observó que la infección con la cepa F se encuentra restringida a los ganglios trigéminos y al encéfalo, con una presencia residual en la sangre a tiempos tardíos. Como ocurría con la cepa KOS (apartado 4.2.2.4.2.), se observó un patrón de infección similar en el encéfalo y en los ganglios trigéminos (figura R27) que de nuevo presentaron una mayor carga viral en todo momento, lo que confirma que el orden de neuroinvasión descrito anteriormente es independiente de la cepa utilizada siendo determinante la vía de inoculación. En estos órganos se detectó por primera vez el virus a 2 d.p.i., aumentando hasta 4 d.p.i., momento en el que la carga viral se mantuvo constante a lo largo del tiempo.

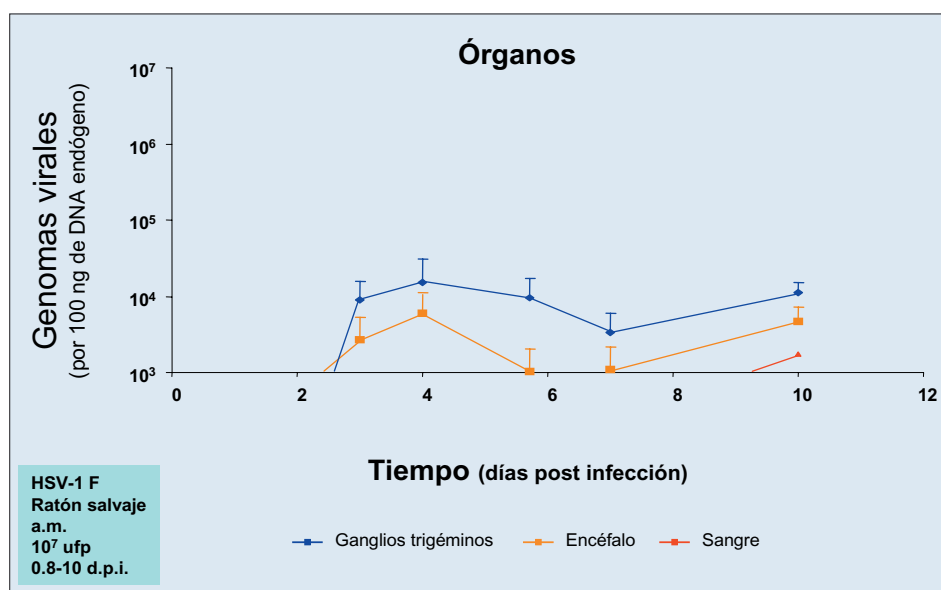


Figura R27. Cinética de la infección neural de la cepa HSV-1 F. Se inocularon 35 ratones con 10^7 ufp de HSV-1 F por abrasión del morro. Las líneas representan la media \pm SEM del número de copias de virus (normalizado por 100 ng de DNA genómico de ratón) en los órganos analizados.

En la figura R28, se muestra la comparación de la carga viral de los ganglios trigéminos y del *mesencéfalo* de ratones infectados con las cepas KOS y F, donde se muestra una carga viral significativamente mayor ($p < 0.05$) en los ratones infectados con KOS. Sin embargo, a tiempos tardíos la carga viral detectada se iguala tanto en los ganglios trigéminos como en el encéfalo tras la infección con ambas cepas.

Estos resultados indican que la cepa F es menos virulenta que la cepa KOS como se refleja en la progresión de los síntomas de la enfermedad, y menos infectiva, puesto que los niveles de virus fueron mucho menores en los órganos analizados, donde la presencia viral quedó restringida a los ganglios trigéminos y al encéfalo. No obstante, estos resultados corroboran estudios previos donde se ha demostrado que a pesar de la baja virulencia, la cepa F persiste en el cerebro (Lewandowski et al., 1993).

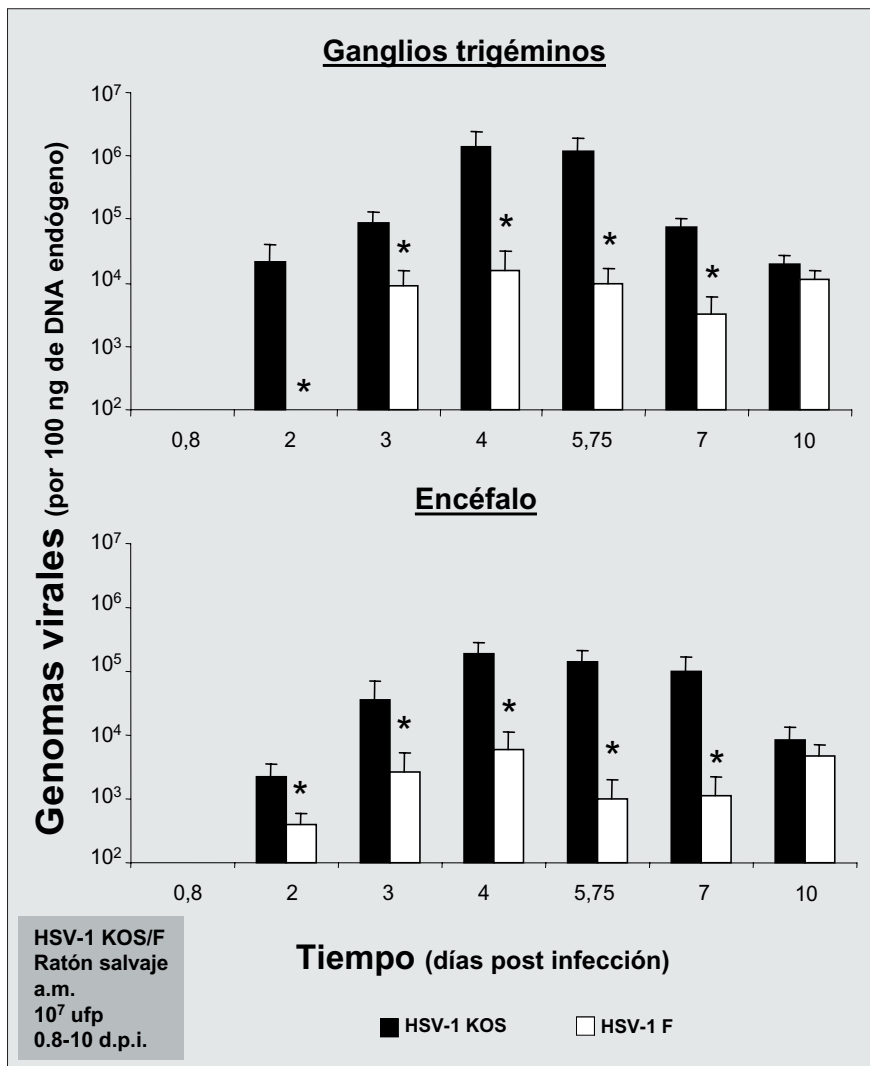


Figura R28. Estudio comparativo de las cepas HSV-1 KOS y F tras la infección neural. Las barras representan la media ± SEM del número de copias virales (normalizadas por 100 ng de DNA genómico de ratón) del encéfalo y de los ganglios trigéminos. Se infectaron 78 ratones con 10⁷ ufp de HSV-1 KOS por abrasión del morro (en negro) y 35 ratones con 10⁷ ufp de HSV-1 F (en blanco). Se sacrificaron y diseccionaron a distintos puntos temporales. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la carga viral obtenida entre ambas cepas (*p<0.05).

4.3. Influencia de la proteína viral ICP47 y de la proteína murina tap1 en la infección intravenosa del HSV-1

ICP47 es una proteína viral de expresión inmediatamente temprana codificada por el gen Us12 (York et al., 1994). Su principal función en el proceso de infección es inhibir al transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP) (Spies et al., 1990), impidiendo en último término su translocación al lumen del retículo endoplásmico y su carga en el MHC I (Fruh et al., 1995; Hill et al., 1995).

Hasta el momento no existe ningún trabajo previo donde se haya estudiado la interacción de TAP e ICP47 en un modelo *in vivo*. Por esta razón se ha llevado a cabo un estudio sobre el efecto de la proteína viral ICP47 y la proteína tap1 del ratón tras la infección hematológica.

Para el desarrollo de este estudio se utilizó el modelo de la infección hematológica que ha resultado ser la ruta de inoculación que permite una colonización más eficiente del cerebro (apartado 4.2.1.). Se utilizaron los virus HSV-1 F y un mutante basado en esta misma cepa deficiente en la

proteína ICP47 (Δ ICP47) (Mavromara-Nazos et al., 1986). Además se utilizaron ratones salvajes C57BL/6 y ratones transgénicos deficientes en el gen *tap1*, y por tanto deficientes en el complejo TAP murino (Van Kaer et al., 1992).

El estudio se llevó a cabo bajo las condiciones de trabajo puestas a punto previamente para la infección hematológica del virus HSV-1 F (apartados 4.2.1.5. y 4.2.1.6.), de modo que los ratones fueron inoculados por vía intravenosa con una dosis de 10^7 ufp, condiciones que aseguran la colonización del SN de forma eficiente durante la fase de infección aguda. Los ratones fueron sacrificados a 10 d.p.i., punto temporal que presenta la mayor carga viral en el SN.

4.3.1. Efecto de la proteína ICP47 en la infección hematológica de ratones salvajes

En primer lugar se llevó a cabo un análisis de la influencia de la proteína ICP47 en el desarrollo de la infección. Para ello se infectaron ratones salvajes con los virus HSV-1 F y Δ ICP47.

El análisis de la infección mostró una disminución significativa de los niveles de virus en los órganos de los ratones infectados con el virus Δ ICP47 (figura R29). No obstante la carga viral detectada en sangre fue similar para ambos tipos de virus. En los ovarios no se detectó DNA viral, como cabía esperar debido a que, en este punto temporal, ya se ha producido el aclaramiento del virus en este órgano como se ha descrito previamente en la cinética de infección en el apartado 4.2.1.5 (figura R11). Sin embargo, la diferencia en la infección entre los dos virus fue significativa ($p < 0.05$) en la glándula adrenal y la médula espinal, donde ambos órganos presentaron un comportamiento muy similar debido a la conexión anatómica entre ellas (Hill et al., 1986b). Por su parte los ganglios trigéminos y el encéfalo presentaron una menor diferencia, aunque estadísticamente significativa en los niveles de virus ($p < 0.05$).

El encéfalo de los ratones infectados con el virus Δ ICP47 presentó una menor carga viral que el encéfalo de ratones infectados con el virus salvaje. En un análisis más detallado del encéfalo (figura R29, recuadro) se observó que la zona principalmente infectada en ambas condiciones fue el *mesencéfalo*. Además en los ratones infectados con el virus salvaje se detectó el virus en el *mesencéfalo*, en el *diencefalo* y en la *corteza*, mientras que en los ratones infectados con el virus Δ ICP47 la única región donde se detectó el DNA viral fue en la región *mesencefálica*.

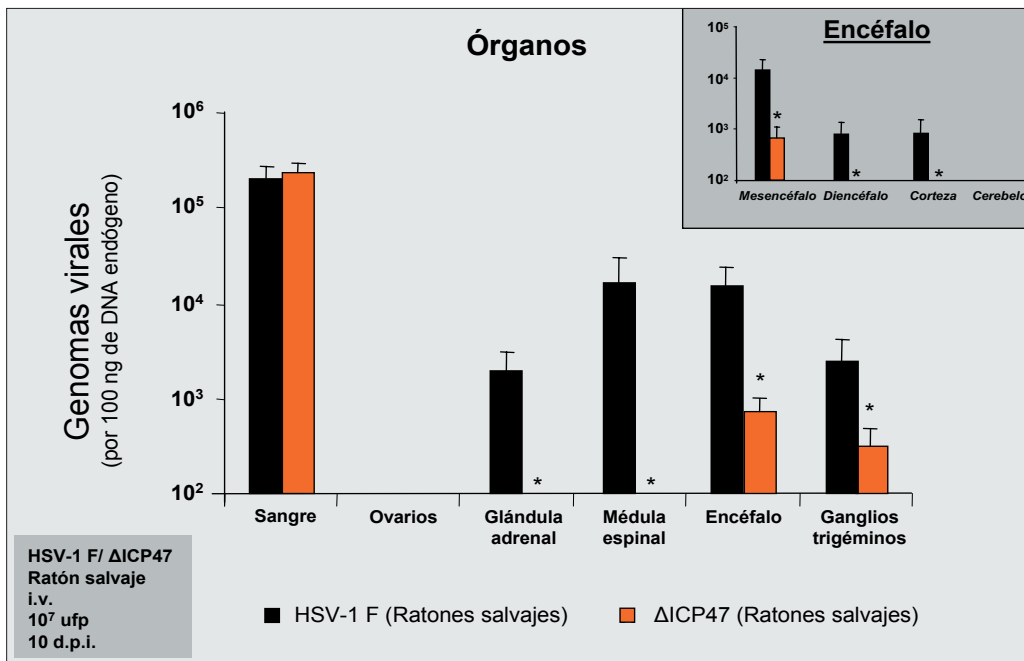


Figura R29. Influencia de la proteína viral ICP47 en la infección hematogena de ratones salvajes. Las barras representan la media ± SEM del número de copias virales (normalizado por 100 ng de DNA genómico de ratón). Se infectaron por vía intravenosa 6 ratones salvajes (C57BL/6J) con 10⁷ ufp de virus con la cepa salvaje HSV-1 F (en negro) y 6 ratones salvajes con la cepa mutante ΔICP47 (en naranja) y se sacrificaron a 10 d.p.i. En el recuadro se presentan las cuatro regiones del encéfalo. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la carga viral entre ambos virus (*p<0.05).

Los resultados obtenidos muestran que el virus deficiente en ICP47 resulta menos invasivo, puesto que la carga viral detectada es significativamente menor en todos los órganos analizados en comparación con el virus salvaje. Las diferencias en la carga viral se mantienen en el encéfalo y en los ganglios trigéminos. El estudio comparativo de estos dos virus indica que la proteína viral ICP47 juega un papel esencial en la infección general del HSV-1, y en especial en el acceso al SN.

4.3.2. Efecto de la proteína TAP murina en la infección hematogena del HSV-1

Con objeto de analizar la contribución del TAP murino en la eficiencia de la infección, se comparó la carga viral de los ratones salvajes y deficientes en *tap1*, infectados con el virus HSV-1 F salvaje (figura R30).

El análisis de la carga viral mostró niveles similares en todos los órganos analizados, independientemente de la cepa de ratón utilizada. Como ocurría en el apartado anterior, los niveles virales fueron similares en la sangre. Del mismo modo, no se observaron diferencias significativas en la carga viral detectada en los órganos periféricos ni en el SN, lo que sugiere que la presencia del *tap1* murino no participa de manera significativa en el desarrollo de la infección.

El estudio del encéfalo en detalle (recuadro de la figura R30), no mostró diferencias en los niveles de virus en ninguna de las cuatro regiones diseccionadas independientemente de la presencia/ ausencia de *tap1*.

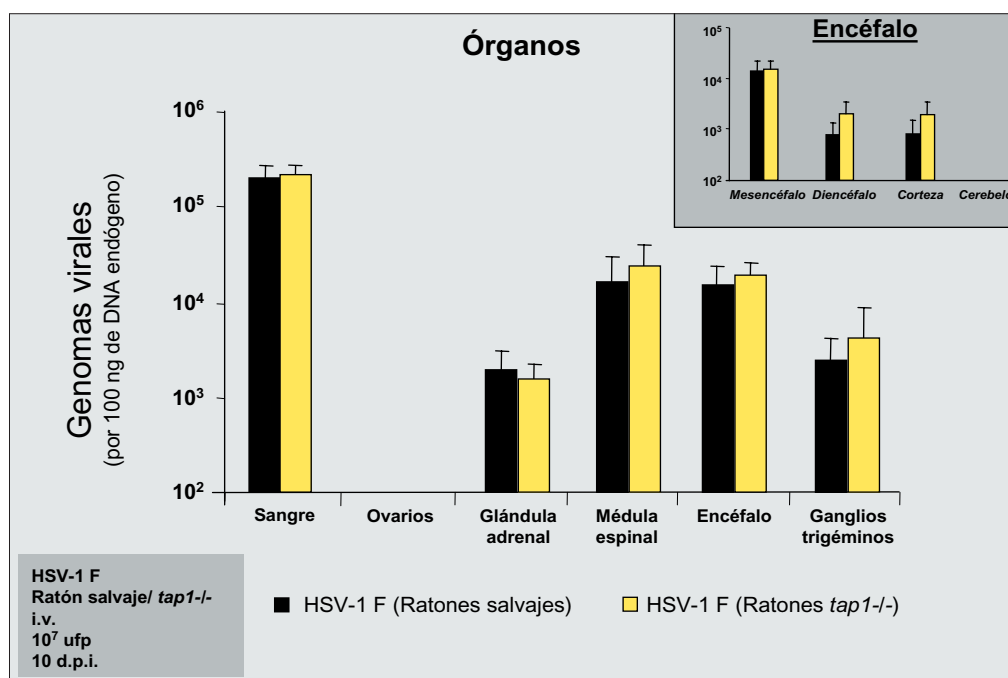


Figura R30. Influencia de la proteína *tap1* en la infección del virus HSV-1 F. Las barras representan la media \pm SEM del número de copias virales (normalizado por 100 ng de DNA genómico de ratón). Se infectaron por vía intravenosa con 10⁷ ufp de HSV-1 F 6 ratones salvajes (en negro) y 6 ratones deficientes en *tap1* (en amarillo). Los animales fueron sacrificados a 10 d.p.i. En el recuadro se presentan las cuatro regiones del encéfalo. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la carga viral entre ambos grupos de ratones (* $p < 0.05$).

Estos datos indican que la proteína *tap1* del ratón no afecta a la infección hematogena del virus HSV-1 F, al menos en las condiciones ensayadas. Este efecto es probablemente debido a la baja afinidad de la proteína ICP47 por el tap murino (Tomazin et al., 1998).

4.3.3. Efecto de la proteína ICP47 en ratones deficientes en *tap1*

El estudio fue completado analizando la infección del virus Δ ICP47 en ausencia de la proteína murina *tap1*, con objetivo de analizar en mayor profundidad la relación de la proteína viral ICP47 con TAP. Para ello se infectaron ratones deficientes en *tap1* con los virus HSV-1 F y Δ ICP47.

En la figura R31 se muestra la comparación de la carga viral tras la infección con ambos virus. De nuevo, no se observaron diferencias significativas en los niveles virales detectados en sangre ($p < 0.05$). De igual modo, no se detectó DNA viral en los ovarios en ninguna de las dos condiciones debido al aclaramiento del virus en este órgano. La carga viral detectada en la glándula adrenal fue significativamente menor en los ratones infectados con el virus mutante ($p < 0.05$), confirmando la participación de la proteína viral ICP47 en el proceso de infección. La médula espinal mostró un comportamiento similar a la glándula adrenal, donde también se detectaron niveles virales significativamente menores en la infección con el virus Δ ICP47 ($p < 0.05$), sin embargo se produjo una pequeña recuperación de la infección en ausencia de TAP. Este fenómeno se hizo más evidente en el resto del SN, en el encéfalo y en los ganglios trigéminos, donde la recuperación de la infección fue

completa puesto que se detectaron cargas virales similares en ambas regiones independientemente del virus inoculado ($p < 0.05$).

Por último, se observó que la recuperación de la infección en el encéfalo tuvo lugar de forma generalizada puesto que todas las regiones analizadas presentaron niveles virales similares en las dos condiciones de infección (recuadro figura R31).

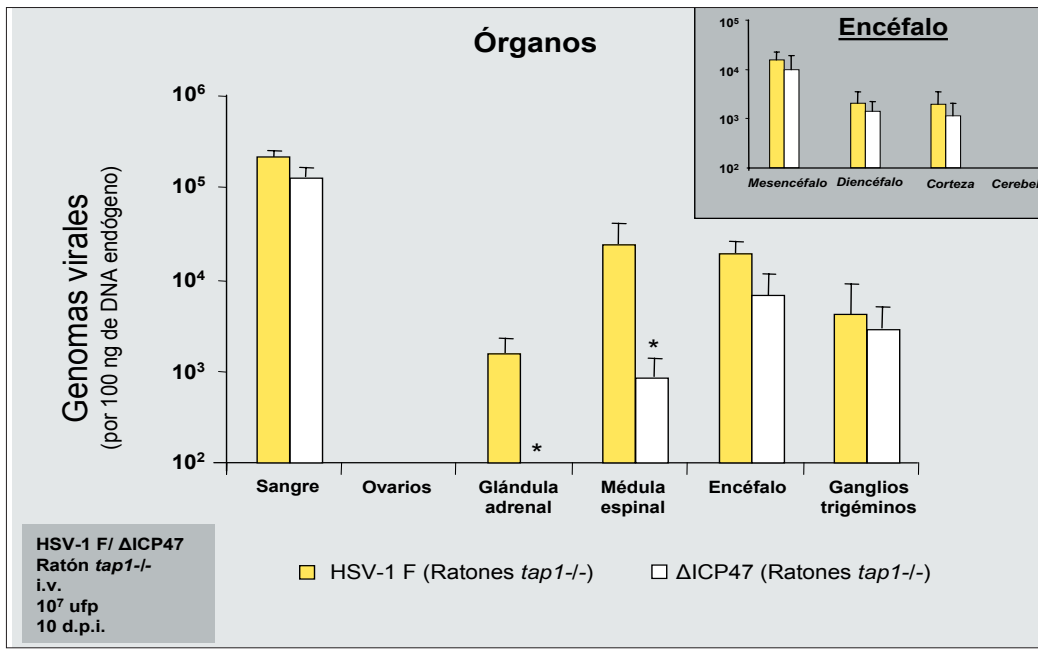


Figura R31. Influencia de la proteína viral ICP47 en la infección hematogena de ratones deficientes en *tap1*. Las barras representan la media ± SEM del número de copias virales (normalizado por 100 ng de DNA genómico de ratón). Se infectaron por vía intravenosa 6 ratones deficientes en *tap1* (C57BL/6J) con 10⁷ ufp de HSV-1 F (en amarillo) y 6 ratones deficientes en *tap1* (C57BL/6J) con 10⁷ ufp de la cepa mutante HSV-1 F ΔICP47 (en blanco). Los animales se sacrificaron a 10 d.p.i. En el recuadro se presentan las cuatro regiones del encéfalo. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la carga viral entre ambas condiciones (* $p < 0.05$).

Los resultados obtenidos en este análisis sugieren que el virus deficiente en ICP47, que previamente había mostrado su baja infectividad tras la inoculación en ratones salvajes, recupera totalmente su capacidad de infección en el sistema nervioso en ausencia de *tap1*. Este hecho indica la estrecha relación entre las dos proteínas en el SN: el encéfalo y los ganglios trigéminos presentan una total recuperación de la infección, mientras que la médula espinal mostró una tendencia en la recuperación de la infección.

La recuperación progresiva de la capacidad de infección del virus deficiente en ICP47 en ausencia de TAP, en la colonización secuencial del sistema nervioso puede ser consecuencia de dos fenómenos diferenciales: la especificidad de tejido o la desregulación de la homeostasis entre TAP e ICP47. Para determinar si dicha recuperación es debida a las características intrínsecas del tejido o a unos bajos niveles de TAP en el SN, se realizó un estudio de la capacidad de infección del virus salvaje y deficiente en ICP47 (en presencia o ausencia de TAP) en dos órganos de distinta procedencia

embrionaria y comportamiento diferencial frente a la infección: el encéfalo (de origen ectodérmico y donde se recupera la infección) y la glándula adrenal (de origen mesodérmico y donde no se recupera la infección).

4.3.4. Análisis de la expresión de *tap1* mediante *Western-Blot*

Los resultados obtenidos en el apartado anterior mostraron al SN como una región especialmente vulnerable en la infección, de modo que se llevó a cabo un análisis de la expresión de *tap1* en varios tejidos con objeto de comprobar si existen diferencias en relación a la regulación de la expresión del gen *tap1* en función del tejido o si los niveles basales de proteína *tap1* son diferentes en el tejido nervioso.

Para ello, se realizó un estudio comparativo en ratones salvajes infectados con el virus HSV-1 F y con el virus Δ ICP47. Se analizaron los niveles de expresión de *tap1* en la glándula adrenal y en el encéfalo puesto que estos dos tejidos mostraron un comportamiento claramente diferencial en los ratones deficientes en *tap1* infectados con el virus mutante Δ ICP47 (figura R30), puesto que en la glándula adrenal no se detectó DNA viral tras la infección con este virus, mientras que el encéfalo se detectaron niveles virales similares a los del virus salvaje. Como control se incluyó un grupo de ratones *MOCK* inoculados con solución salina.

En la figura R32A se muestra un *Western-Blot* representativo del análisis de los extractos de encéfalo y de glándula adrenal de ratones *MOCK*, de ratones infectados con el virus HSV-1 F y de ratones infectados con el virus Δ ICP47. Como control negativo se incluyeron ratones deficientes en *tap1*.

En los extractos de ratones *MOCK* se detectó la proteína *tap1* endógena con un peso molecular de aproximadamente 71 KDa tanto en el encéfalo como en la glándula adrenal. En el control negativo no se detectó el marcaje de la proteína *tap1* en ninguno de los dos órganos, demostrando la especificidad del ensayo.

En primer lugar, se observó que en los ratones *MOCK* el nivel de expresión basal de *tap1* en la glándula adrenal fue 100 veces mayor que en el encéfalo (ratio *tap1* en la glándula adrenal/ *tap1* en el encéfalo >100 veces) lo que establece una diferencia en los niveles basales de *tap1* entre estos dos tejidos independientemente de la respuesta a la infección viral (figura R32B), lo que podría explicar las diferencias observadas en la recuperación de la infección del virus Δ ICP47.

En segundo lugar se analizó la expresión de *tap1* como consecuencia de la infección con el virus HSV-1 F (figura R32C). Aquí se observó un incremento en la expresión de *tap1* de al menos 4

RESULTADOS

veces independientemente del órgano analizado (4.1 veces en el caso del encéfalo y 5.4 en el caso de la glándula adrenal), lo que sugiere que no existe una regulación tejido-específica de la expresión de *tap1* como consecuencia de la infección, sino que la sobreexpresión de *tap1* es una consecuencia general tras la infección.

Por último, en el encéfalo la infección con el virus Δ ICP47 no produjo un incremento significativo en la expresión de *tap1* en comparación con los niveles detectados en los ratones *MOCK* ($p < 0.05$). Este efecto es debido probablemente a que se ha de superar un umbral de infección en el encéfalo para provocar la sobreexpresión de *tap1*. Por su parte, en la glándula adrenal, donde los niveles de TAP son considerablemente mayores que en el encéfalo, la infección provoca un aumento significativo, aunque minoritario, de la expresión de *tap1* ($p < 0.05$).

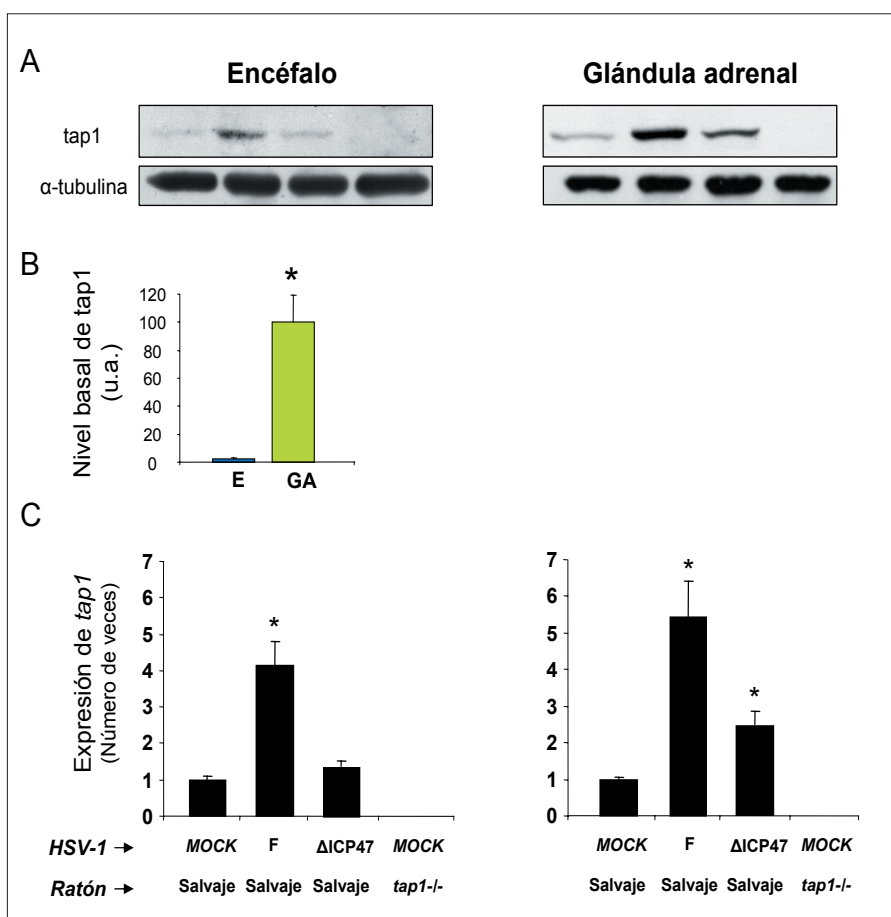


Figura R32. Inmunodetección de la proteína tap1 mediante Western-Blot. Once ratones, salvajes y deficientes en *tap1*, fueron inoculados por vía intravenosa con 10^7 ufp de HSV-1 (HSV-1 F o Δ ICP47) o con solución salina (*MOCK*) y se sacrificaron a 10 d.p.i. En A, se muestra un *Western-Blot* representativo con la banda correspondiente a la proteína tap1, de aproximadamente 71 KDa, en el encéfalo y en la glándula adrenal. En B, el gráfico representa la cuantificación por densitometría del nivel basal de expresión de tap1 en el encéfalo y la glándula adrenal de ratones *MOCK*. En C, las barras indican la media (de tres experimentos independientes) \pm SD de expresión de tap1 en ratones infectados (con los dos tipos de virus) y *MOCK*. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la expresión referida a los ratones *MOCK* (* $p < 0.05$).

Estos datos sugieren que existe una fina homeostasis entre la proteína del hospedador (TAP) y la viral (ICP47) que regula el proceso de infección en función de los niveles endógenos de tap1 y que son intrínsecos al tipo tisular. Además, los resultados obtenidos sugieren que la sobreexpresión de *tap1* es un fenómeno que se produce como consecuencia de una infección eficiente, independientemente del tejido afectado y que se produce como respuesta del hospedador a la infección. Sin embargo, tejidos como el encéfalo que presentan bajos niveles de expresión de *tap1*, son más vulnerables a la

infección del HSV-1, como por ejemplo en ausencia de TAP, donde el virus Δ ICP47 es capaz de infectar eficientemente el encéfalo. Este fenómeno observado en el cerebro probablemente sea extensible a otras regiones del SN como los ganglios trigéminos, si bien la médula espinal se conformaría como una región intermedia puesto que no se detecta una recuperación completa de la infección.

4.4. Generación de ratones transgénicos que expresan el gen TAP humano

Los estudios *in vivo* de la relación de la proteína viral ICP47 y el TAP murino (apartado 4.3.) han mostrado que existe una baja afinidad entre estas dos proteínas, confirmando datos *in vitro* publicados previamente (Tomazin et al., 1998), y hacen evidente la necesidad de la generación de un ratón transgénico que exprese el complejo TAP humano, de modo que se pueda abordar la relación de estos dos factores en un modelo animal. Además, datos de nuestro laboratorio han demostrado la existencia de una asociación genética entre la isoforma *TAP2B* y *APOE-ε4* con la enfermedad de Alzheimer esporádica (Bullido et al., 2007), de modo que la generación de este ratón transgénico permitirá el estudio de la relación entre los polimorfismos de *TAP2* y la enfermedad.

El complejo TAP está formado por dos subunidades codificadas por los genes *TAP1* y *TAP2* (Meyer et al., 1994). Estos genes son altamente polimórficos, entre los que destacan las isoformas *TAP1A*, *TAP2A* y *TAP2B* (Faucz et al., 2000).

Durante el desarrollo de este trabajo se han generado tres líneas transgénicas simples que expresan los genes *TAP1A*, *TAP2A* y *TAP2B* independientemente, y que finalmente se cruzarán entre ellas para la obtención de dos líneas transgénicas dobles que expresarán en un caso los genes *TAP1A* y *TAP2A*, y en otro los genes *TAP1A* y *TAP2B*, con objeto de realizar un estudio comparativo entre ambas y analizar así la influencia del polimorfismo *TAP2B*.

Para la generación de los tres transgénicos se ha utilizado el vector de expresión neuronal MoPrP.Xho (Borchelt et al., 1996), de modo que los tres genes tendrán una expresión dirigida al sistema nervioso donde se ha observado previamente que adquiere mayor relevancia la función del complejo TAP (apartado 4.3.). Además el encéfalo constituye el órgano de mayor interés en este estudio debido a que estos transgénicos están enfocados al estudio de la una enfermedad neurodegenerativa como es el alzhéimer.

La estrategia para la generación de los ratones transgénicos se basó, en primer lugar, en el clonaje de los genes *TAP1A* y *TAP2A* en el vector pCRTMII. El gen *TAP2B* fue obtenido mediante mutagénesis dirigida a partir del gen *TAP2A*. Posteriormente, los tres genes fueron subclonados en el vector MoPrP.Xho y microinyectados en ovocitos de ratón para obtener las tres líneas transgénicas

simples en un fondo genético mixto. Finalmente, mediante cruces con una línea congénita se llevaron estas líneas a fondo genético C57BL/6J.

4.4.1. Clonaje y mutagénesis de *TAP1* y *TAP2* en un vector de expresión neuronal

Para la generación de las tres líneas de transgénicos sencillos se utilizó el vector de expresión neuronal MoPrP.Xho (Borchelt et al., 1996), que contiene todas las regiones reguladoras del promotor de la proteína prión murina. El proceso de clonaje se realizó de forma secuencial, partiendo del cDNA de los dos genes, *TAP1A* y *TAP2A*.

4.4.1.1. Clonaje en pCRTMII

Se utilizó el vector pCRTMII como paso previo para clonaje en el vector MoPrP.Xho. Este vector ofrece la ventaja de permitir el clonaje directamente de productos de PCR, de modo que se utilizó para clonar el cDNA obtenido por RT-PCR. Por otro lado, debido a su pequeño tamaño permite desarrollar más fácilmente técnicas de biología molecular como la mutagénesis dirigida necesaria para la generación de la construcción con la isoforma TAP2B.

En primer lugar se obtuvo el cDNA de *TAP1A* y *TAP2A* a partir del RNA total de la línea celular humana U87, homocigota para ambos genes. Mediante RT-PCR se obtuvieron los dos cDNAs para lo que se utilizaron los oligonucleótidos RNATAP1 en el primer caso y RNATAP2 en el segundo (tabla MM5). Cada cDNA fue clonado en el plásmido pCRTMII mediante el kit de ligación (figura R33).

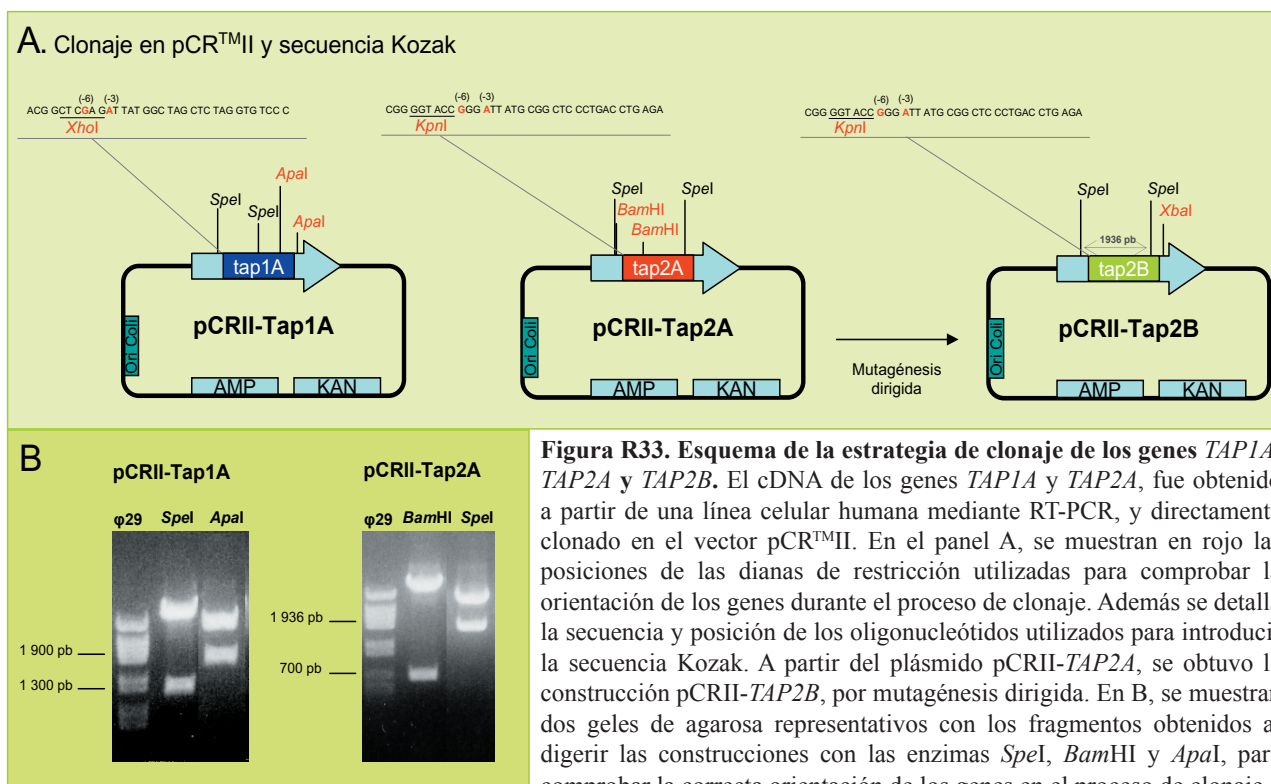


Figura R33. Esquema de la estrategia de clonaje de los genes *TAP1A*, *TAP2A* y *TAP2B*. El cDNA de los genes *TAP1A* y *TAP2A*, fue obtenido a partir de una línea celular humana mediante RT-PCR, y directamente clonado en el vector pCRTMII. En el panel A, se muestran en rojo las posiciones de las dianas de restricción utilizadas para comprobar la orientación de los genes durante el proceso de clonaje. Además se detalla la secuencia y posición de los oligonucleótidos utilizados para introducir la secuencia Kozak. A partir del plásmido pCRII-TAP2A, se obtuvo la construcción pCRII-TAP2B, por mutagénesis dirigida. En B, se muestran dos geles de agarosa representativos con los fragmentos obtenidos al digerir las construcciones con las enzimas *SpeI*, *BamHI* y *ApaI*, para comprobar la correcta orientación de los genes en el proceso de clonaje.

Para comprobar la orientación de los clones, se realizó una digestión dirigida. En el caso de *TAP1A*, se utilizaron las enzimas de restricción *ApaI* y *SpeI*. Con *ApaI*, en los clones positivos se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1 900 pb, y con *SpeI* de 1 300 pb (figura R33B). Para la digestión de *TAP2A* se utilizaron las enzimas *SpeI* y *BamHI* que en los clones positivos generaron fragmentos de aproximadamente 1 936 y 700 pb respectivamente (figura R33B).

De este modo se obtuvieron las construcciones denominadas: pCRII-*TAP1A* y pCRII-*TAP2A*.

4.4.1.2. Obtención de *TAP2B* mediante mutagénesis dirigida

A partir del plásmido pCRII-*TAP2A* se generó el clon con la isoforma *TAP2B* por mutagénesis dirigida mediante el uso del kit QuickChange®Site-Directed Mutagénesis. Se utilizaron los oligonucleótidos MUTAG-TAP2B-2021 y MUTAG-TAP2B-2087, cuya secuencia se detalla en la tabla MM5, y que fueron diseñados para introducir dos mutaciones puntuales en los residuos 2 021 y 2 087 del gen *TAP2A*. Para ello se siguieron las recomendaciones del fabricante, obteniéndose el clon que se designó pCRII-*TAP2B*. Finalmente, las tres construcciones fueron secuenciadas para comprobar que eran correctas y que no se había incluido ninguna otra mutación.

4.4.1.3. Introducción de la secuencia Kozak

Se ha descrito que la secuencia Kozak actúa como un activador de la traducción en eucariotas (Kozak, 1986; Kozak, 1997). Esta secuencia consiste en una guanina en posición -6 y una adenina en -3 con respecto al codón de iniciación de la traducción AUG. Para obtener un alto nivel de expresión de las construcciones en los ratones, se introdujo esta secuencia utilizando los oligonucleótidos denominados TAP1-kozak y TAP2-kozak (tabla MM5). Además se añadió la secuencia correspondiente a las dianas *XhoI* en el oligonucleótido TAP1-Kozak-U y *KpnI* en el oligonucleótido TAP2-Kozak que permitirán más adelante el clonaje de estos genes en el vector MoPrP.Xho sin incluir apenas nucleótidos del plásmido pCRII (figura R33).

- TAP1-Kozak-U: ACG G⁽⁻⁶⁾CTCGAGA⁽⁻³⁾TAT TAT GGC TAG CTC TAG GTG TCC C
XhoI
- TAP2-Kozak-U: CGG G⁽⁻⁶⁾GGTACC⁽⁻³⁾GGG ATT ATG CGG CTC CCTGAC CTG AGA
KpnI

De este modo se obtuvieron los vectores: pCRII-*TAP1A*(kozak), pCRII-*TAP2A*(Kozak) y pCRII-*TAP2B*(kozak).

De nuevo, se comprobó mediante secuenciación que había sido incluida correctamente la secuencia Kozak en las tres construcciones y que no se habían introducido mutaciones.

4.4.1.4. Clonaje en MoPrP.Xho

Una vez generadas las tres construcciones que contienen los genes *TAP1A*, *TAP2A* y *TAP2B* con la secuencia Kozak, fueron subclonadas en el plásmido MoPrP.Xho (figura R34).

En primer lugar se linearizó el plásmido MoPrP.Xho con la enzima de restricción *XhoI* y se enromaron los extremos cohesivos producto de la digestión del plásmido. Por otro lado, se digirieron los plásmidos pCRII-*TAP1A*(kozak), pCRII-*TAP2A*(Kozak) y pCRII-*TAP2B*(kozak) con las enzimas correspondientes para rescatar los tres genes (precedidos de la secuencia Kozak). Por último, cada gen se ligó con el plásmido MoPrP.Xho linearizado, obteniéndose las construcciones: MoPrP.*TAP1A*, MoPrP.*TAP2A* y MoPrP.*TAP2B*.

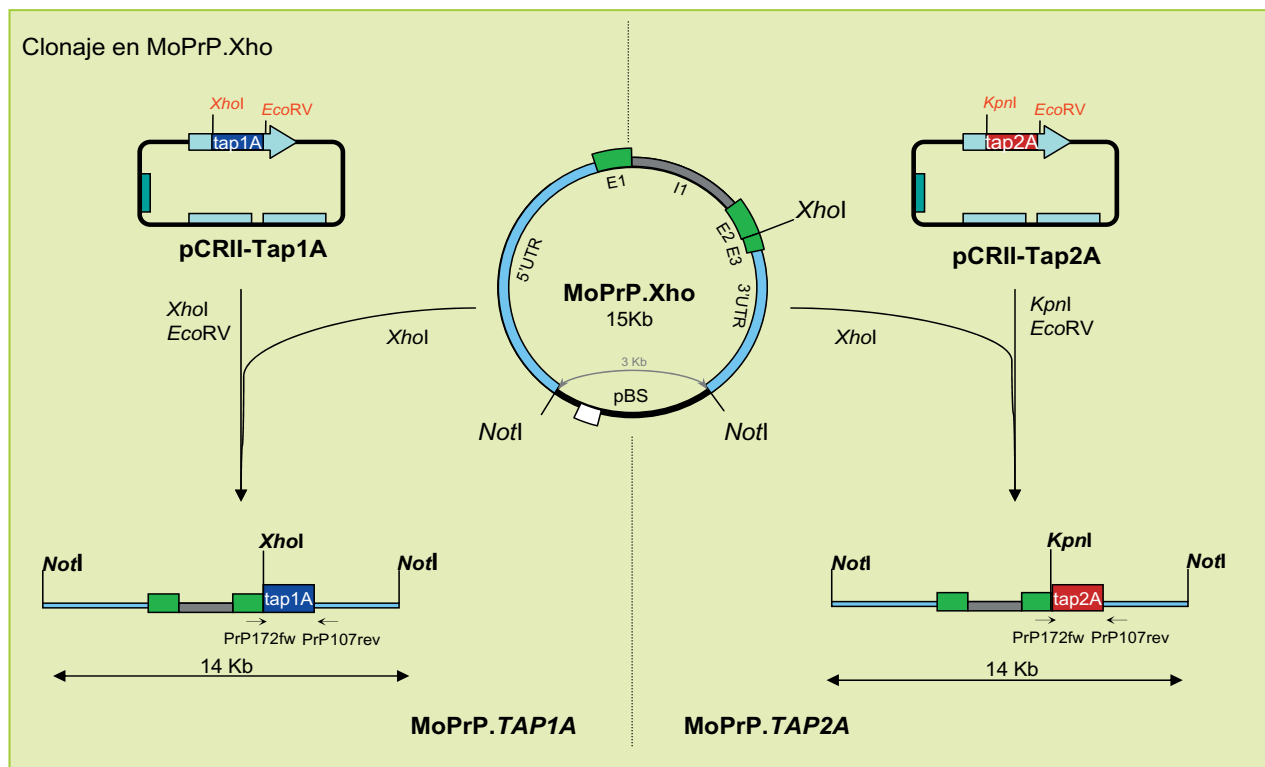


Figura R34. Esquema de la generación de los plásmidos MoPrP.*TAP1A*, MoPrP.*TAP2A* y MoPrP.*TAP2B*. Las tres construcciones se generaron mediante la digestión de los plásmidos pCRII-*TAP1A*, *TAP2A* y *TAP2B* con las enzimas de restricción adecuadas a cada caso. La correcta orientación de las construcciones fue analizada por PCR utilizándose los oligonucleótidos PrP172fw y PrP107rev, situados en los extremos del inserto, y los oligonucleótidos específicos de los genes *TAP1* y *TAP2*.

La orientación correcta de las tres construcciones fue comprobada por PCR, mediante la combinación de oligonucleótidos específicos de secuencias internas de los genes *TAP1* y *TAP2*, con los oligonucleótidos PrP107fw y PrP172rev (tabla MM5) que son complementarios de las secuencias del plásmido MoPrP.Xho situadas inmediatamente en 5' y 3' del inserto respectivamente (figura R34).

4.4.2. Clonaje en pcDNA3

Para comprobar la correcta expresión de los tres genes en un sistema eucariota, éstos se clonaron en el vector de expresión pcDNA3 (apartado 3.1.3.). Este vector constituye una excelente herramienta para estudios de expresión en sistemas celulares debido a su pequeño tamaño y a la eficiente expresión de los genes que se encuentran regulados por el promotor del citomegalovirus (CMV).

4.4.2.1. Análisis de la expresión de *TAP1A*, *TAP2A* y *TAP2B*

Con objeto de comprobar la expresión de los tres genes, se transfectaron los plásmidos en células HEK-293. Esta aproximación experimental permitió poner a punto los anticuerpos disponibles para su posterior uso en la caracterización de los ratones transgénicos.

Para comprobar la especificidad de los anticuerpos que reconocen la proteína TAP2, se utilizaron las líneas de linfoblastos AG10598, homocigota para *TAP2A* y la línea AG09182, homocigota para *TAP2B*. Además la línea de linfoblastos T2 se utilizó como control negativo de la expresión. La puesta a punto de estos anticuerpos se realizó mediante *Western-Blot* como se muestra en la figura R35. Mediante este estudio se comprobó que los anticuerpos monoclonales anti-TAP2-429 y anti-TAP2-435 (amablemente cedidos por el Dr. Van Endert) reconocen los dos polimorfismos de *TAP2* independientemente, mientras que el anticuerpo comercial anti-TAP2B, tan solo reconoce la isoforma *TAP2B*.

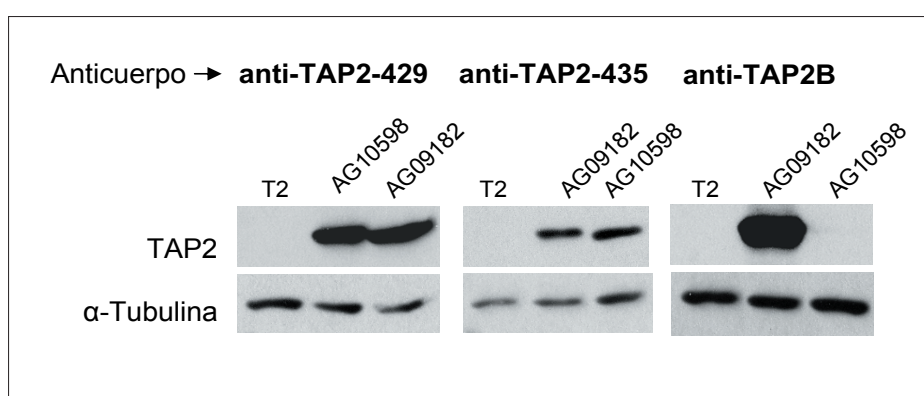


Figura R35. Inmunodetección de la proteína TAP2 en líneas de linfoblastos. Se utilizaron los anticuerpos anti-TAP2-435, anti-TAP2-429 y anti-TAP2B (tabla MM1) para detectar la proteína TAP2 de aproximadamente 75 KDa de peso molecular.

En la figura R36, se muestra una autorradiografía representativa de un *Western-Blot* donde se analizó la expresión de la proteína TAP1 detectada con el anticuerpo anti-TAP1h, y de TAP2A y TAP2B, con el anticuerpo anti-TAP2-435 en células HEK293 transfectadas con las construcciones generadas. Aunque la línea celular HEK293 expresa los genes *TAP1* y *TAP2*, cuando se analizaron

los lisados de las células transfectadas con pcDNA3-EGFP como control, no se detectaron ninguna de las dos proteínas, lo que indica que estas células tienen una baja expresión basal. En las células transfectadas con las construcciones pcDNA3-*TAP1A*, pcDNA3-*TAP2A* y pcDNA3-*TAP2B*, se pudo comprobar que hay una fuerte sobreexpresión de los tres genes clonados en relación a los niveles endógenos de proteína. Además, se incluyó un lisado de linfoblastos T2, una línea defectiva para los genes *TAP1* y *TAP2*, que confirma la especificidad de los anticuerpos.

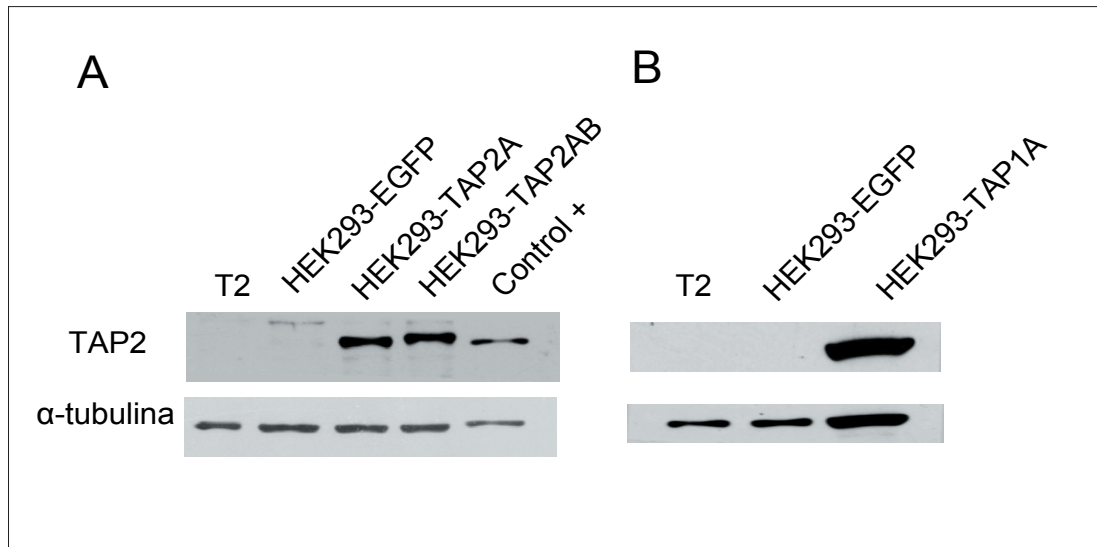


Figura R36. Inmunodetección de la proteína TAP2 en células transfectadas con las construcciones pcDNA3-*TAP1A*, pcDNA3-*TAP2A* y pcDNA3-*TAP2B*. Células HEK293 fueron transfectadas con las tres construcciones. A las 48 horas se recogieron las células y se extrajeron las proteínas. En A, se utilizó el anticuerpo anti-TAP2-435 para detectar por *Western-Blot* la proteína TAP2 de aproximadamente 75KDa de peso molecular. Se utilizó como control negativo la línea de linfoblastos T2 defectiva en el gen *TAP2* y como control de transfección el plásmido pcDNA3-EGFP. Como control positivo se utilizó una línea de linfoblastos que sobre-expresa *TAP2A*. En B, se utilizó el anticuerpo anti-TAP1h para detectar la proteína TAP1 de aproximadamente 71 KDa de peso molecular. Como control negativo se incluyó un lisado de linfoblastos T2 y el control de la transfección. En ambos casos se normalizó con α -tubulina.

Con esta serie de experimentos se han puesto a punto las herramientas necesarias para la detección específica de las proteínas TAP1 y TAP2A y TAP2B que serán necesarias para futuros estudios. En todos los casos los anticuerpos demostraron ser específicos para cada proteína puesto que en ningún caso se revelaron bandas inespecíficas en los lisados de linfoblastos T2 (línea deficiente en *TAP1* y *TAP2*). Los anticuerpos anti-TAP2-435 y anti-TAP2-429 permitieron la detección de las dos isoformas de TAP2 indistintamente, como se pudo comprobar tanto en lisados de células transfectadas (figura R35), como en lisados de linfoblastos (figura R36), mientras que el anticuerpo anti-TAP2B reconoce específicamente la isoforma *TAP2B*.

4.4.3. Microinyección de los vectores MoPrP.*TAP1A*, MoPrP.*TAP2A* y MoPrP.*TAP2B*

La generación de los ratones transgénicos se realizó mediante la microinyección de los tres vectores MoPrP.*TAP1A*, MoPrP.*TAP2A* y MoPrP.*TAP2B*, en ovocitos de ratones C57BL/6J para generar las tres líneas simples que expresaran individualmente cada uno de los genes.

Las microinyecciones de estos vectores fueron realizadas por la empresa Afigen (España) mediante las técnicas clásicas de microinyección (Gordon et al., 1980). En los tres casos, se eliminó del vector MoPrP.Xho el fragmento correspondiente al plásmido pBlueScript (figura MM1) mediante digestión con la enzima de restricción *NotI*. De este modo se microinyectó únicamente la región correspondiente a la secuencia reguladora de la proteína prión seguida del transgén.

Se utilizaron ovocitos procedentes de una cepa de fondo mixto CBA y C57BL/6J, donde se inyectaron las construcciones. Éstos se implantaron posteriormente en los oviductos de hembras pseudo-preñadas C57BL/6J, generándose de este modo las tres líneas transgénicas que hemos denominado B6.CBA-*TAP1A*, B6.CBA-*TAP2A* y B6.CBA-*TAP2B* en fondo genético mixto CBA y C57BL/6J.

4.4.4. Obtención de una línea congénita C57BL/6J deficiente en *tap1*

Para poder analizar el efecto de la presencia de cada una de las isoformas de *TAP2* es necesario evitar la variabilidad derivada de un fondo genético mixto. El complejo TAP desempeña una función fundamental dentro del sistema inmune puesto que interviene en el proceso de presentación de antígenos. Concretamente, se ha descrito que las distintas cepas de ratón difieren en los genes responsables de la inmunidad (Lopez, 1975), de modo que en este estudio es altamente necesario disminuir la variabilidad genética inherente a una cepa de fondo genético mixto. Mediante el cruce de los ratones transgénicos (originalmente mixtos, CBA-C57BL/6) con la línea C57BL/6J (figura R37A) se obtuvo una línea congénita que evitará posibles diferencias en la respuesta de estos animales debidas a la variabilidad genética, pudiéndose así discriminar el efecto de las isoformas de *TAP2* sobre los procesos de infección. Durante un periodo de 2 años, se realizaron al menos 6 cruces con ratones C57BL/6J obteniéndose una línea congénita incipiente con un 98.4% de fondo genético C57BL/6J (figura MM4).

Además, en los dos últimos cruces realizados, los ratones transgénicos se cruzaron con ratones deficientes en *tap1* B6.129S2-*Tap1*tm1Arp/J (figura R37B) con objeto de obtener ratones transgénicos en ausencia del gen murino *tap1*, lo que además permitió aumentar la proporción de fondo genético C57BL/6J hasta un 99.6%. Estas líneas fueron denominadas como:

- B6.CBA-*TAP1A*(*tap1*^{-/-})
- B6.CBA-*TAP2A*(*tap1*^{-/-})
- B6.CBA-*TAP2B*(*tap1*^{-/-})

Las camadas de ratones fueron genotipadas en cada cruce con distintas parejas de oligonucleótidos (figura MM4 y MM5). Además, se realizó un análisis de la expresión de *TAP1A* en extractos de cerebro mediante *Western-Blot*, o de RT-PCR, en el caso de *TAP2A* y *TAP2B* en cada generación. Los animales seleccionados para este análisis fueron hermanos de camada de los progenitores del siguiente cruce y una vez obtenida su progenie, los mismos progenitores fueron sacrificados y analizada la expresión del transgén.

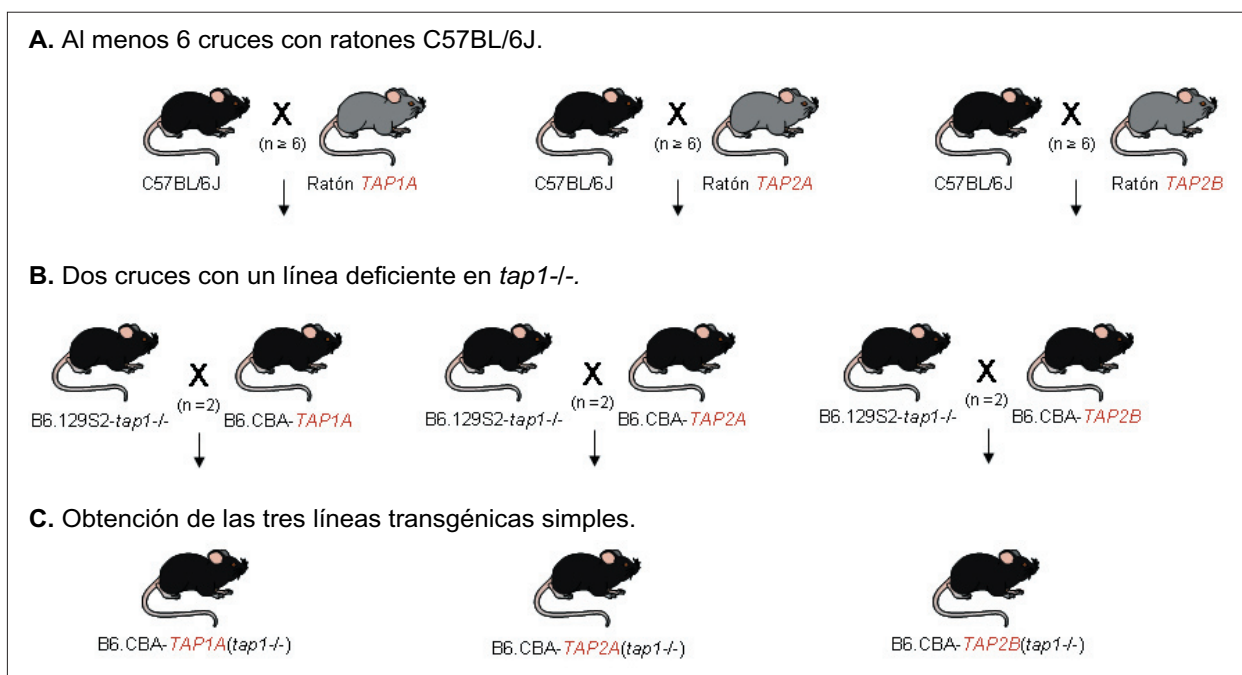


Figura R37. Esquema de la generación de ratones transgénicos B6.CBA-*TAP1A*(*tap1*^{-/-}), B6.CBA-*TAP2A*(*tap1*^{-/-}) y B6.CBA-*TAP2B*(*tap1*^{-/-}). (A) se llevaron a cabo al menos 6 cruces con la línea consanguínea C57BL/6J para obtener ratones en fondo genético C57BL/6. (B) mediante cruces con una línea deficiente en *tap1* se obtuvieron las tres líneas transgénicas simples (C).

4.4.5. Caracterización de la expresión de los ratones transgénicos

Una vez generadas las tres líneas transgénicas simples se procedió a la caracterización de la expresión de los transgenes en los ratones obtenidos en el último cruce con ratones deficientes en *tap1* murino (figura R37).

4.4.5.1. Análisis de la expresión de *TAPIA* en los ratones B6.CBA-*TAPIA*(*tap1*^{-/-})

Para el análisis de la expresión de *TAPIA* se midieron los niveles de expresión de la proteína TAP1 mediante la técnica de *Western-Blot*. Para ello se utilizaron las condiciones previamente optimizadas para el anticuerpo anti-TAP1 (como se describe en el apartado 4.4.2.1).

En la figura R38A se muestra un *Western-Blot* representativo de la expresión en las cuatro regiones del encéfalo, en la médula espinal y en los ganglios trigéminos. Como control positivo se utilizó un extracto de células transfectadas con la construcción pcDNA3-*TAPIA*, donde se detectó la proteína TAP1 con un peso molecular de aproximadamente 71 KDa. Además se incluyeron como controles negativos un extracto de linfoblastos T2, deficiente en el gen *TAP1*, y un extracto de cerebro de un ratón salvaje, que demuestran la especificidad del ensayo.

El histograma (figura R38B) muestra la expresión relativa del transgén en el sistema nervioso. Los ganglios trigéminos y el *cerebelo* presentaron los niveles de expresión de *TAPIA* más altos, seguidos por la *corteza*, si bien el *mesencéfalo*, el *diencefalo* y la médula espinal mostraron una menor expresión del transgén (figura R38A).

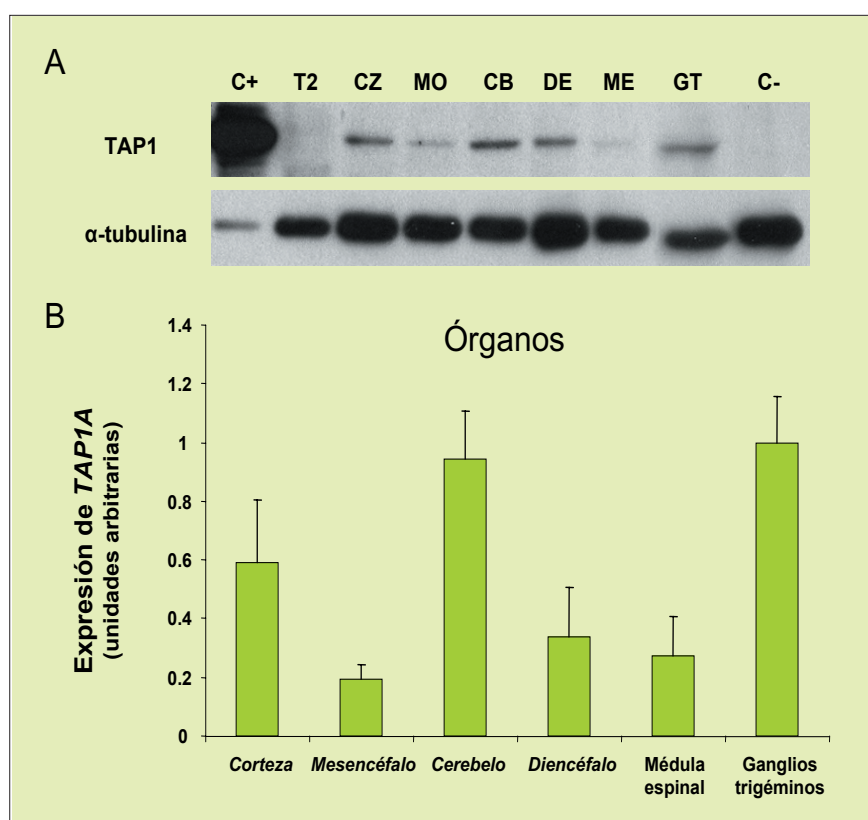


Figura R38. Expresión del transgén *TAPIA* mediante *Western-Blot* en los ratones B6.CBA-*TAPIA*(*tap1*^{-/-}). En A, se muestra un *Western-Blot* representativo con la banda correspondiente a la proteína TAP1, de aproximadamente 71 KDa en todos los órganos analizados. En B, el gráfico representa la cuantificación por densitometría de la expresión de TAP1. Las barras indican la media \pm SEM de expresión de *TAP1* en unidades arbitrarias. C+, control positivo; T2, linfoblastos T2; CZ, corteza; MO, mesencéfalo; CB, cerebelo; DE, diencefalo; ME, médula espinal; GT, ganglios trigéminos y C-, ratón salvaje.

Estos datos confirman la correcta expresión del transgén en el SN. No obstante para la completa caracterización del transgén se llevará a cabo un análisis de la presencia de la proteína TAP1 en otros órganos periféricos puesto que se ha descrito que este promotor también presenta actividad en otros tejidos (Bendheim et al., 1992; Kocer et al., 2007; Weber et al., 2003).

4.4.5.2. Análisis de la expresión de *TAP2A* y *TAP2B* en los ratones B6.CBA-*TAP2A*(*tap1*^{-/-}) y B6.CBA-*TAP2B*(*tap1*^{-/-})

Debido al mecanismo de regulación de la proteína TAP2, cuyos niveles no son detectables en ausencia de TAP1 (Keusekotten et al., 2006), se recurrió a la cuantificación de los niveles de expresión de mRNA mediante el sistema ABI Prism 7900HT SD[®] con una sonda específica para el gen *TAP2* humano (apartado 3.2.5.2.).

Como control positivo se incluyó el mRNA de células HeLa y como control negativo se utilizó mRNA de un ratón salvaje C57BL/6J que han demostrado la especificidad del ensayo frente al mRNA de *TAP2* humano, así como la ausencia de falsos positivos, respectivamente.

En la figura R39 se muestra un experimento representativo de la cuantificación relativa de la expresión del mRNA en el sistema nervioso de ratones B6.CBA-*TAP2A*(*tap1*^{-/-}), que expresan el gen *TAP2A*, y en B6.CBA-*TAP2B*(*tap1*^{-/-}) que expresan el gen *TAP2B*. Cada muestra se normalizó con respecto a un control endógeno para el gen *18s* de ratón.

El análisis de los ratones B6.CBA-*TAP2A*(*tap1*^{-/-}) mostró que la médula espinal fue la región de máxima expresión del transgén. Los niveles de expresión detectados en el encéfalo fueron muy homogéneos en las cuatro regiones analizadas. Del mismo modo, los ratones B6.CBA-*TAP2B*(*tap1*^{-/-}) presentaron un patrón de expresión muy similar, donde la médula espinal mostró máximos niveles, que fueron superiores a los detectados para el gen *TAP2A* en más de dos órdenes de magnitud. Asimismo, el encéfalo mostró niveles muy similares en las cuatro regiones analizadas y a su vez similares a los niveles detectados en el ratón B6.CBA-*TAP2A*(*tap1*^{-/-}).

La similitud en el patrón de expresión del mRNA en ambos ratones transgénicos sugiere que la regulación de los transgenes está siendo conducida por los mismos elementos, como cabía esperar al utilizarse el mismo vector de expresión. No obstante las diferencias observadas en relación a los niveles de expresión en la médula espinal podrían estar viéndose afectados por distintos elementos de regulación como consecuencia de la inserción diferencial en el genoma.

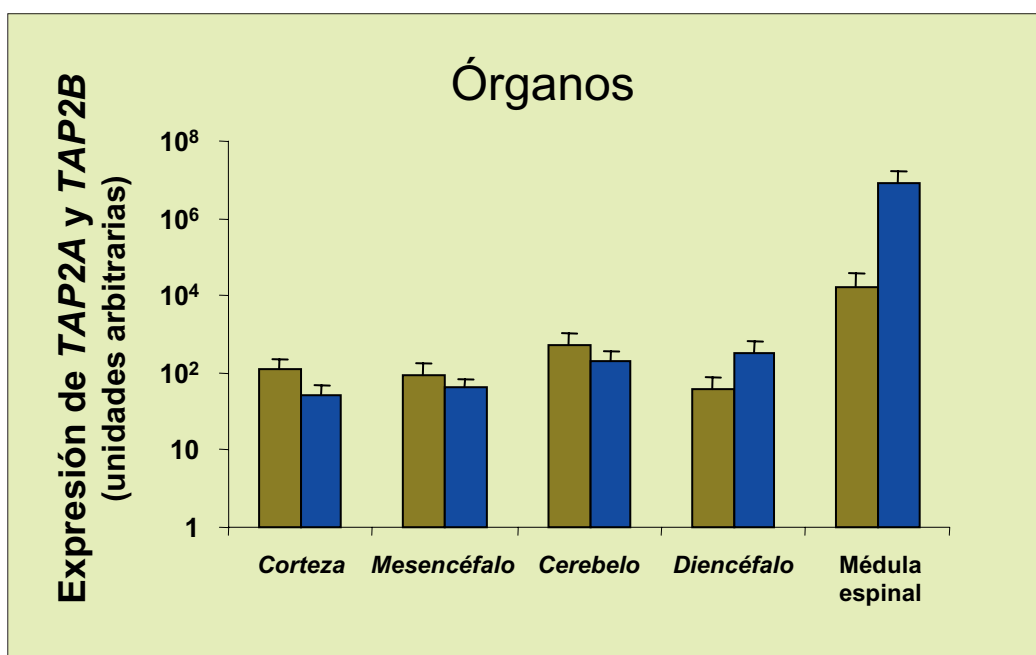


Figura R39. Expresión relativa los genes *TAP2A* y *TAP2B* en los ratones transgénicos B6.CBA-*TAP2A*(*tap1*^{-/-}) y B6.CBA-*TAP2B*(*tap1*^{-/-}). Las barras representan la cantidad relativa de mRNA expresada en unidades arbitrarias de los genes *TAP2A* y *TAP2B*. Como control endógeno se normalizó cada muestra frente al gen *18s* de ratón.

Estos resultados confirman la expresión del mRNA de *TAP2A* y *TAP2B* en ambas líneas transgénicas cuya caracterización se completará mediante el análisis de la expresión a nivel de proteína en los ratones dobles transgénicos generados en el cruce con los B6.CBA-*TAP1A*(*tap1*^{-/-}). La presencia de la proteína TAP1 humana presumiblemente permitirá la estabilización de la proteína TAP2 (Keusekotten et al., 2006) y la formación del complejo humano TAP1-TAP2. Mediante las herramientas puestas a punto previamente se podrá comprobar la expresión de *TAP2* mediante *Western-Blot*.

Estos resultados muestran la correcta expresión de los tres genes humanos en el sistema nervioso del ratón. Mediante el cruce de las líneas que expresan los polimorfismos de TAP2 con el ratón B6.CBA-*TAP1A*(*tap1*^{-/-}) se obtendrán dos ratones dobles que constituirán una buena herramienta, no solo para estudiar la interacción de TAP con el HSV-1, si no para abordar el estudio de otras enfermedades asociadas a TAP y a sus polimorfismos.

Discusión

5. Discusión

5.1. El virus herpes simplex tipo 1: un patógeno asociado a la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia, ya que afecta a 1 de cada 5 individuos mayores de 80 años (Kukull y Ganguli, 2000). Atendiendo a su etiología, la EA se clasifica en *familiar* (EAF), que corresponde a una minoría de los casos y que está causada por mutaciones en los genes de la proteína precursora del amiloide (*APP*) y de las presenilinas 1 y 2 (*PS-1* y *PS-2*) (Campion et al., 1999), y *esporádica* (EAE), que abarca a más del 99% de los casos y responde a un origen multifactorial donde confluyen tanto factores genéticos como ambientales (Corder et al., 1993). El mayor factor de riesgo genético para la EAE es el alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (*APOE- $\epsilon 4$*) (Corder et al., 1993). En cuanto a los factores ambientales, en los últimos años se ha postulado que un patógeno podría estar implicado en la patogénesis de la EAE (Zimmer, 2001). Otros factores asociados a la enfermedad son la edad (McDowell, 2001) o el género femenino (Turner, 2001).

El herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1) es un serio candidato para desempeñar un papel en la EAE y aunque la relación de este patógeno con la enfermedad aún queda lejos de estar establecida, numerosas evidencias apuntan a que existe una relación con esta enfermedad. La alta prevalencia de la enfermedad está en línea con la ubicuidad del herpes en la población, puesto que reside latentemente en el sistema nervioso (SN) del 90% de los individuos mayores de 70 años (Itzhaki y Wozniak, 2006). A principios de los años 80 se asoció por primera vez al HSV-1 con la EA, observándose que el virus infecta preferentemente las regiones que se ven más afectadas en esta demencia (Ball, 1982), como son la corteza frontal y temporal y las regiones del sistema límbico como el hipocampo y la amígdala (Spires y Hyman, 2005; Whitehouse et al., 1982). Daw y colaboradores sugirieron que un factor ambiental transmisible podría ser responsable de entre un 30 y un 70% de la varianza total de la enfermedad de Alzheimer que actuaría como un gen o conjunto de genes que se transmiten a la descendencia (Daw et al., 2000). En este sentido, en nuestro laboratorio se ha demostrado la transmisión vertical hematológica del HSV-1 de madre a hijos, de modo que el virus se encuentra en el SNC desde antes del parto (Burgos et al., 2006b). En este trabajo también se demostró que el virus infecta el hipocampo, la región principalmente afectada en la EA, desde donde puede reactivarse tras estímulos de estrés.

Otro hecho destacable es la correlación entre los procesos histopatológicos característicos de la EA, como los ovillos neurofibrilares y las placas seniles, y el HSV-1. La progresión de la aparición de estos procesos patológicos sigue un patrón de dispersión “anterógrado” similar al que se ha descrito para la infección del HSV-1 (Hill et al., 2005). Sin embargo, aún queda por establecerse la relación del virus con el péptido β -amiloide ($A\beta$) aunque se ha observado que la glicoproteína B (gB) contiene una región que presenta una alta homología con el $A\beta$ (Leissring et al., 1998). Estos dos péptidos comparten varias características como son la capacidad de formar fibrillas y promover la muerte neuronal (Cribbs et al., 2000). De hecho esta región de la gB es uno de los dominios que se han implicado en su unión con APOE (Huemer et al., 1998).

Los trabajos más consistentes que implican al HSV-1 en la patogénesis de la EA fueron realizados por el grupo de Itzhaki, demostrando que la combinación de la presencia del virus en el cerebro junto con la posesión del alelo *APOE- ϵ 4* confiere un mayor riesgo para la enfermedad que cada uno de estos factores independientemente (Itzhaki y Lin, 1998; Itzhaki et al., 1997). Aunque estos resultados son puramente epidemiológicos, datos de nuestro laboratorio han demostrado que el *APOE- ϵ 4* es determinante en la infección hematogena del HSV-1 permitiendo una mayor colonización del SNC durante la fase aguda en relación al alelo *APOE- ϵ 3* (Burgos et al., 2003) lo que provoca la presencia de una mayor carga viral durante la fase de latencia (Burgos et al., 2006c). Así pues, el *APOE- ϵ 4* permite mayores cargas virales de HSV-1 en el sistema nervioso que harían más susceptible al individuo a la enfermedad. Además, los cerebros de enfermos de alzhéimer presentan un estado de inflamación crónica localizado en las regiones afectadas en la demencia (McGeer y McGeer, 2002) que podría ser una consecuencia de la presencia del HSV-1. De este modo, la relación de la eficiencia de la respuesta inmune con la presencia del HSV-1 en el cerebro podría condicionar el riesgo a sufrir esta demencia. Por ello, es necesario ahondar en los mecanismos de evasión del sistema inmune y de la neuroinfección por HSV-1, para lo cual es imprescindible la utilización de modelos animales de experimentación que nos permitan investigar los aspectos clave de la patobiología del HSV-1.

5.2. Modelos animales para el estudio de la neuroinfección del HSV-1

Los modelos animales son una aproximación experimental válida que permiten llevar a cabo un análisis completo de la infección del HSV-1. En este escenario se pueden analizar fenómenos complejos como el estudio del sistema inmune en un contexto fisiológico.

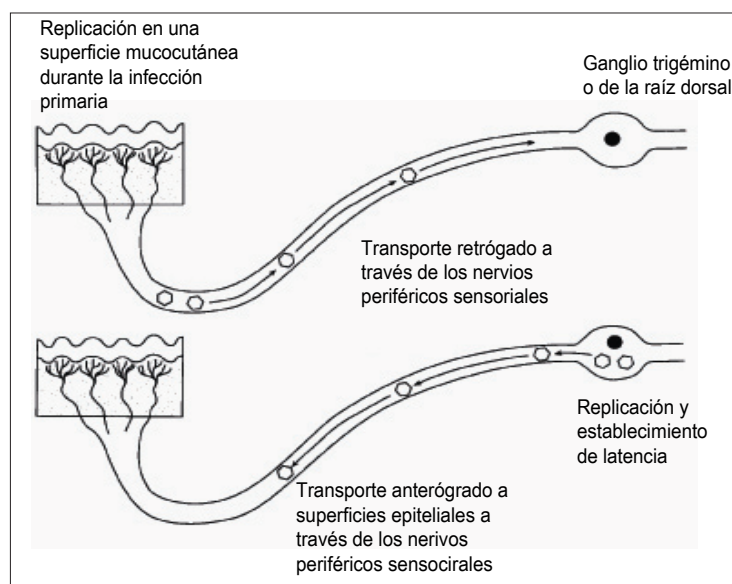
El HSV-1 presenta un amplio rango de hospedadores que permiten que se desarrolle la infección (tanto a nivel de primoinfección como en el establecimiento de latencia o en la reactivación). Además,

este virus ha desarrollado complejos mecanismos que establecen una relación muy específica con su hospedador natural. Este hecho implica que no existe ningún modelo que mimetice completamente la infección en humanos. Sin embargo, se ha demostrado que modelos animales como el ratón, la rata, el conejo, la cobaya o el mono son válidos para el estudio de la infección del HSV-1 (Kern, 1999; Norgren y Lehman, 1998).

En este trabajo se ha utilizado el ratón como modelo experimental puesto que es el más ampliamente utilizado, ya que existe una gran cantidad de información en la bibliografía que permite comparar los resultados obtenidos. Hay que destacar que el modelo murino supone una gran ventaja frente a otros animales, que consiste en la utilización de líneas transgénicas, lo que permite ahondar en la relación de factores genéticos humanos en la infección del HSV-1. Además, la utilización de un número de animales suficiente puede aportar valor estadístico a los resultados.

Para el estudio de la patobiología del HSV-1 se utilizan modelos basados en las rutas de infección neural o hematogena, que concuerdan con los procesos que se dan en la primoinfección en humanos (Whitley, 1996). El HSV-1 normalmente utiliza una ruta neural para la infección, sin embargo la ruta hematogena resulta de especial relevancia en neonatos e individuos inmunosuprimidos (Arvin et al., 1982; Kimura et al., 2002; Montgomerie et al., 1969). Durante el presente estudio se han utilizado modelos de infección del HSV-1 basados en varias vías de inoculación que siguen una ruta neural, mediante la inoculación *intranasal* (Johnson, 1964; Tomlinson y Esiri, 1983) y de *abrasión del morro* (Esiri y Tomlinson, 1984; Kristensson et al., 1978), y una ruta hematogena, mediante las vías *intraperitoneal* (Burgos et al., 2002a; Johnson, 1964) e *intravenosa* (Aita y Shiga, 2004).

La infección neural es la más común en humanos. El HSV-1 infecta la mucosa facial desde donde coloniza las neuronas periféricas por donde viaja hasta los ganglios trigéminos y desde ahí

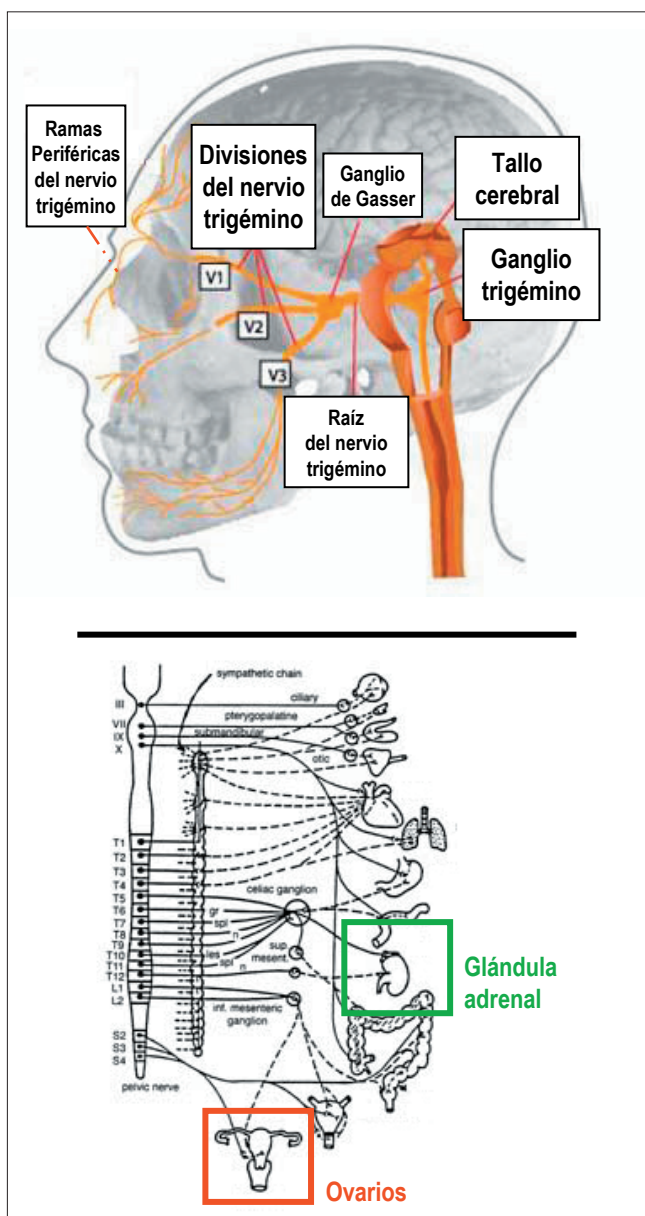


hasta regiones más profundas del encéfalo (Whitley, 1996) (figura D1). Los trabajos realizados por Esiri y Tomlinson muestran que en las vías intranasal y de abrasión del morro el virus sigue un patrón de distribución similar (Esiri

Figura D1. Diagrama esquemático de la primoinfección del HSV-1 en la ruta neural. Imagen adaptada de (Whitley y Roizman, 1998).

y Tomlinson, 1984; Tomlinson y Esiri, 1983). Los datos obtenidos en este trabajo confirman esta similitud en las vías atendiendo a la distribución viral donde se ven afectadas las mismas regiones cerebrales. Se ha sugerido que existe una conexión entre las prolongaciones periféricas del nervio trigémino (Davis y Johnson, 1979) que provoca que en ambas vías se compartan los mismos canales de acceso al ganglio trigémino y a otras regiones del encéfalo como los bulbos olfatorios (Barnett et al., 1993; Stroop et al., 1984) (figura D2). No obstante, estas dos vías muestran diferencias en la eficiencia de la colonización del SN, ya que la vía intranasal presenta mayores cargas virales que la de abrasión del morro y niveles de enfermedad más altos.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la secuencia de infección tras inoculaciones neurales responde a una distribución retrógrada a través de las conexiones anatómicas de las distintas regiones del cerebro. Tras la inoculación en la mucosa facial (por abrasión del morro) o a través del tracto olfatorio, el virus alcanza el ganglio trigémino por las distintas ramas del nervio trigémino (Davis



y Johnson, 1979) (figura D2). La conexión del ganglio con el tallo cerebral (Kristensson et al., 1982) permite el acceso del virus al sistema nervioso central (SNC). En esta ruta de infección el HSV-1 infecta principalmente los ganglios trigéminos y el *mesencéfalo*, donde se encuentra el tallo cerebral. Desde aquí se produce la colonización de regiones más profundas del cerebro como el *diencéfalo*, donde se encuentran el hipotálamo y el tálamo. La conexión del tálamo con la *corteza* y el *cerebelo* (Barnett et al., 1995) permiten la continuación de la ruta hasta zonas más distales del encéfalo. Posteriormente la ruta de infección continúa a través de las neuronas pre y post-ganglionares que inervan los órganos periféricos como el ovario o la

Figura D2. Esquema representativo de las conexiones anatómicas entre el sistema nervioso y órganos periféricos en la ruta de infección neural.

glándula adrenal (Nachtigal y Caulfield, 1984) (figura D2). Se ha descrito que la médula adrenal está conectada con el hipotálamo (Hill et al., 1986) y es precisamente a través de estos órganos desde donde el virus alcanza finalmente el torrente sanguíneo, lo que podría explicar la alta seroprevalencia del HSV-1 en la población (Whitley y Grann, 1993).

En el estudio de la patobiología del HSV-1 *in vivo*, la ruta de infección es un factor determinante. Dix y colaboradores observaron que la virulencia mostrada por distintas cepas podría ser debida a la vía de inoculación empleada, lo cual determinaría su relación con el sistema inmune o el acceso del herpes al SN (Dix et al., 1983). Así pues, la ruta parece condicionar la eficiencia de la infección. En este sentido los resultados de Miller y Federoff indican que el alelo *APOE-ε4* no influye en la colonización del SN tras una ruta neural (Miller y Federoff, 2006) mientras que ha sido ampliamente demostrado que esta isoforma es determinante en la ruta hematógica (Burgos et al., 2005; Burgos et al., 2002a; Burgos et al., 2003; Burgos et al., 2006b). Por este motivo, en el presente trabajo se ha realizado también un estudio de la ruta hematógica mediante modelos de inoculación intravenosa e intraperitoneal. Previamente en nuestro laboratorio se ha estudiado la vía intraperitoneal (Burgos et al., 2002a; Ramírez, 2006), confirmándose como una vía puramente hematógica (Burgos et al., 2002a; Johnson, 1964) con características similares a la infección por vía intravenosa (donde el virus es depositado directamente en la sangre), tanto en la sintomatología como en la infección del organismo.

El estudio llevado a cabo en esta tesis sobre las rutas neural y hematógica, junto con datos previos del laboratorio (Burgos et al., 2002a; Burgos et al., 2006b; Ramírez, 2006), permiten realizar un análisis comparativo de ambas rutas de infección.

Durante la fase aguda las diferencias entre las dos rutas se hacen evidentes de una forma macroscópica, puesto que los ratones infectados mostraron síntomas de enfermedad diferentes en función de la ruta utilizada por el virus. Además la ruta hematógica tiene asociada una mayor mortalidad, de modo que esta ruta sitúa al hospedador en condiciones de mayor susceptibilidad a la infección. En la ruta neural los ratones desarrollan un proceso de encefalitis que puede estar provocado por la actuación de células del sistema inmune en regiones rostrales, como los bulbos olfatorios, que corresponden al acceso del virus al SN a través de las prolongaciones periféricas del nervio trigémino. Sin embargo, sólo ocasionalmente la enfermedad progresa con escoliosis, ataxia e hipotermia como síntomas previos a la muerte del animal. Este cuadro de síntomas coincide con los observados en los ratones infectados por la ruta hematógica, sugiriendo que las regiones afectadas

en la infección hematogena son ocasionalmente alcanzadas en la infección neural. El análisis de la cinética de infección neural muestra una secuencia de colonización inversa a la mostrada por la ruta hematogena, que explica la progresión de la enfermedad en la ruta neural, afectando en primer lugar a regiones rostrales y posteriormente al mesencéfalo y a la médula espinal.

Además de las diferencias en la sintomatología, la ruta hematogena presenta una alta mortalidad en comparación con la neural, donde sólo ocasionalmente se produce la muerte del animal. Estas observaciones se correlacionan con una mayor carga viral alcanzada en el SN de ratones infectados a través de la ruta hematogena, de modo que la adquisición del virus por esta ruta sitúa al hospedador en condiciones de mayor susceptibilidad a la infección.

Durante la fase de latencia las cargas virales detectadas fueron siempre significativamente mayores tras la infección hematogena que tras la inoculación neural [comparación con (Burgos et al., 2006b; Ramírez, 2006)]. Además la distribución viral también se ve influenciada por la ruta en esta fase de la infección. Tras la inoculación neural el virus se encuentra exclusivamente en el *mesencéfalo* y en los ganglios trigéminos, que se confirman como regiones preferenciales para el establecimiento de latencia tras la infección neural (Cabrera et al., 1980; Chen et al., 2006), mientras que en la hematogena el herpes establece latencia en diversas regiones del SN. Estos resultados sugieren que las mayores cargas virales consecuencia de la infección hematogena permiten al HSV-1 establecer latencia en regiones que no son accesibles en la infección neural. Se ha demostrado que la carga viral está correlacionada con la capacidad de reactivación del herpes *in vivo* (Sawtell et al., 1998), de modo que tras la infección hematogena el virus verá aumentada su frecuencia de reactivación, y además, debido a que en esta ruta se ven afectadas un mayor número de regiones del SN, esta reactivación presumiblemente será más frecuente y más peligrosa para el hospedador.

A pesar de la menor cantidad de virus en los ratones infectados a través de la ruta neural, el HSV-1 llega a detectarse en la sangre independientemente de la ruta utilizada y correlaciona de forma habitual con la carga viral detectada en los ganglios trigéminos. Se ha propuesto que la presencia del virus en sangre es consecuencia de reactivaciones puntuales (Feldman et al., 2002), lo que explicaría que en la ruta hematogena, donde hay mayor carga viral en el SN, se produzca una mayor presencia del DNA viral en sangre.

El análisis comparativo de las dos rutas de infección demuestra que existen diferencias en la sintomatología, en la carga y en la distribución virales que sugieren que se podrían producir distintos procesos patológicos como consecuencia del lugar de primoinfección (Johnson, 1998; Whitley, 1996).

Otro de los factores determinantes en la infección es la cepa de HSV-1 utilizada, ya que las distintas variantes en los genes virales condicionaría su interacción con factores del hospedador, haciendo más o menos eficiente el proceso de infección. Los datos sobre las diferencias entre las distintas cepas de HSV-1 son escasos en la bibliografía. En este trabajo se han utilizado dos cepas comúnmente empleadas en experimentación: KOS y F. En un estudio filogenético reciente se han clasificado en dos grupos distintos en función de variaciones en las glicoproteínas que se encuentran en la región Us del genoma viral (Norberg et al., 2004).

Los datos obtenidos en esta tesis demuestran que las cepas KOS y F presentan un comportamiento diferencial atendiendo a la virulencia asociada a la infección, con independencia de la ruta utilizada. Sin embargo, las diferencias entre las dos cepas son más significativas en la ruta hematógena, puesto que la cepa F no produce en ningún caso signos de enfermedad tras la infección hematógena (en ninguna de las condiciones ensayadas) mientras que la cepa KOS presenta un alto porcentaje de mortalidad. En la ruta neural las diferencias entre KOS y F son de menor magnitud puesto que las dos producen los mismos síntomas de encefalitis, si bien la cepa KOS afecta a un mayor porcentaje de animales. Estos resultados concuerdan con los trabajos de Dix y colaboradores, donde la vía de inoculación parece tener un papel preponderante frente a la cepa utilizada (Dix et al., 1983). La virulencia de las distintas cepas está determinada por la capacidad replicativa del virus, el acceso al SN y su relación con el sistema inmune. En este sentido, las cepas KOS y F difieren en la secuencia de la glicoproteína B (Neumann et al., 2003) que se ha demostrado que interviene en la evasión del sistema inmune mediante su unión a las moléculas del MHC-II, lo que provoca el bloqueo de la vía de presentación de antígenos en células presentadoras. Por tanto, las diferencias entre KOS y F se producirán sobre todo a nivel de la evasión de los linfocitos T CD4⁺, que juegan un papel en regiones periféricas (Schmid y Rouse, 1992) siendo por tanto más evidentes sus diferencias tras una ruta de infección hematógena.

La virulencia de las cepas virales, así como el proceso de infección como consecuencia de la ruta utilizada, depende en gran medida de la relación del virus con componentes del sistema inmune (Schmid y Rouse, 1992). De igual modo, el estatus inmunológico del hospedador es decisivo en la regulación de los procesos de infección como ocurre en individuos inmunosuprimidos y en neonatos, donde el sistema inmune aún no está completamente desarrollado (Vollstedt et al., 2003), lo que permite que el HSV-1 siga una ruta hematógena de infección que podría producir patologías más severas. De este modo los individuos más vulnerables a la infección serán aquellos que muestren un

bajo estatus inmunológico, debido a numerosas causas, donde cabe destacar el declive del sistema inmune en individuos de edad avanzada (Dobson y Itzhaki, 1999) o mutaciones en factores genéticos, causando entonces la salida del virus del estado de latencia y la correspondiente reactivación.

5.3. La evasión del sistema inmune: un proceso clave en los procesos de infección viral

El sistema inmune se divide comúnmente en dos ramas: la inmunidad innata y la adaptativa. Ante una infección viral la respuesta innata actúa con mayor rapidez, donde intervienen tanto células como los macrófagos, y mediadores solubles como los componentes del complemento. Posteriormente se activa la respuesta adaptativa mediada por anticuerpos y células como los linfocitos T y B. El HSV-1 ha desarrollado mecanismos para evadir al sistema inmune del hospedador que afectan tanto a la respuesta innata como a la adaptativa (Hill et al., 1995; Lubinski et al., 2002; Neumann et al., 2003; Raftery et al., 1999; Yuan et al., 2006) (figura D3) lo que permite que la primoinfección por este virus sea de carácter asintomático (Whitley, 1996). De igual modo, el sistema inmune interviene en el mantenimiento de la latencia y en la contención de la reactivación viral (Decman et al., 2005; Miller et al., 1998), sin embargo, los mecanismos que rigen esta relación son menos conocidos. Se ha demostrado que los linfocitos T CD8⁺ o citotóxicos y las citoquinas de ellos derivadas, están implicados en el mantenimiento de la latencia del HSV-1 (Decman et al., 2005). Además, existe una relación entre procesos de estrés que afectan al sistema inmune y a la reactivación del herpes (Anglen

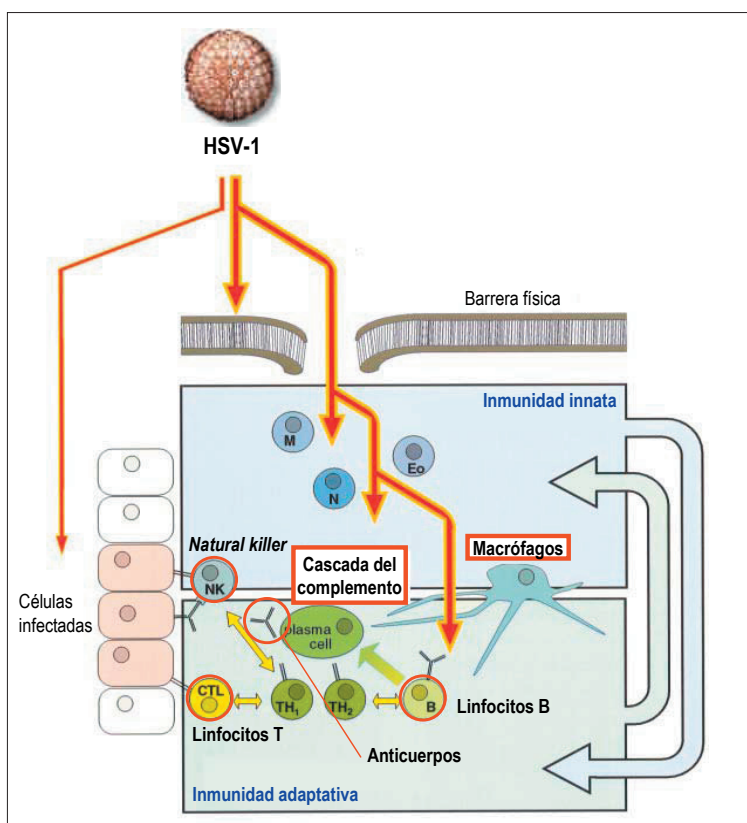


Figura D3. Mecanismos de evasión del sistema inmune utilizados por el HSV-1. Se muestran en rojo los componentes del sistema inmune innato y adaptativo con los que interfiere el HSV-1. Imagen adaptada de (Ploegh, 1998).

et al., 2003), de modo que la evasión de la vigilancia del sistema inmune será clave en la infección del HSV-1 tanto en la primoinfección como en la reactivación.

El transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP) es una pieza clave en la vía de presentación de antígenos por el MHC-I. Estas moléculas son las encargadas de presentar los péptidos virales generados en las células infectadas a los linfocitos T CD8⁺ (York et al., 1994). Por tanto, la modulación de TAP influye en la expresión de las moléculas del MHC-I en la superficie celular como demuestran varios estudios que correlacionan mutaciones que provocan una menor expresión de TAP con los bajos niveles de MHC-I [para una revisión (Lankat-Buttgereit y Tampe, 2002)]. Estas mutaciones se han relacionado con enfermedades de carácter auto-inmune que demuestran el papel fundamental de TAP en la regulación de la respuesta inmunológica (Fu et al., 1998; Gadola et al., 2000).

5.3.1. ICP47, la respuesta viral que bloquea TAP

La proteína viral ICP47, codificada por el gen de expresión inmediatamente temprano Us12, bloquea específicamente la ruta de procesamiento de antígenos acoplada al MHC-I mediante la inhibición del complejo TAP (York et al., 1994). Como consecuencia se produce una disminución de las moléculas de MHC-I en la superficie celular que permite al HSV-1 evadir la vigilancia de los linfocitos T CD8⁺. Este mecanismo de evasión del sistema inmune será particularmente importante en aquellas regiones donde la actuación de estos linfocitos juegue un papel importante, como ocurre en el SN (Schmid y Rouse, 1992). Goldsmith y colaboradores demostraron que tras una ruta de infección ocular (en ratones BALB/c) virus deficientes en ICP47 eran capaces de recuperar su neurovirulencia en ausencia de linfocitos CD8⁺ (Goldsmith et al., 1998). No obstante, en este trabajo no fueron exploradas otras rutas de infección, ni la relación de esta proteína viral con el complejo murino TAP.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que los virus deficientes en la proteína viral ICP47 son menos invasivos que la cepa salvaje HSV-1 F. Por tanto, la proteína ICP47 resulta necesaria para la infección, ya que el virus defectivo no es capaz de invadir ninguno de los órganos analizados.

Cuando se analizó la intervención de tap1 en la infección del HSV-1, se observó que la ausencia de TAP no provoca ninguna alteración en la invasividad de este virus, indicando la irrelevancia del TAP en la infección sistémica del HSV-1. Este efecto es consecuencia posiblemente de la baja afinidad de ICP47 por el complejo murino (Ahn et al., 1996).

El análisis de los dos factores, ICP47 y tap1, se completó mediante la combinación de la infección del virus defectivo en ICP47 en ausencia de la proteína tap1. En estas condiciones, este virus es capaz de recuperar su infectividad, pero de forma restringida al sistema nervioso. Además, este efecto de recuperación aumenta en las regiones más próximas al encéfalo, de modo que en la médula espinal se aprecia una tendencia a la recuperación de la infección sin llegar a ser completa, mientras que en el encéfalo la recuperación de la infección es completa. Los ganglios trigéminos mostraron un comportamiento similar al observado en el encéfalo, lo que sugiere que el patrón de expresión del MHC-I probablemente sea similar a éste (Simmons y Tschärke, 1992).

Estos resultados indican que TAP desempeña un papel crítico en la infección del sistema nervioso. En ausencia del transportador se produce una recuperación de la neuroinvasión del virus defectivo en ICP47, sugiriendo la interacción entre estas dos proteínas y confirmando lo propuesto en estudios *in vitro* (Aisenbrey et al., 2006). La recuperación de la infección del virus defectivo en ausencia de TAP en, al menos, el SNC demuestra la integridad del virus para aquellos fenómenos no relacionados con ICP47, y hace innecesario el uso de un virus revertiente de la mutación en ICP47.

5.3.2. TAP: una proteína encargada de la respuesta inmune

Las diferencias en la infección del HSV-1 en función de la presencia/ausencia de ICP47 en el SN podrían deberse a dos factores: la especificidad de tejido, o a las diferencias en los niveles de tap1. De hecho, existen evidencias de que las células humanas presentan diferente sensibilidad a ICP47 en función del nivel de expresión de *tap1* (Tomazin et al., 1996).

Para discriminar entre estas dos posibilidades, se han analizado los niveles de *tap1* en el encéfalo y en la glándula adrenal, dos órganos que exhiben un comportamiento radicalmente diferente en la infección y que además tienen distinta procedencia embrionaria. Los niveles basales de *tap1* entre estos dos tejidos difieren en más de dos órdenes de magnitud, sugiriendo que los tejidos que expresan menores niveles de *tap1*, como ocurre en el encéfalo, son más vulnerables a la infección por HSV-1.

Estos dos órganos, a pesar de mostrar una gran diferencia en los niveles basales de *tap1* como consecuencia de la infección, presentan un comportamiento similar atendiendo a la sobreexpresión de *tap1*. De hecho, los niveles de tap1 aumentaron en al menos cuatro veces como consecuencia de la infección tanto en la glándula adrenal como en el encéfalo. Los ratones infectados con el virus defectivo en ICP47 no presentan un aumento en los niveles de *tap1* en el encéfalo, si bien en la glándula adrenal este incremento es muy leve. Este hecho es probablemente debido a la baja infectividad de este virus

antes que a una activación directa de la expresión de *tap1* por parte de ICP47. Se ha demostrado que como consecuencia de infecciones virales se producen citoquinas, como el IFN- γ , que provocan la sobreexpresión tanto de *tap1* como de las moléculas del MHC-I (Ayalon et al., 1998; Neumann et al., 1997). Así, la sobreexpresión de *tap1* parece ser un fenómeno generalizado que ocurre como consecuencia de una infección eficiente.

En conclusión, estos resultados sugieren que órganos como el encéfalo (donde se expresan bajos niveles de TAP) se encuentran en mayor riesgo de sufrir una infección eficiente, y que ésta provoca un aumento de la expresión de *tap1*, indicando la fina homeostasis entre el HSV-1 y la activación del sistema inmune. Asumiendo que existe una modulación similar de la vía de presentación de antígenos en ratones y en humanos, los efectos observados en la neuroinvasión se anticipan de mayor importancia en presencia del TAP humano, puesto que ICP47 se une con una afinidad 100 veces mayor al complejo humano que al murino (Ahn et al., 1996). De hecho, en un trabajo epidemiológico realizado en nuestro laboratorio se ha demostrado la asociación de un polimorfismo del gen *TAP2* con la enfermedad de Alzheimer (Bullido et al., 2007), donde los individuos homocigotos para el alelo *TAP2B*, en presencia de *APOE- ϵ 4*, presentan un riesgo de más de 14 veces de padecer esta enfermedad neurodegenerativa. Según los datos obtenidos en el presente estudio, el complejo TAP es una pieza fundamental en la respuesta del sistema inmune a la infección del SN por parte del HSV-1, de modo que ciertas isoformas de TAP podrían incrementar los niveles de virus en el SN aumentando el riesgo para padecer la enfermedad de Alzheimer. Además, estos polimorfismos podrían ser determinantes en la reactivación del virus desde la latencia, donde la afinidad de ICP47 por una variante alélica u otra podría condicionar la respuesta del sistema inmune a nivel de los linfocitos T CD8⁺, y así influir en la frecuencia o virulencia de la reactivación del HSV-1 en el SNC.

5.4. Generación de ratones transgénicos que expresan los genes del complejo TAP humanos

De la potencial relación del HSV-1 con la enfermedad de Alzheimer se deduce que los genes que regulan la respuesta inmune son fuertes candidatos a ser factores de riesgo para esta patología, puesto que influyen en el estatus inmunológico del hospedador. Los genes del complejo TAP se localizan en la región cromosómica 6p21, que se encuentra muy cerca de un locus consistentemente asociado a esta enfermedad neurodegenerativa en diversos estudios de ligamiento genético, pero donde no se ha determinado con exactitud cuáles pueden ser los genes responsables de dicha asociación (Bertram y Tanzi, 2004). En este sentido, como se ha indicado anteriormente se ha demostrado que

el polimorfismo *TAP2B* (en presencia del alelo *APOE-ε4*) constituye un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer (Bullido et al., 2007).

La generación de dos líneas transgénicas dobles que expresen el complejo TAP humano conteniendo diferencialmente al polimorfismo *TAP2B* frente al alelo mayoritario en la población, *TAP2A* (Faucz et al., 2000), permitirán llevar a cabo el estudio *in vivo* de la relación del HSV-1 con el complejo humano y así dilucidar cuáles son los mecanismos moleculares responsables de la asociación de estos polimorfismos con la enfermedad de Alzheimer. Además el efecto sumatorio de *TAP2B* y *APOE-ε4* se podrá estudiar en estos ratones puesto que en el ratón el gen ortólogo del *APOE* coincide con la variante $\epsilon 4$ en los residuos que determinan sus polimorfismos (Rajavashisth et al., 1985).

En el presente trabajo se ha demostrado que la relación del TAP murino e ICP47 es fundamental en la infección del sistema nervioso. No obstante, los efectos observados en la neuroinvasión serán presumiblemente más evidentes en presencia del TAP humano puesto que ICP47 muestra una afinidad 100 veces mayor en relación al complejo murino (Ahn et al., 1996), de modo que los ratones transgénicos generados son una herramienta muy útil para llevar a cabo un estudio de la relación de TAP humano con ICP47 en un contexto fisiológico, puesto que hasta el momento la relación de estos dos factores se ha desarrollado exclusivamente en modelos *in vitro* (Fruh et al., 1995; Jugovic et al., 1998; Tomazin et al., 1998; York et al., 1994).

Como se ha postulado en el apartado anterior, la base molecular de la asociación de *TAP2* con la enfermedad de Alzheimer podría ser debida a la relación de ICP47 con las diferentes variantes alélicas de *TAP2*, haciendo a los portadores de la isoforma *TAP2B* más vulnerables a la infección. Para la generación de estos ratones transgénicos se eligió una estrategia donde la expresión del transgén estuviera restringida al sistema nervioso puesto que la relación de ICP47 con TAP ha demostrado ser más relevante en este tejido. Además, el SN presenta especial relevancia en este estudio puesto que los ratones generados se utilizarán como modelo para abordar el análisis de un proceso neurodegenerativo como es el alzhéimer. Para su construcción se utilizó el vector de expresión neuronal MoPrP.Xho (Bendheim et al., 1992; Borchelt et al., 1996), en el que se mantienen el promotor y las secuencias reguladoras del gen murino de la proteína prión (*prnd*), así como las señales de procesamiento del mRNA, que aseguran la correcta expresión del transgén (Borchelt et al., 1996) presentando un patrón de expresión similar al del *prnd*.

Para un correcto estudio de los procesos de infección es necesaria la disminución de la variabilidad genética asociada a la cepa de ratón utilizada. De hecho, se ha demostrado que existen diferencias significativas en la respuesta a la infección del HSV-1 en función de la cepa de ratón utilizada (Halford et al., 2004; Kern, 1999; Lopez, 1975). Estas diferencias se deben en gran medida a variaciones en los genes del sistema inmune, en concreto al locus del complejo H-2 (homólogo al HLA humano), donde se encuentran los genes responsables de la presentación de antígenos, de modo que se ha minimizado la variabilidad asociada a los genes que influyen en el sistema inmune puesto que estos ratones constituyen una herramienta con la que se pretende abordar el estudio de dos polimorfismos del gen *TAP2*. Por tanto, durante un periodo de dos años se han llevado a cabo al menos 6 cruces con la línea congénita C57BL/6J que ha permitido obtener líneas transgénicas con un porcentaje de más del 98% de fondo genético C57BL/6J que se consideran líneas congénitas incipientes.

Adicionalmente, los dos últimos cruces se han realizado con la línea B6.129S2-*tap1^{tmlAtp}*/J (deficiente en el gen *tap1*) con objeto de eliminar el gen del *tap1* murino en los ratones transgénicos. Con su eliminación se pretende conseguir la expresión únicamente de complejos TAP de origen humano, excluyendo así interferencias en el proceso de translocación de péptidos al lumen del retículo endoplásmico por la presencia del complejo murino. No obstante, podría establecerse una situación donde se formaran complejos TAP híbridos murino-humano mediante la estabilización de *tap2* en presencia de la proteína humana TAP1, aunque la formación de este complejo sería presumiblemente menos eficiente, a pesar del alto grado de homología entre los genes de ambas especies. La detección de la proteína murina *tap2*, en el contexto de la ausencia del gen de *tap1*, sería indicativo de la estabilización de la proteína por parte de TAP1 humano como consecuencia del mecanismo de regulación descrito para la proteína *tap2* (Keusekotten et al., 2006).

Por último, el análisis de la expresión de los transgenes ha revelado la correcta expresión de las tres construcciones en el sistema nervioso central. Además, la comparación de los ratones B6.CBA-*TAP2A(tap1ko)* con B6.CBA-*TAP2B(tap1ko)* muestra un patrón homogéneo de expresión de *TAP2* de modo que en el momento de la generación de las líneas transgénicas dobles, los niveles y la distribución del complejo TAP será similar, permitiendo la realización de un estudio comparativo minimizando diferencias causadas por una expresión diferencial del complejo en el organismo.

Adicionalmente, se deberán realizar experimentos para completar la caracterización de las líneas transgénicas que afecten a la funcionalidad del complejo o el número de copias insertadas en

cada línea transgénica que podrían estar afectando al nivel de expresión.

La generación de los ratones transgénicos que expresen las distintas variantes del complejo TAP humano, en relación a los polimorfismos del gen *TAP2*, permitirá la obtención de las herramientas necesarias para poder estudiar *in vivo* la relación de TAP humano con el HSV-1 y así abordar la asociación del polimorfismo *TAP2B* con la enfermedad de Alzheimer. Además, estos ratones podrán ser útiles para el estudio de otras enfermedades asociadas a los polimorfismos de TAP.

Conclusiones

6. Conclusiones

1. En la infección hematogena la vía *intravenosa* es más eficiente que la vía *intrapéritoneal* en la neuroinvasión del HSV-1. Las dos vías de inoculación muestran características similares en la sintomatología y en el patrón de infección del organismo, si bien la inoculación intravenosa provoca un adelantamiento de los síntomas de enfermedad y un mayor índice de mortalidad, que se correlaciona con mayores niveles de carga viral de HSV-1 en el sistema nervioso, y con la detección de antígenos virales en los encéfalos de ratones infectados.

2. Las vías neurales *intranasal* y de *abrasión del morro* presentan características similares. La sintomatología producida tras las dos vías de inoculación demuestra que se afectan las mismas regiones del SN, sin embargo en la vía intranasal la incidencia de la encefalitis es mayor, lo que se correlaciona con mayores niveles de virus en el SN de estos ratones indicando que la vía intranasal es más eficiente que la de abrasión del morro. Las diferencias en la infección durante la fase aguda no se vieron reflejadas en la latencia, donde ambas vías presentaron cargas virales similares que se detectaron exclusivamente en los ganglios trigéminos y en el *mesencéfalo*.

3. La secuencia de colonización del organismo por el HSV-1 en la ruta neural es inversa a la seguida por el virus en la infección hematogena. En la ruta neural el HSV-1 accede al SN a través del ganglio trigémino desde donde alcanza el mesencéfalo y desde aquí el diencefalo que, a través de las conexiones del tálamo conecta con la *corteza* y el *cerebelo*. A través de las neuronas postganglionares de la médula espinal el HSV-1 infecta órganos periféricos como el ovario y la glándula adrenal que permiten que el virus alcance finalmente el torrente sanguíneo.

4. La ruta hematogena es más eficiente que la neural en la infección del SN. Las dos rutas presentan cuadros sintomáticos diferentes, así como patrones de distribución distintos. Los ratones infectados por la ruta hematogena presentaron una mayor mortalidad que se correlaciona con niveles más altos de carga viral en el SN lo que dispone al hospedador a una situación más vulnerable frente a la infección.

5. La cepa viral HSV-1 KOS es más virulenta y más invasiva que la cepa HSV-1 F. La infección con la cepa KOS presenta una mayor virulencia en todas las condiciones de infección ensayadas. KOS es una cepa más invasiva que provoca mayores niveles de carga viral en el SN independientemente de la ruta de infección, si bien las dos cepas presentaron la misma secuencia de colonización del organismo.

6. La proteína viral ICP47 es esencial en la invasión del virus. El virus Δ ICP47, deficiente en la proteína ICP47 es menos invasivo en relación a la correspondiente cepa parental en todos los órganos analizados.

7. La infección del HSV-1 provoca la sobreexpresión de *tap1*. Como consecuencia de una infección eficiente se produce una sobreexpresión de al menos 4 veces en los niveles de la proteína *tap1* en los órganos analizados. Este fenómeno ocurre en dos órganos que muestran un comportamiento diferente en la infección y de distinta procedencia embrionaria como son el encéfalo y la glándula adrenal, lo que indica que es un fenómeno generalizado.

8. La recuperación de la infección depende de los niveles basales de *tap1*. La expresión basal de *tap1* en el encéfalo es, al menos, 100 veces menor que en la glándula adrenal, de modo que este tejido es más vulnerable a la infección del HSV-1 evidenciando la fina homeostasis entre el TAP y la proteína viral ICP47.

9. Se han generado tres líneas transgénicas de ratón que expresan los genes *TAPIA*, *TAP2A* y *TAP2B* en ausencia del *tap1* murino. Mediante el uso de un vector de expresión neuronal se han obtenido tres líneas transgénicas que expresan correctamente los genes *TAPIA*, *TAP2A* y *TAP2B* en el SN de estos ratones.

El conocimiento de los parámetros que influyen en la patobiología del HSV-1 es esencial para desvelar los mecanismos que establecen la relación entre este patógeno y la enfermedad de Alzheimer, donde la generación de un modelo *in vivo* permitirá llevar a cabo el estudio de la relación de los factores genéticos asociados a la demencia con las condiciones que sitúan al hospedador en una posición más vulnerable frente a la infección del HSV-1. La generación de las tres líneas de ratones transgénicos permitirá su utilización para el estudio de otros procesos patológicos a los que se ha asociado el TAP, como en cáncer o enfermedades autoinmunes.

Bibliografía

7. Bibliografía

- Abele, R., and R. Tampe. 2006. Modulation of the antigen transport machinery TAP by friends and enemies. *FEBS Lett.* 580:1156-63.
- Abendroth, A., A. Simmons, S. Efstathiou, and R.A. Pereira. 2000. Infection with an H2 recombinant herpes simplex virus vector results in expression of MHC class I antigens on the surfaces of human neuroblastoma cells in vitro and mouse sensory neurons in vivo. *J Gen Virol.* 81:2375-83.
- Ahn, K., T.H. Meyer, S. Uebel, P. Sempe, H. Djaballah, Y. Yang, P.A. Peterson, K. Fruh, and R. Tampe. 1996. Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47. *Embo J.* 15:3247-55.
- Aisenbrey, C., C. Sizun, J. Koch, M. Herget, R. Abele, B. Bechinger, and R. Tampe. 2006. Structure and dynamics of membrane-associated ICP47, a viral inhibitor of the MHC I antigen-processing machinery. *J Biol Chem.* 281:30365-72.
- Aita, K., and J. Shiga. 2004. Herpes simplex virus types 1 and 2 infect the mouse pituitary gland and induce apoptotic cell death. *Arch Virol.* 149:2443-51.
- Anglen, C.S., M.E. Truckenmiller, T.D. Schell, and R.H. Bonneau. 2003. The dual role of CD8+ T lymphocytes in the development of stress-induced herpes simplex encephalitis. *J Neuroimmunol.* 140:13-27.
- Arvin, A.M., A.S. Yeager, F.W. Bruhn, and M. Grossman. 1982. Neonatal herpes simplex infection in the absence of mucocutaneous lesions. *J Pediatr.* 100:715-21.
- Ayalon, O., E.A. Hughes, P. Cresswell, J. Lee, L. O'Donnell, R. Pardi, and J.R. Bender. 1998. Induction of transporter associated with antigen processing by interferon gamma confers endothelial cell cytoprotection against natural killer-mediated lysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2435-40.
- Ball, M.J. 1982. "Limbic predilection in Alzheimer dementia: is reactivated herpesvirus involved?" *Can J Neurol Sci.* 9:303-6.
- Baringer, J.R. 1974. Recovery of herpes simplex virus from human sacral ganglions. *N Engl J Med.* 291:828-30.
- Baringer, J.R., and P. Pisani. 1994. Herpes simplex virus genomes in human nervous system tissue analyzed by polymerase chain reaction. *Ann Neurol.* 36:823-9.
- Baringer, J.R., and P. Swoveland. 1973. Recovery of herpes-simplex virus from human trigeminal ganglions. *N Engl J Med.* 288:648-50.
- Barnett, E.M., M.D. Cassell, and S. Perlman. 1993. Two neurotropic viruses, herpes simplex virus type 1 and mouse hepatitis virus, spread along different neural pathways from the main olfactory bulb. *Neuroscience.* 57:1007-25.
- Barnett, E.M., G.D. Evans, N. Sun, S. Perlman, and M.D. Cassell. 1995. Anterograde tracing of trigeminal afferent pathways from the murine tooth pulp to cortex using herpes simplex virus type 1. *J Neurosci.* 15:2972-84.
- Barnett, E.M., and S. Perlman. 1993. The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. *Virology.* 194:185-91.
- Bendheim, P.E., H.R. Brown, R.D. Rudelli, L.J. Scala, N.L. Goller, G.Y. Wen, R.J. Kascsak, N.R. Cashman, and D.C. Bolton. 1992. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology.* 42:149-56.
- Bennett, E.M., J.R. Bennink, J.W. Yewdell, and F.M. Brodsky. 1999. Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J Immunol.* 162:5049-52.
- Bertram, L., and R.E. Tanzi. 2004. Alzheimer's disease: one disorder, too many genes? *Hum Mol Genet.* 13 Spec No 1:R135-41.
- Blennow, K., M.J. de Leon, and H. Zetterberg. 2006. Alzheimer's disease. *Lancet.* 368:387-403.
- Borchelt, D.R., J. Davis, M. Fischer, M.K. Lee, H.H. Slunt, T. Ratovitsky, J. Regard, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, S.S. Sisodia, and D.L. Price. 1996. A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. *Genet Anal.* 13:159-63.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Brown, M.G., A.O. Dokun, J.W. Heusel, H.R. Smith, D.L. Beckman, E.A. Blattenberger, C.E. Dubbelde, L.R. Stone, A.A. Scalzo, and W.M. Yokoyama. 2001. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science.* 292:934-7.
- Bullido, M.J., M.J. Artiga, M. Recuero, I. Sastre, M.A. Garcia, J. Aldudo, C. Lendon, S.W. Han, J.C. Morris, A. Frank, J. Vazquez, A. Goate, and F. Valdivieso. 1998. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet.* 18:69-71.
- Bullido, M.J., A. Martinez-Garcia, M.J. Artiga, J. Aldudo, I. Sastre, P. Gil, F. Coria, D.G. Munoz, V. Hachinski, A. Frank, and F. Valdivieso. 2007. A TAP2 genotype associated with Alzheimer's disease in APOE4 carriers. *Neurobiol Aging.* 28:519-23.
- Burgos, J.S., F. Guzman-Sanchez, I. Sastre, C. Fillat, and F. Valdivieso. 2006a. Non-invasive bioluminescence imaging for monitoring herpes simplex virus type 1 hematogenous infection. *Microbes Infect.* 8:1330-8.
- Burgos, J.S., C. Ramirez, F. Guzman-Sanchez, J.M. Alfaro, I. Sastre, and F. Valdivieso. 2006b. Hematogenous vertical transmission of herpes simplex virus type 1 in mice. *J Virol.* 80:2823-31.
- Burgos, J.S., C. Ramirez, I. Sastre, J.M. Alfaro, and F. Valdivieso. 2005. Herpes simplex virus type 1 infection via the bloodstream with apolipoprotein E dependence in the gonads is influenced by gender. *J Virol.* 79:1605-12.
- Burgos, J.S., C. Ramirez, I. Sastre, M.J. Bullido, and F. Valdivieso. 2002a. Involvement of apolipoprotein E in the hematogenous route of herpes simplex virus type 1 to the central nervous system. *J Virol.* 76:12394-8.
- Burgos, J.S., C. Ramirez, I. Sastre, M.J. Bullido, and F. Valdivieso. 2003. ApoE4 is more efficient than E3 in brain access by herpes simplex virus type 1. *Neuroreport.* 14:1825-7.
- Burgos, J.S., C. Ramirez, I. Sastre, and F. Valdivieso. 2006c. Effect of apolipoprotein E on the cerebral load of latent herpes simplex virus type 1 DNA. *J Virol.* 80:5383-7.
- Burgos, J.S., C. Ramirez, R. Tenorio, I. Sastre, and M.J. Bullido. 2002b. Influence of reagents formulation on real-time PCR parameters. *Mol Cell Probes.* 16:257-60.
- Cabrera, C.V., C. Wohlenberg, H. Openshaw, M. Rey-Mendez, A. Puga, and A.L. Notkins. 1980. Herpes simplex virus DNA sequences in the CNS of latently infected mice. *Nature.* 288:288-90.
- Carrascosa, A.L., J.F. Santaren, and E. Vinuela. 1982. Production and titration of African swine fever virus in porcine alveolar macrophages. *J Virol Methods.* 3:303-10.
- Cook, M.L., and J.G. Stevens. 1973. Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence for intra-axonal transport of infection. *Infect Immun.* 7:272-88.
- Corder, E.H., A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, G.W. Small, A.D. Roses, J.L. Haines, and M.A. Pericak-Vance. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261:921-3.
- Cribbs, D.H., B.Y. Azizeh, C.W. Cotman, and F.M. LaFerla. 2000. Fibril formation and neurotoxicity by a herpes simplex virus glycoprotein B fragment with homology to the Alzheimer's A beta peptide. *Biochemistry.* 39:5988-94.
- Chen, H.L., D. Gabrilovich, R. Tampe, K.R. Girgis, S. Nadaf, and D.P. Carbone. 1996. A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat Genet.* 13:210-3.
- Chen, S.H., L.Y. Lee, D.A. Garber, P.A. Schaffer, D.M. Knipe, and D.M. Coen. 2002. Neither LAT nor open reading frame P mutations increase expression of spliced or intron-containing ICP0 transcripts in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol.* 76:4764-72.

- Chen, S.H., H.W. Yao, W.Y. Huang, K.S. Hsu, H.Y. Lei, A.L. Shiau, and S.H. Chen. 2006. Efficient reactivation of latent herpes simplex virus from mouse central nervous system tissues. *J Virol.* 80:12387-92.
- Daniel, S., S. Caillat-Zucman, J. Hammer, J.F. Bach, and P.M. van Endert. 1997. Absence of functional relevance of human transporter associated with antigen processing polymorphism for peptide selection. *J Immunol.* 159:2350-7.
- Davis, L.E., and R.T. Johnson. 1979. An explanation for the localization of herpes simplex encephalitis? *Ann Neurol.* 5:2-5.
- Daw, E.W., H. Payami, E.J. Nemens, D. Nochlin, T.D. Bird, G.D. Schellenberg, and E.M. Wijsman. 2000. The number of trait loci in late-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet.* 66:196-204.
- Decman, V., M.L. Freeman, P.R. Kinchington, and R.L. Hendricks. 2005. Immune control of HSV-1 latency. *Viral Immunol.* 18:466-73.
- Deshpande, S.P., U. Kumaraguru, and B.T. Rouse. 2000. Dual role of B cells in mediating innate and acquired immunity to herpes simplex virus infections. *Cell Immunol.* 202:79-87.
- Deykin, E.Y., and B. MacMahon. 1979. Viral exposure and autism. *Am J Epidemiol.* 109:628-38.
- Dix, R.D., R.R. McKendall, and J.R. Baringer. 1983. Comparative neurovirulence of herpes simplex virus type 1 strains after peripheral or intracerebral inoculation of BALB/c mice. *Infect Immun.* 40:103-12.
- Dobson, C.B., and R.F. Itzhaki. 1999. Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 20:457-65.
- Dobson, C.B., M.A. Wozniak, and R.F. Itzhaki. 2003. Do infectious agents play a role in dementia? *Trends Microbiol.* 11:312-7.
- Dwyer, D.E., and A.L. Cunningham. 1993. Herpes simplex virus infection in pregnancy. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 7:75-105.
- Esiri, M.M., and A.H. Tomlinson. 1984. Herpes simplex encephalitis. Immunohistological demonstration of spread of virus via olfactory and trigeminal pathways after infection of facial skin in mice. *J Neurol Sci.* 64:213-7.
- Everett, R.D., P. Freemont, H. Saitoh, M. Dasso, A. Orr, M. Kathoria, and J. Parkinson. 1998. The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *J Virol.* 72:6581-91.
- Faucz, F.R., C.M. Probst, and M.L. Petzl-Erler. 2000. Polymorphism of LMP2, TAP1, LMP7 and TAP2 in Brazilian Amerindians and Caucasoids: implications for the evolution of allelic and haplotypic diversity. *Eur J Immunogenet.* 27:5-16.
- Feldman, L.T., A.R. Ellison, C.C. Voytek, L. Yang, P. Krause, and T.P. Margolis. 2002. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:978-83.
- Fraser, N.W., and T. Valyi-Nagy. 1993. Viral, neuronal and immune factors which may influence herpes simplex virus (HSV) latency and reactivation. *Microb Pathog.* 15:83-91.
- Fruh, K., K. Ahn, H. Djaballah, P. Sempe, P.M. van Endert, R. Tampe, P.A. Peterson, and Y. Yang. 1995. A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature.* 375:415-8.
- Fu, Y., G. Yan, L. Shi, and D. Faustman. 1998. Antigen processing and autoimmunity. Evaluation of mRNA abundance and function of HLA-linked genes. *Ann N Y Acad Sci.* 842:138-55.
- Fujita, S., and C.M. Donovan. 2005. Celiac-superior mesenteric ganglionectomy, but not vagotomy, suppresses the sympathoadrenal response to insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes.* 54:3258-64.
- Gadola, S.D., H.T. Moins-Teisserenc, J. Trowsdale, W.L. Gross, and V. Cerundolo. 2000. TAP deficiency syndrome. *Clin Exp Immunol.* 121:173-8.

- Galocha, B., A. Hill, B.C. Barnett, A. Dolan, A. Raimondi, R.F. Cook, J. Brunner, D.J. McGeoch, and H.L. Ploegh. 1997. The active site of ICP47, a herpes simplex virus-encoded inhibitor of the major histocompatibility complex (MHC)-encoded peptide transporter associated with antigen processing (TAP), maps to the NH₂-terminal 35 residues. *J Exp Med.* 185:1565-72.
- Gaskins, H.R., J.J. Monaco, and E.H. Leiter. 1992. Expression of intra-MHC transporter (Ham) genes and class I antigens in diabetes-susceptible NOD mice. *Science.* 256:1826-8; author reply 1830-1.
- Gebhardt, B.M., and W.P. Halford. 2005. Evidence that spontaneous reactivation of herpes virus does not occur in mice. *Virol J.* 2:67.
- Gerendai, I., and B. Halasz. 2000. Central nervous system structures connected with the endocrine glands. findings obtained with the viral transneuronal tracing technique. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 108:389-95.
- Goate, A., M.C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, and et al. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 349:704-6.
- Goldsmith, K., W. Chen, D.C. Johnson, and R.L. Hendricks. 1998. Infected cell protein (ICP)47 enhances herpes simplex virus neurovirulence by blocking the CD8+ T cell response. *J Exp Med.* 187:341-8.
- Gordon, J.W., G.A. Scangos, D.J. Plotkin, J.A. Barbosa, and F.H. Ruddle. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:7380-4.
- Grande, A.G., 3rd, P.J. Lehner, P. Cresswell, and T. Spies. 1997. Regulation of MHC class I heterodimer stability and interaction with TAP by tapasin. *Immunogenetics.* 46:477-83.
- Grubor-Bauk, B., A. Simmons, G. Mayrhofer, and P.G. Speck. 2003. Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J Immunol.* 170:1430-4.
- Guo, Y., T. Yang, X. Liu, S. Lu, J. Wen, J.E. Durbin, Y. Liu, and P. Zheng. 2002. Cis elements for transporter associated with antigen-processing-2 transcription: two new promoters and an essential role of the IFN response factor binding element in IFN-gamma-mediated activation of the transcription initiator. *Int Immunol.* 14:189-200.
- Halford, W.P., J.W. Balliet, and B.M. Gebhardt. 2004. Re-evaluating natural resistance to herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 78:10086-95.
- Hayney, M.S., G.A. Poland, P. Dimanlig, D.J. Schaid, R.M. Jacobson, and J.J. Lipsky. 1997. Polymorphisms of the TAP2 gene may influence antibody response to live measles vaccine virus. *Vaccine.* 15:3-6.
- Heemels, M.T., T.N. Schumacher, K. Wonigeit, and H.L. Ploegh. 1993. Peptide translocation by variants of the transporter associated with antigen processing. *Science.* 262:2059-63.
- Hewitt, E.W., S.S. Gupta, and P.J. Lehner. 2001. The human cytomegalovirus gene product US6 inhibits ATP binding by TAP. *Embo J.* 20:387-96.
- Hill, A., P. Jugovic, I. York, G. Russ, J. Bennink, J. Yewdell, H. Ploegh, and D. Johnson. 1995. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature.* 375:411-5.
- Hill, A.B., B.C. Barnett, A.J. McMichael, and D.J. McGeoch. 1994. HLA class I molecules are not transported to the cell surface in cells infected with herpes simplex virus types 1 and 2. *J Immunol.* 152:2736-41.
- Hill, J.M., J.B. Dudley, Y. Shimomura, and H.E. Kaufman. 1986a. Quantitation and kinetics of induced HSV-1 ocular shedding. *Curr Eye Res.* 5:241-6.
- Hill, J.M., B.M. Gebhardt, A.M. Azcuy, K.E. Matthews, W.J. Lukiw, I. Steiner, H.W. Thompson, and M.J. Ball. 2005. Can a herpes simplex virus type 1 neuroinvasive score be correlated to other risk factors in Alzheimer's disease? *Med Hypotheses.* 64:320-7.
- Hill, J.M., M.A. Rayfield, and Y. Haruta. 1987. Strain specificity of spontaneous and adrenergically induced HSV-1 ocular reactivation in latently infected rabbits. *Curr Eye Res.* 6:91-7.

- Hill, T.J., D.L. Yirrell, and W.A. Blyth. 1986b. Infection of the adrenal gland as a route to the central nervous system after viraemia with herpes simplex virus in the mouse. *J Gen Virol.* 67 (Pt 2):309-20.
- Itzhaki, R. 2004. Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E and Alzheimer' disease. *Herpes.* 11 Suppl 2:77A-82A.
- Itzhaki, R.F., and W.R. Lin. 1998. Herpes simplex virus type I in brain and the type 4 allele of the apolipoprotein E gene are a combined risk factor for Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans.* 26:273-7.
- Itzhaki, R.F., W.R. Lin, D. Shang, G.K. Wilcock, B. Faragher, and G.A. Jamieson. 1997. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet.* 349:241-4.
- Itzhaki, R.F., and M.A. Wozniak. 2006. Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E, and cholesterol: a dangerous liaison in Alzheimer's disease and other disorders. *Prog Lipid Res.* 45:73-90.
- Itzhaki, R.F., M.A. Wozniak, D.M. Appelt, and B.J. Balin. 2004. Infiltration of the brain by pathogens causes Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 25:619-27.
- Jamieson, G.A., N.J. Maitland, G.K. Wilcock, J. Craske, and R.F. Itzhaki. 1991. Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains. *J Med Virol.* 33:224-7.
- Jerome, K.R., R. Fox, Z. Chen, A.E. Sears, H. Lee, and L. Corey. 1999. Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, Us5 and Us3. *J Virol.* 73:8950-7.
- Johnson, R. 1998. Viral infections of the nervous system. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Johnson, R.T. 1964. The Pathogenesis of Herpes Virus Encephalitis. I. Virus Pathways to the Nervous System of Suckling Mice Demonstrated by Fluorescent Antibody Staining. *J Exp Med.* 119:343-56.
- Johnson, R.T., and C.A. Mims. 1968. Pathogenesis of viral infections of the nervous system. *N Engl J Med.* 278:23-30 contd.
- Jugovic, P., A.M. Hill, R. Tomazin, H. Ploegh, and D.C. Johnson. 1998. Inhibition of major histocompatibility complex class I antigen presentation in pig and primate cells by herpes simplex virus type 1 and 2 ICP47. *J Virol.* 72:5076-84.
- Kelly, A., S.H. Powis, L.A. Kerr, I. Mockridge, T. Elliott, J. Bastin, B. Uchanska-Ziegler, A. Ziegler, J. Trowsdale, and A. Townsend. 1992. Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature.* 355:641-4.
- Kent, J.R., W. Kang, C.G. Miller, and N.W. Fraser. 2003. Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function. *J Neurovirol.* 9:285-90.
- Kern, E.R. 1999a. Animal models for central nervous system and disseminated infections with HSV. Academic Press, London.
- Kern, E.R. 1999b. Animal models for CNS and disseminated infections with HSV-1. Academic Press, London.
- Keusekotten, K., R.M. Leonhardt, S. Ehse, and M.R. Knittler. 2006. Biogenesis of functional antigenic peptide transporter TAP requires assembly of pre-existing TAP1 with newly synthesized TAP2. *J Biol Chem.* 281:17545-51.
- Kimura, H., Y. Ito, M. Futamura, Y. Ando, Y. Yabuta, Y. Hoshino, Y. Nishiyama, and T. Morishima. 2002. Quantitation of viral load in neonatal herpes simplex virus infection and comparison between type 1 and type 2. *J Med Virol.* 67:349-53.
- Klapper, P.E., G.M. Cleator, and M. Longson. 1984. Mild forms of herpes encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 47:1247-50.
- Kleijmeer, M.J., A. Kelly, H.J. Geuze, J.W. Slot, A. Townsend, and J. Trowsdale. 1992. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature.* 357:342-4.
- Knoblich, A., J. Gortz, V. Harle-Grupp, and D. Falke. 1983. Kinetics and genetics of herpes simplex virus-induced antibody formation in mice. *Infect Immun.* 39:15-23.
- Kocer, A., M. Gallozzi, L. Renault, G. Tilly, I. Pinheiro, F. Le Provost, E. Pailhoux, and J.L. Vilotte. 2007. Goat PRND expression pattern suggests its involvement in early sex differentiation. *Dev Dyn.* 236:836-42.

- Koskiniemi, M., H. Piiparinen, L. Mannonen, T. Rantalaiho, and A. Vaheri. 1996. Herpes encephalitis is a disease of middle aged and elderly people: polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus in the CSF of 516 patients with encephalitis. The Study Group. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 60:174-8.
- Kosz-Vnenchak, M., J. Jacobson, D.M. Coen, and D.M. Knipe. 1993. Evidence for a novel regulatory pathway for herpes simplex virus gene expression in trigeminal ganglion neurons. *J Virol*. 67:5383-93.
- Koyama, A.H., T. Fukumori, M. Fujita, H. Irie, and A. Adachi. 2000. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. *Microbes Infect*. 2:1111-7.
- Kozak, M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*. 44:283-92.
- Kozak, M. 1997. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *Embo J*. 16:2482-92.
- Kramer, M.F., and D.M. Coen. 1995. Quantification of transcripts from the ICP4 and thymidine kinase genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol*. 69:1389-99.
- Kristensson, K., L. Nennesmo, L. Persson, and E. Lycke. 1982. Neuron to neuron transmission of herpes simplex virus. Transport of virus from skin to brainstem nuclei. *J Neurol Sci*. 54:149-56.
- Kristensson, K., A. Vahlne, L.A. Persson, and E. Lycke. 1978. Neural spread of herpes simplex virus types 1 and 2 in mice after corneal or subcutaneous (footpad) inoculation. *J Neurol Sci*. 35:331-40.
- Kutsch, O., T. Vey, T. Kerkau, T. Hunig, and A. Schimpl. 2002. HIV type 1 abrogates TAP-mediated transport of antigenic peptides presented by MHC class I. Transporter associated with antigen presentation. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 18:1319-25.
- Labetoulle, M., S. Maillat, S. Efstathiou, S. Dezelee, E. Frau, and F. Lafay. 2003. HSV1 latency sites after inoculation in the lip: assessment of their localization and connections to the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44:217-25.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.
- Lankat-Buttgereit, B., and R. Tampe. 2002. The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiol Rev*. 82:187-204.
- Leissring, M.A., M.C. Sugarman, and F.M. LaFerla. 1998. Herpes simplex virus infections and Alzheimer's disease. Implications for drug treatment and immunotherapy. *Drugs Aging*. 13:193-8.
- Levy-Lahad, E., W. Wasco, P. Poorkaj, D.M. Romano, J. Oshima, W.H. Pettingell, C.E. Yu, P.D. Jondro, S.D. Schmidt, K. Wang, and et al. 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 269:973-7.
- Lewandowski, G., M.N. Zimmerman, L.L. Denk, D.D. Porter, and G.A. Prince. 2002. Herpes simplex type 1 infects and establishes latency in the brain and trigeminal ganglia during primary infection of the lip in cotton rats and mice. *Arch Virol*. 147:167-79.
- Lewandowski, G.A., D. Lo, and F.E. Bloom. 1993. Interference with major histocompatibility complex class II-restricted antigen presentation in the brain by herpes simplex virus type 1: a possible mechanism of evasion of the immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:2005-9.
- Liedtke, W., B. Opalka, C.W. Zimmermann, and E. Lignitz. 1993. Age distribution of latent herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus genome in human nervous tissue. *J Neurol Sci*. 116:6-11.
- Little, C.S., C.J. Hammond, A. MacIntyre, B.J. Balin, and D.M. Appelt. 2004. Chlamydia pneumoniae induces Alzheimer-like amyloid plaques in brains of BALB/c mice. *Neurobiol Aging*. 25:419-29.

- Liu, T., K.M. Khanna, B.N. Carriere, and R.L. Hendricks. 2001. Gamma interferon can prevent herpes simplex virus type 1 reactivation from latency in sensory neurons. *J Virol.* 75:11178-84.
- Lopez, C. 1975. Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature.* 258:152-3.
- Lopez, C., and R.J. O'Reilly. 1977. Cell-mediated immune responses in recurrent herpesvirus infections. I. Lymphocyte proliferation assay. *J Immunol.* 118:895-902.
- Lubinski, J.M., M. Jiang, L. Hook, Y. Chang, C. Sarver, D. Mastellos, J.D. Lambris, G.H. Cohen, R.J. Eisenberg, and H.M. Friedman. 2002. Herpes simplex virus type 1 evades the effects of antibody and complement in vivo. *J Virol.* 76:9232-41.
- Lundberg, P., P.V. Welander, C.K. Edwards, 3rd, N. van Rooijen, and E. Cantin. 2007. Tumor necrosis factor (TNF) protects resistant C57BL/6 mice against herpes simplex virus-induced encephalitis independently of signaling via TNF receptor 1 or 2. *J Virol.* 81:1451-60.
- Ma, W., P.J. Lehner, P. Cresswell, J.S. Pober, and D.R. Johnson. 1997. Interferon-gamma rapidly increases peptide transporter (TAP) subunit expression and peptide transport capacity in endothelial cells. *J Biol Chem.* 272:16585-90.
- Mahley, R.W. 1988. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 240:622-30.
- Mahley, R.W., and S.C. Rall, Jr. 2000. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 1:507-37.
- Mavromara-Nazos, P., M. Ackermann, and B. Roizman. 1986. Construction and properties of a viable herpes simplex virus 1 recombinant lacking coding sequences of the alpha 47 gene. *J Virol.* 60:807-12.
- McGeer, P.L., and E.G. McGeer. 2002. Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *J Neurovirol.* 8:529-38.
- Mellerick, D.M., and N.W. Fraser. 1987. Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state. *Virology.* 158:265-75.
- Meyer, T.H., P.M. van Endert, S. Uebel, B. Ehring, and R. Tampe. 1994. Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells. *FEBS Lett.* 351:443-7.
- Middleton, P.J., M. Petric, M. Kozak, N.B. Rewcastle, and D.R. McLachlan. 1980. Herpes-simplex viral genome and senile and presenile dementias of Alzheimer and Pick. *Lancet.* 1:1038.
- Miller, C.S., R.J. Danaher, and R.J. Jacob. 1998. Molecular aspects of herpes simplex virus I latency, reactivation, and recurrence. *Crit Rev Oral Biol Med.* 9:541-62.
- Mitchell, B.M., D.C. Bloom, R.J. Cohrs, D.H. Gilden, and P.G. Kennedy. 2003. Herpes simplex virus-1 and varicella-zoster virus latency in ganglia. *J Neurovirol.* 9:194-204.
- Montgomerie, J.Z., D.M. Becroft, M.C. Croxson, P.B. Doak, and J.D. North. 1969. Herpes-simplex-virus infection after renal transplantation. *Lancet.* 2:867-71.
- Nachtigal, M., and J.B. Caulfield. 1984. Early and late pathologic changes in the adrenal glands of mice after infection with herpes simplex virus type 1. *Am J Pathol.* 115:175-85.
- Nagy, N., F. Vanky, and E. Klein. 1998. Tumor surveillance: expression of the transporter associated with antigen processing (TAP-1) in ex-vivo human tumor samples and its elevation by in vitro treatment with IFN-gamma and TNF-alpha. *Immunol Lett.* 64:153-60.
- Nahmias, A.J., F.K. Lee, and S. Beckman-Nahmias. 1990. Sero-epidemiological and -sociological patterns of herpes simplex virus infection in the world. *Scand J Infect Dis Suppl.* 69:19-36.
- Neumann, H., I.M. Medana, J. Bauer, and H. Lassmann. 2002. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* 25:313-9.
- Neumann, H., H. Schmidt, A. Cavalie, D. Jenne, and H. Wekerle. 1997. Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *J Exp Med.* 185:305-16.
- Neumann, J., A.M. Eis-Hubinger, and N. Koch. 2003. Herpes simplex virus type 1 targets the MHC class II processing pathway for immune evasion. *J Immunol.* 171:3075-83.

- Nijenhuis, M., and G.J. Hammerling. 1996. Multiple regions of the transporter associated with antigen processing (TAP) contribute to its peptide binding site. *J Immunol.* 157:5467-77.
- Norberg, P., T. Bergstrom, E. Rekabdar, M. Lindh, and J.A. Liljeqvist. 2004. Phylogenetic analysis of clinical herpes simplex virus type 1 isolates identified three genetic groups and recombinant viruses. *J Virol.* 78:10755-64.
- Norgren, R.B., Jr., and M.N. Lehman. 1998. Herpes simplex virus as a transneuronal tracer. *Neurosci Biobehav Rev.* 22:695-708.
- Norton, A.J., S. Jordan, and P. Yeomans. 1994. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J Pathol.* 173:371-9.
- Pereira, R.A., A. Scalzo, and A. Simmons. 2001. Cutting edge: a NK complex-linked locus governs acute versus latent herpes simplex virus infection of neurons. *J Immunol.* 166:5869-73.
- Pereira, R.A., D.C. Tschärke, and A. Simmons. 1994. Upregulation of class I major histocompatibility complex gene expression in primary sensory neurons, satellite cells, and Schwann cells of mice in response to acute but not latent herpes simplex virus infection in vivo. *J Exp Med.* 180:841-50.
- Piedrahita, J.A., S.H. Zhang, J.R. Hageman, P.M. Oliver, and N. Maeda. 1992. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:4471-5.
- Ploegh, H.L. 1998. Viral strategies of immune evasion. *Science.* 280:248-53.
- Podlech, J., F. Hengerer, M. Fleck, I. Walev, and D. Falke. 1996. Replication of herpes simplex virus type 1 and 2 in the medulla of the adrenal gland after vaginal infection of mice. *Arch Virol.* 141:1999-2008.
- Poirier, J., J. Davignon, D. Bouthillier, S. Kogan, P. Bertrand, and S. Gauthier. 1993. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet.* 342:697-9.
- Price, R.W., and J. Schmitz. 1979. Route of infection, systemic host resistance, and integrity of ganglionic axons influence acute and latent herpes simplex virus infection of the superior cervical ganglion. *Infect Immun.* 23:373-83.
- Purbhoo, M.A., D.J. Irvine, J.B. Huppa, and M.M. Davis. 2004. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol.* 5:524-30.
- Pyles, R.B. 2001. The association of herpes simplex virus and Alzheimer's disease: a potential synthesis of genetic and environmental factors. *Herpes.* 8:64-8.
- Raftery, M.J., C.K. Behrens, A. Muller, P.H. Krammer, H. Walczak, and G. Schonrich. 1999. Herpes simplex virus type 1 infection of activated cytotoxic T cells: Induction of fratricide as a mechanism of viral immune evasion. *J Exp Med.* 190:1103-14.
- Rajavashisth, T.B., J.S. Kaptein, K.L. Reue, and A.J. Lusis. 1985. Evolution of apolipoprotein E: mouse sequence and evidence for an 11-nucleotide ancestral unit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:8085-9.
- Ramírez, C. 2006. Implicación de la Apolipoproteína E en la infección hematogena y en la transmisión vertical del virus Herpes Simplex Tipo 1 en ratón. *En Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma, Madrid.*
- Ressing, M.E., S.E. Keating, D. van Leeuwen, D. Koppers-Lalic, I.Y. Pappworth, E.J. Wiertz, and M. Rowe. 2005. Impaired transporter associated with antigen processing-dependent peptide transport during productive EBV infection. *J Immunol.* 174:6829-38.
- Robinson, S.R., and G.M. Bishop. 2002. Abeta as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 23:1051-72.
- Robinson, S.R., C. Dobson, and J. Lyons. 2004. Challenges and directions for the pathogen hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 25:629-37.
- Rock, D.L., and N.W. Fraser. 1983. Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice. *Nature.* 302:523-5.
- Roizman, B. 1996. *Fields Virology.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

- Roizman, B., G.S. Borman, and M.K. Rousta. 1965. Macromolecular synthesis in cells infected with herpes simplex virus. *Nature*. 206:1374-5.
- Roizman, B., and A.E. Sears. 1987. An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Annu Rev Microbiol*. 41:543-71.
- Roizman, B., and R.J. Whitley. 2001. The nine ages of herpes simplex virus. *Herpes*. 8:23-7.
- Sainz, B., J.M. Loutsch, M.E. Marquart, and J.M. Hill. 2001. Stress-associated immunomodulation and herpes simplex virus infections. *Med Hypotheses*. 56:348-56.
- Samaniego, L.A., N. Wu, and N.A. DeLuca. 1997. The herpes simplex virus immediate-early protein ICP0 affects transcription from the viral genome and infected-cell survival in the absence of ICP4 and ICP27. *J Virol*. 71:4614-25.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A laboratory Manual.
- Sawtell, N.M., D.K. Poon, C.S. Tansky, and R.L. Thompson. 1998. The latent herpes simplex virus type 1 genome copy number in individual neurons is virus strain specific and correlates with reactivation. *J Virol*. 72:5343-50.
- Sawtell, N.M., and R.L. Thompson. 1992a. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcription unit promotes anatomical site-dependent establishment and reactivation from latency. *J Virol*. 66:2157-69.
- Sawtell, N.M., and R.L. Thompson. 1992b. Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *J Virol*. 66:2150-6.
- Schmid, D.S., and B.T. Rouse. 1992. The role of T cell immunity in control of herpes simplex virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 179:57-74.
- Seliger, B., M.J. Maeurer, and S. Ferrone. 1997. TAP off--tumors on. *Immunol Today*. 18:292-9.
- Sequiera, L.W., L.C. Jennings, L.H. Carrasco, M.A. Lord, A. Curry, and R.N. Sutton. 1979. Detection of herpes-simplex viral genome in brain tissue. *Lancet*. 2:609-12.
- Sherrington, R., E.I. Rogaev, Y. Liang, E.A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, and et al. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 375:754-60.
- Shimeld, C., H. Dyson, S. Lewkowicz-Moss, T.J. Hill, W.A. Blyth, and D.L. Easty. 1987. Spread of HSV-1 to the mouse eye after inoculation in the skin of the snout requires an intact nerve supply to the inoculation site. *Curr Eye Res*. 6:9-12.
- Simmons, A. 1989. H-2-linked genes influence the severity of herpes simplex virus infection of the peripheral nervous system. *J Exp Med*. 169:1503-7.
- Simmons, A., and A.B. La Vista. 1989. Neural infection in mice after cutaneous inoculation with HSV-1 is under complex host genetic control. *Virus Res*. 13:263-70.
- Simmons, A., and A.A. Nash. 1985. Role of antibody in primary and recurrent herpes simplex virus infection. *J Virol*. 53:944-8.
- Simmons, A., and D.C. Tschärke. 1992. Anti-CD8 impairs clearance of herpes simplex virus from the nervous system: implications for the fate of virally infected neurons. *J Exp Med*. 175:1337-44.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 150:76-85.
- Spies, T., M. Bresnahan, S. Bahram, D. Arnold, G. Blanck, E. Mellins, D. Pious, and R. DeMars. 1990. A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature*. 348:744-7.
- Stevens, J.G., E.K. Wagner, G.B. Devi-Rao, M.L. Cook, and L.T. Feldman. 1987. RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science*. 235:1056-9.
- Stevenson, P.G., S. Efstathiou, P.C. Doherty, and P.J. Lehner. 2000. Inhibition of MHC class I-restricted antigen presentation by gamma 2-herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:8455-60.

- Tal-Singer, R., T.M. Lasner, W. Podrzucki, A. Skokotas, J.J. Leary, S.L. Berger, and N.W. Fraser. 1997. Gene expression during reactivation of herpes simplex virus type 1 from latency in the peripheral nervous system is different from that during lytic infection of tissue cultures. *J Virol.* 71:5268-76.
- Thompson, R.L., and N.M. Sawtell. 2001. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene promotes neuronal survival. *J Virol.* 75:6660-75.
- Tomazin, R., A.B. Hill, P. Jugovic, I. York, P. van Endert, H.L. Ploegh, D.W. Andrews, and D.C. Johnson. 1996. Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP. *Embo J.* 15:3256-66.
- Tomazin, R., N.E. van Schoot, K. Goldsmith, P. Jugovic, P. Sempe, K. Fruh, and D.C. Johnson. 1998. Herpes simplex virus type 2 ICP47 inhibits human TAP but not mouse TAP. *J Virol.* 72:2560-3.
- Tomlinson, A.H., and M.M. Esiri. 1983. Herpes simplex encephalitis. Immunohistological demonstration of spread of virus via olfactory pathways in mice. *J Neurol Sci.* 60:473-84.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:4350-4.
- Trowsdale, J., J. Ragoussis, and R.D. Campbell. 1991. Map of the human MHC. *Immunol Today.* 12:443-6.
- Tsurutani, H., H. Ohkuma, and S. Suzuki. 2003. Effects of thrombin inhibitor on thrombin-related signal transduction and cerebral vasospasm in the rabbit subarachnoid hemorrhage model. *Stroke.* 34:1497-500.
- Tyler, K.L. 2004. Herpes simplex virus infections of the central nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's. *Herpes.* 11 Suppl 2:57A-64A.
- Vambutas, A., V.R. Bonagura, and B.M. Steinberg. 2000. Altered expression of TAP-1 and major histocompatibility complex class I in laryngeal papillomatosis: correlation of TAP-1 with disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7:79-85.
- Van Kaer, L., P.G. Ashton-Rickardt, H.L. Ploegh, and S. Tonegawa. 1992. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell.* 71:1205-14.
- Vitalis, T.Z., Q.J. Zhang, J. Alimonti, S.S. Chen, G. Basha, A. Moise, J. Tiong, M.M. Tian, K.B. Choi, D. Waterfield, A. Jeffries, and W.A. Jefferies. 2005. Using the TAP component of the antigen-processing machinery as a molecular adjuvant. *PLoS Pathog.* 1:e36.
- Vollstedt, S., M. Franchini, H.P. Hefti, B. Odermatt, M. O'Keeffe, G. Alber, B. Glanzmann, M. Riesen, M. Ackermann, and M. Suter. 2003. Flt3 ligand-treated neonatal mice have increased innate immunity against intracellular pathogens and efficiently control virus infections. *J Exp Med.* 197:575-84.
- Ward, P.L., and B. Roizman. 1994. Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen. *Trends Genet.* 10:267-74.
- Weber, P., M. Schuler, C. Gerard, M. Mark, D. Metzger, and P. Chambon. 2003. Temporally controlled site-specific mutagenesis in the germ cell lineage of the mouse testis. *Biol Reprod.* 68:553-9.
- Weir, J.P. 2001. Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene.* 271:117-30.
- Weisgraber, K.H., A.D. Roses, and W.J. Strittmatter. 1994. The role of apolipoprotein E in the nervous system. *Curr Opin Lipidol.* 5:110-6.
- Whitley, R. 2004. Neonatal herpes simplex virus infection. *Curr Opin Infect Dis.* 17:243-6.
- Whitley, R., A.D. Lakeman, A. Nahmias, and B. Roizman. 1982. Dna restriction-enzyme analysis of herpes simplex virus isolates obtained from patients with encephalitis. *N Engl J Med.* 307:1060-2.
- Whitley, R.J. 1996. Fields Virology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Whitley, R.J., and J.W. Grann. 1993. The human herpesviruses. Raven, New York.

-
- Whitley, R.J., D.W. Kimberlin, and B. Roizman. 1998. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis.* 26:541-53; quiz 554-5.
- Whitley, R.J., and B. Roizman. 2001. Herpes simplex virus infections. *Lancet.* 357:1513-8.
- Whitley, R.J., S.J. Soong, M.S. Hirsch, A.W. Karchmer, R. Dolin, G. Galasso, J.K. Dunnick, and C.A. Alford. 1981. Herpes simplex encephalitis: vidarabine therapy and diagnostic problems. *N Engl J Med.* 304:313-8.
- Wootton, R., and P.A. Flecknell. 1987. Record-keeping requirements of the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and how to meet them. *Lab Anim.* 21:267-75.
- Wright, K.L., L.C. White, A. Kelly, S. Beck, J. Trowsdale, and J.P. Ting. 1995. Coordinate regulation of the human TAP1 and LMP2 genes from a shared bidirectional promoter. *J Exp Med.* 181:1459-71.
- York, I.A., C. Roop, D.W. Andrews, S.R. Riddell, F.L. Graham, and D.C. Johnson. 1994. A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8⁺ T lymphocytes. *Cell.* 77:525-35.
- Yuan, W., A. Dasgupta, and P. Cresswell. 2006. Herpes simplex virus evades natural killer T cell recognition by suppressing CD1d recycling. *Nat Immunol.* 7:835-42.

