

# Sensibilidad de fibroblastos gingivales humanos a la infección por Herpes Simplex Tipo I (In Vitro)

Adolfo Contreras R. \*

Beatriz Parra P. \*\*

## Palabras claves:

Herpes Simplex tipo I,  
Fibroblastos gingivales,  
Infectividad, Patogénesis/Periodonto,  
Saliva.

## RESUMEN

*La sensibilidad a la infección por el virus Herpes Simplex tipo I, (HSV I) se determinó en una línea celular de fibroblastos gingivales cultivados in vitro, al inocular una cepa viral de referencia y saliva de pacientes sintomáticos para infección activa por este virus. La susceptibilidad a la infección viral se determinó por la aparición del característico efecto citopatogénico (ECP), visualizado al examen microscópico de los cultivos, confirmando por pases repetidos de infección e inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales y policlonales contra HSV I en los cultivos celulares. Este resultado amplía el espectro típico de infección para Herpesvirus y confirma que los fibroblastos gingivales permiten los procesos de replicación viral y sugiere que estas células podrían facilitar el acceso de HSV I al tejido conectivo, favoreciendo la infección persistente en sitios neurales o extraneurales.*

\* Profesor Asistente Escuela de Odontología Universidad del Valle. O.D. Tesista M. Sc. Microbiología Médica. Cali-Colombia.

\*\* Técnica Especializada de Laboratorio IV. Bact. M. Sc. Microbiología Médica. Universidad del Valle. Cali-Colombia

## INTRODUCCION

### Herpes Virus en cavidad oral

Los virus más frecuentemente aislados en secreción salival en humanos son los Herpesvirus,<sup>1,2</sup> se cree que ellos persisten y se multiplican en diversos tipos celulares. Las células blanco por excelencia son los queratinocitos de piel o mucosas y hacen latencia que es un tipo de infección persistente en raíces dorsales de ganglios sensoriales; como en el trigémino que se constituye en la fuente de virus en las recurrencias por Herpes Simplex I, (HSV I).<sup>1,2,3</sup>

En la actualidad se estudian la sensibilidad de otras células a la infección viral y se tratan de establecer nuevos sitios de latencia extraneural. Algunos grupos de investigación han reportado la presencia de antígenos HSV I en cultivos de queratinocitos provenientes de epitelio sulcular en pacientes con encías clínicamente sanas,<sup>4,5</sup> otros, la presencia de anticuerpos en Fluido Crevicular por largos períodos de tiempo,<sup>6</sup> sugiriendo infección subclínica.

Recientemente, Amit et al, demostraron mediante un ensayo de hidridización (Dot-blot), secuencias específicas del ADN viral, en muestras de tejidos gingivales; que sugieren posibilidad de latencia en tejidos periodontales.<sup>7</sup>

En nuestro medio no se habían iniciado estos estudios por esta razón, obtuvimos una línea celular de fibroblastos gingivales y la infectamos con HSV I, para determinar la sensibilidad a la infección viral y la permisividad de estas células a la replicación viral in vitro.

## Objetivos

Como en nuestro medio no se habían iniciado estos estudios, nos propusimos: primero, obtener una línea celular de fibroblastos gingivales y caracterizarla. Segundo, determinar la susceptibilidad de estas células a la infección por una cepa de referencia de Herpes Simplex tipo I y la permisividad al favorecer la replicación viral. Tercero, probar la infectividad de la saliva de pacientes con sintomatología clínica de infección por HSV I en los cultivos de fibroblastos gingivales humano, riñón embrionario humano y pulmón humano.

## Materiales y Métodos

### 1. Obtención del tejido gingival

Se obtuvieron especímenes de encía libre y adherida de pacientes periodontalmente sanos, que requerían exodoncias de los primeros premolares por razones ortodónticas. Se seleccionaron tres pacientes, dos hombres y una mujer,

con edades respectivas de 16, 21 y 30 años, sin antecedentes médicos/odontológicos de enfermedades endocrinas, neoplásicas, inmunes o infecciosas importantes.

Previamente a las exodoncias, a los pacientes se les tomó dos exámenes de laboratorio; el ELISA para el Virus de Inmunodeficiencia Humana y la detección de antígeno de superficie para Hepatitis B.

Los pacientes no relataron historia de infección herpética al momento de la cirugía y se tomaron muestras de saliva para cultivo y aislamiento viral con resultados negativos, según los protocolos del laboratorio de diagnóstico virológico del Departamento de Microbiología Médica de la Universidad del Valle.

### 1.1 Desarrollo de los cultivos celulares

Se realizó la exodoncia bajo anestesia local, previo debridamiento de los tejidos alrededor del premolar con elevador recto acanalado. Posteriormente se extrajo la pieza dental con fórceps 150 y se retiró con un bisturí, aproximadamente de 0.5 centímetros cuadrados de encía del borde vestibular que incluía, encía libre y encía adherida. Este fragmento se suspendió en un vial que contenía 2 ml de Medio Mínimo Esencial con sales de Hanks, (HMEM), 10% de Suero Fetal Bovino, (SFB); 200 unidades de Penicilina cristalina, 200 ug de Streptomycin, 5 ug de Tetraciclina y 10 ug de Anfotericina B, hasta el procesamiento en el laboratorio.

El tejido se transfirió a cajas de Petri estériles y se lavó con PBS estéril más antibióticos, separando el tejido epitelial del conectivo mediante disección con bisturí. El conectivo se fraccionó con bisturí en pedazos de 0.5 mm cúbicos y se incubó con tripsina de Sigma (1:250) al 25% durante dos horas a 37 °C; las células se disociaron por pipeteo suave y se filtraron por malla metálica. Se adicionó HMEM con Suero Fetal Bovino al 10% y se centrifugó a 1.500 r.p.m. durante 10

minutos, para remover la tripsina. Las células fueron resuspendidas incorporando medio fresco y se sembraron en botellas para cultivo con HMEM y SFB al 10%, incubándose a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 10 días.<sup>8,9</sup> Los cultivos se observaron diariamente en microscopio invertido de luz, hasta visualizar el crecimiento y multiplicación de células fusiformes con características morfológicas compatibles con fibroblastos; cuando la monocapa mostró confluencia, se realizaron subcultivos seriados. Cada tercer día se cambió de medio de cultivo, en condiciones de esterilidad. (Ver foto No. 1)

### 1.2 Caracterización e identificación de los fibroblastos. Descripción morfológica

La monocapa se tiñó con Giemsa para su descripción morfológica en la sección de Histología de la Universidad del Valle. Se realizó cariotificación en el laboratorio de Genética humana en el Departamento de Morfología de la misma Universidad, y en la sección de cultivos celulares del laboratorio de Virología, se realizó la inhibición del crecimiento con geneticina a concentraciones de 100, 500 y 1.000 ng/ml. después de tripsinización para subcultivo.<sup>10,11</sup> (Ver foto No. 2)

### Susceptibilidad a la infección viral

Una vez identificada la línea celular de Fibroblastos Gingivales Humanos y estabilizado los cultivos, se inocularon: 1- monocapas celulares con cepas de referencia para HSV I del banco de virus del Departamento de Microbiología en la Universidad del Valle y 2.- Se inocularon los cultivos celulares con saliva obtenida de pacientes con sintomatología de infección herpética oral activa. Según protocolo ensayado por nosotros en el laboratorio. Dos centímetros cúbicos de saliva, no inducida por químicos se mezcló con un volumen igual de HMEM, suplementado con SFB al 10% y penicilina

200 u/ml, Streptomycin 200 ug/ml, Anfotericina B 200 ug/ml y Tetraciclina 5ug por ml. Los antibióticos se dejaron actuar por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra se homogenizó por pipeteo suave y se centrifugó a 1.500 r.p.m. por 10 minutos, en una centrífuga refrigerada a 4 °C. El sedimento se utilizó para un ensayo de inmunofluorescencia, 0.1 ml del sobrenadante se inoculó en las monocapas de Fibroblastos Gingivales Humanos, Pulmón Embrionario Humano y Riñón Embrionario Humano, dejando en absorción el inóculo durante 1 hora. Posteriormente se adicionó EMEM suplementado con SFB al 2%, antibióticos y L glutamina 200 mM. Igualmente se utilizaron controles negativos de los cultivos que se siguieron durante todo el experimento. En otro ensayo, se inoculó 0.1 ml de una dilución 10 a la menos dos, de una cepa viral de referencia para HSV I, en monocapas de cultivos celulares antes descritos, siguiendo la metodología empleada por la sección Virología de la Universidad del Valle.<sup>12,13,14</sup> Los cultivos se observaron diariamente en microscopio invertido de luz Olympus II, con cambios periódicos del medio, hasta la aparición del Efecto Citopatógeno (ECP), característico de los virus, o durante 14 días si el inóculo de saliva no fue infectivo, tiempo después del cual se realizó un pase en cultivos celulares frescos antes de ser desechados. Los aislamientos positivos se confirmaron con pases seriados e inmunofluorescencia.<sup>15,16</sup> (Ver fotos 3, 4, 5, 6).

### Resultados

Los cultivos virales para Herpes Simplex tipo I, en la saliva de los pacientes donantes del tejido gingival; como los controles de inmunofluorescencia para detección de antígeno viral de HSV I, en las monocapas de Fibroblastos Gingivales Humanos, (FGH); Pulmón Humano (PH) y Riñón Embrionario Humano (REH), fueron negativos.

En las monocapas infectadas con la cepa de referencia, se evidenció el daño al examen microscópico entre las 12 y 48 horas, puesto que las células perdieron la típica forma elongada y fusiforme, para convertirse en redondeadas, con la aparición de racimos y las típicas alteraciones en la polaridad celular. Las células que primero manifestaron la infección fueron el REH y los FGH, más tardíamente el PH; aunque progresivamente este efecto citopatogénico se diseminó en los cultivos puesto que, entre las 36 a 48 horas las monocapas fueron completamente destruidas, manifestándose por el completo desprendimiento.

En los experimentos con la saliva obtenida de pacientes sintomáticos para Herpes Oral, se obtuvo un comportamiento similar, pero ECP se inició entre las 48 horas a los 5 días y el desprendimiento de la monocapa apareció de los 4 a 7 días. Tanto el REH como los FGH se efectuaron pases seriados en células frescas, obteniéndose los mismos resultados.

### Inmunofluorescencia indirecta

Las monocapas infectadas y que mostraban un 50% de ECP se desprendieron mecánicamente y se centrifugaron a 1.500 r.p.m. por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 0.5 ml de PBS a Ph 7 y se colocó una gota de la suspensión en las placas para Inmunofluorescencia en ensayos por duplicado, utilizando controles positivos y negativos. Cuando las gotas secaron, se fijaron en acetona fría a menos 5 grados centígrados. Luego, se adicionó una gota de suero Anti HSV I, que se incubó en cámara húmeda por 30 minutos. Se practicaron tres lavados a las placas con PBS, adicionándose un antisuero marcado con fluoresceína, que se incubó también por 30 minutos y se lavó tres veces con PBS. Las placas se secaron a temperatura ambiente y se montaron con glicerol para su examen en microscopio de Inmunofluorescencia, observándose como positivas

las de los cultivos infectados con las cepas de referencia y la saliva de los pacientes sintomáticos para HSV I.

### Discusión

Nuestros resultados muestran que los fibroblastos gingivales cultivados in vitro son sensibles a la infección por cepas referencia de Herpes Simplex tipo I y por la saliva de pacientes con sintomatología clínica de infección aguda por el mismo virus. Esto amplía el espectro de infección para este virus y genera otros posibles sitios extraneurales para latencia o infección persistente. Por otro lado, tratamientos dentales como operatoria, curetage subgingival o cirugía pueden generar un episodio de recurrencia de HSVI, con daño en los tejidos de soporte y protección periodontal, aún sin las manifestaciones clínicas características y éstos episodios podrían pasar inadvertidos a los odontólogos.

Además, las células gingivales infectadas que expresen en su superficie antígenos virales, serán el blanco de las células de vigilancia inmunológica, generándose destrucción tisular como respuesta a la infección viral. Los fibroblastos gingivales también pueden estar implicados en la fisiopatología de esta infección, porque al permitir la replicación viral, facilitarían el paso a tejidos más profundos en el organismo, desde las capas superficiales en piel y mucosas, propiciando el compromiso de las terminaciones nerviosas y, por ende, los episodios de latencia a nivel neural.

Investigación más exhaustiva de estas hipótesis se hace necesaria en este campo para dilucidar la participación de estos virus en las alteraciones agudas y crónicas del periodonto.

### SUMMARY

In this work, Fibroblast Cells from healthy human gingiva were cultivated in Vitro and its sensitivity to Herpes Simplex

Virus I, (HSV I) was studied. The Fibroblast were sensitive to HSV I infection using viral stock reference and saliva from patients with acute symptoms of infection by HSV I.

These cells supported viral multiplication as evidenced by the develop of cytopathogenic effect and positive immunofluorescence staining with monoclonal and policlonal antibodies against HSV I.

The Gingival Fibroblast might serve as a primary site for viral multiplication in Vivo such as facilitate the access to gingival connective tissue and could serve as a extraneural reservoir for Herpes Simplex Type I.

### BIBLIOGRAFIA

1. WHITLEY R. J. Herpes Simplex Viruses. In *Virology* edited by B.N. Fields. D. M. Knipe et al. Raven Press Ltd. Chapter 66: 1843-1857. New York 1990.
2. ROIZMAN B. and SEARS A. E. An inquiry into mechanisms of Herpes Simplex Virus Latency. In: *Ann. Rev. Microbiol.* 41:543-571, 1987.
3. STEVENS J. G. Human Herpesviruses: A consideration of the latent State. *Microbiol Reviews* 53:318-332, 1989.
4. EHRLICH J., COHEN G.H., HOCHMAN N. Specific herpes simplex virus antigen in human gingiva. *J. Periodontol* 54: 357-360, 1983.
5. ZAKAY-RONES Z., HOCHMAN N., RONES Y. Immunological response to herpes virus in human gingival fluid. *J. Periodontol* 52: 324-327, 1981.
6. AMIT R., MORAGA., RAVID Z., HOCHMAN N., EHRLICH J. and ZAKAY-RONES Z. Detection of Herpes Simplex Virus in Gingival Tissue. *J. Periodontol* 63: 502-506, 1992.
7. RONES Y., HOCHMAN N., EHRLICH J., and RONES Z. Sensitivity of Oral Tissues to Herpes Simplex Virus in vitro. *J. Periodontol* 54: 91-95, 1983.
8. ARNOLD L. F., BARAM P. In vitro culture of periodontal ligament cells. *J. Dent Research* 51: 953-959, 1972.
9. YAJIMA T., ROSE G.G., MAHAN C.J. Human

gingival fibroblast cell lines in vitro. II. Electron microscopic studies of fibrogenesis. *J. Periodon Research* 15: 267-287, 1980.

10. HASSELL T. M., STANEK E. J. Evidence that healthy human gingiva contains functionally heterogeneous fibroblast subpopulations. *Arch Oral Biol.* 28: 617-625, 1983.

11. ROSE G. R., YAMASAKI A., PINERO G. J., MAHAN C. J. Human Periodontal Ligament cells in vitro. *J. Perio Research* 22: 20-28, 1986.

12. LENNETTE E. H., SCHMIDT N. J. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. American Public Health Association. Washington D.C. 1979.

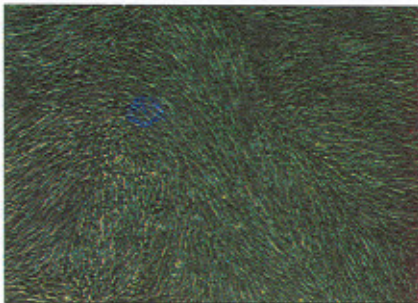
13. SPRAUNCE S. L. Pathogenesis of Herpes Simplex labialis. Excretion of virus in oral cavity. *J. Clin. Micro.* 19: 675-679, 1984.

14. LUID. Fluorescent antibody techniques. *Diagnostic procedures for viral and Rickettsial infections.* In: Lennette E. H. and Schmidt. N. Y. Ed 4: 179-204. American Health Association Inc. 1968.

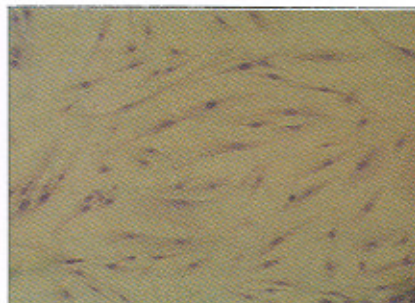
15. ESPY M. J., SNITYT F. Detection of herpes simplex virus in conventional tube cell cultures and in shell vials with a DNA probe kit and monoclonal antibodies. *J. Clin Micro* 26: 22-24, 1988.

16. LINDEMANN R.A., GOLUB S. H., PARK N. H. HSV I Infected Oral Epithelial Cells are targets for Natural Killers Cells. *J. Dent Res.* 66:770-773, March, 1987.

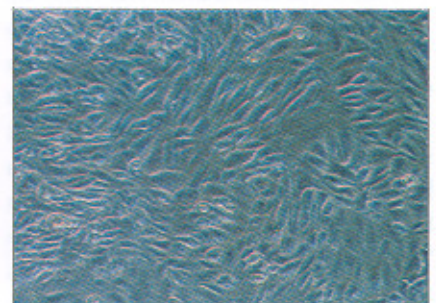
## Anexo No. 1



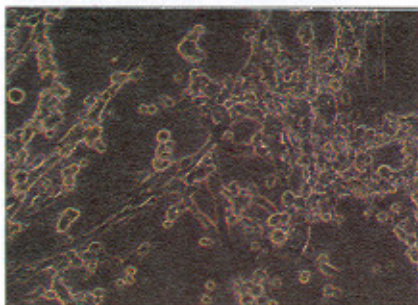
**CULTIVO FIBROBLASTOS GINGIVALES.** Se observan en microscopia de luz las típicas células fusiformes y elongadas. Olympus II objetivo 10x. (Foto 1).



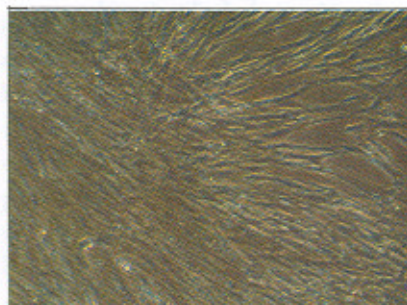
**TINCION DE GIEMSA MONOCAPA DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS.** Se observa la morfología de la célula y se visualiza en núcleo. Olympus II 20x (foto 2).



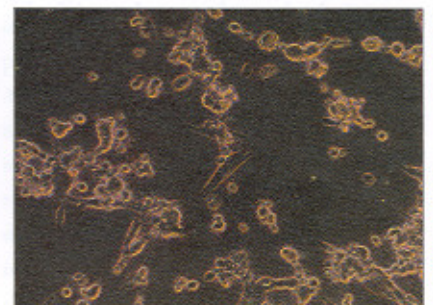
**CULTIVO RIÑÓN EMBRIONARIO HUMANO.** Se visualizan los diversos tipos celulares, células epiteliales, fibroblásticas y mesenquimales que al ofrecer una amplia gama de receptores favorecen la infección. Olympus II 10x. (Foto 3).



**EFEECTO CITOPATICO DE HSV I SOBRE RIÑÓN EMBRIONARIO HUMANO.** Se observan alteraciones en la polaridad celular con destrucción de las células infectadas a las 24 horas. (foto 4).



**CULTIVO FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS (Foto 5).**



**EFEECTO CITOPATICO DE HSV I SOBRE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS. (Foto 6).**