



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Esclerosis múltiple: evaluación de la respuesta de los linfocitos
T ante la estimulación con virus varicela zoster”**

T E S I S

Que presenta

Q.B.P. MIRIAM PATRICIA PÉREZ SALDÍVAR

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

Directora de Tesis:

Dra. Martha Espinosa Cantellano

El presente trabajo se realizó:

En el laboratorio 1 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Y

En el laboratorio de Neuro-inmunología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Bajo la tutoría de la Dra. Martha Espinosa Cantellano del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular; además de la asesoría del Dr. Adolfo Martínez Palomo del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular y del Dr. Leopoldo Santos Argumedo del Departamento de Biomedicina Molecular del Cinvestav.

Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (número de CVU 707838, apoyo 420391).

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha Espinosa Cantellano, quien ha hecho posible el desarrollo de este trabajo, me ha compartido su conocimiento y me ha dado importantes herramientas para el futuro.

Al Dr. Adolfo Martínez Palomo, por haberme brindado su apoyo y guía en cada etapa del proyecto.

Al Dr. Leopoldo Santos Argumedo, por sus valiosos consejos durante el desarrollo de este trabajo, además de proporcionarme las bases del conocimiento para llevarlo a cabo.

A la M. en C. Graciela Ordoñez Lozano, por su constante apoyo en la parte metodológica, su preocupación y su entrega a los alumnos.

Al Dr. Benjamín Pineda Olvera, por su participación indispensable en el diseño del proyecto y su guía en el manejo de los equipos.

A mis compañeros y amigos, quienes me acompañaron a lo largo de este trayecto y formaron parte importante de mi aprendizaje.

DEDICATORIAS

A mis padres, por su apoyo incondicional y su motivación en cada etapa de mi vida. A mi hermana Liliana y mi hermano Mauricio, por su amor, sus consejos y su compañía, los amo inmensamente.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice de figuras	iii
Resumen	iv
Abstract	v
1. Introducción	1
1.1 Historia de la esclerosis múltiple	1
1.2 Epidemiología de la esclerosis múltiple	2
1.3 Características clínicas	3
1.4 Fisiopatología	4
1.4.1 Activación y proliferación de infocitos T	7
1.5 Factores de riesgo para el desarrollo de la EM	8
1.5.1 Factores genéticos	9
1.5.2 Factores ambientales	9
1.6 Características del virus varicela zoster	11
1.6.1 Características clínicas	11
1.6.2 Características estructurales	12
1.6.2 Ciclo de replicación	13
2. Antecedentes	14
3. Justificación	17
4. Hipótesis	17
5. Objetivo general	18
5.1 Objetivos particulares	18
6. Material y Métodos	19
6.1 Diseño de investigación	19
6.2 Material biológico	20
6.3 Reactivos	20
6.4 Técnicas de laboratorio	20
6.4.1 Procesamiento de la vacuna de VVZ	20
A. Extracción de DNA	20
B. PCR en tiempo real	22
C. Determinación de proteínas totales	22
6.4.2 Obtención y procesamiento de muestras	23
A. Aislamiento y congelación de CMSP	23
B. Descongelación de CMSP	23
C. Conteo y evaluación de la viabilidad de las CMSP	24
D. Cultivo de CMSP	24
E. Evaluación de la proliferación de los linfocitos T	25
F. Cuantificación de citocinas	27
G. Determinación de anticuerpos IgG e IgM contra VVZ y VEB	28
6.5 Procesamiento de los datos	28
6.5.1 Pruebas estadísticas	28
7. Resultados	29
7.1 Bases de datos de pacientes y controles	29
7.2 Identificación y cuantificación de las subpoblaciones proliferantes de linfocitos T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ y Tregs	31

7.3 Comparación de la proliferación de las subpoblaciones de linfocitos T antes y después de ser estimuladas con VVZ, entre los grupos de estudio	32
7.4 Cuantificación de citocinas secretadas por los linfocitos T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ y Tregs activados	40
7.5 Determinación de anticuerpos IgG e IgM específicos contra VVZ y VEB en el suero de pacientes y controles	49
8. Discusión	51
8.1 Proliferación de las subpoblaciones de linfocitos T estimulados con VVZ	51
8.2 Cuantificación de citocinas producidas por los linfocitos T activados	53
8.3 Determinación de anticuerpos IgG e IgM contra VVZ y VEB	55
9. Conclusión	56
10. Perspectivas	57
11. Referencias	58
12. Apéndice	62
12.1 Soluciones	62
12.2 Kits comerciales	63
12.3 Detalles de los protocolos	65

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Prevalencia de la esclerosis múltiple por país, en el año 2013	2
Figura 2. Ciclo de replicación del virus varicela zoster	13
Figura 3. Selección de la región de linfocitos (R1) en el citómetro de flujo	25
Figura 4. Identificación de subpoblaciones de linfocitos T proliferantes en el software FlowJo	27
Figura 5. Comparación de la proliferación de linfocitos T CD4 ⁺ entre los grupos de estudio	33
Figura 6. Comparación de la proliferación de linfocitos T CD4 ⁺ entre los diferentes estímulos	34
Figura 7. Comparación de la proliferación de linfocitos T CD8 ⁺ entre los grupos de estudio	35
Figura 8. Comparación de la proliferación de linfocitos T CD8 ⁺ entre los diferentes estímulos	37
Figura 9. Comparación de la proliferación de linfocitos Treg entre los grupos de estudio	38
Figura 10. Comparación de la proliferación de linfocitos T reg entre los diferentes estímulos	39
Figura 11. Comparación de la concentración de IL-2 secretada por los linfocitos T, con y sin estímulo, entre los tres grupos de estudio	41
Figura 12. Comparación de la concentración de IFN- γ secretada por los linfocitos T, con y sin estímulo, entre los grupos de estudio	43
Figura 13. Comparación de la concentración de TNF secretada por los linfocitos T, con y sin estímulo, entre los grupos de estudio	44
Figura 14. Comparación de la concentración de la IL-17A secretada por los linfocitos T, entre los grupos de estudio	45
Figura 15. Comparación de la concentración de la IL-17A secretada por los linfocitos T, con y sin estímulo	46
Figura 16. Comparación de la concentración de IL-10 secretada por los linfocitos T, con y sin estímulo, entre los grupos de estudio	48
Figura 17. Comparación de la presencia de anticuerpos IgG e IgM contra VVZ entre los grupos de estudio	49
Figura 18. Comparación de la presencia de anticuerpos IgG e IgM contra VEB entre los grupos de estudio	50

RESUMEN

La esclerosis múltiple es una enfermedad desmielinizante crónica del sistema nervioso central, en la que está implicado un proceso inflamatorio de tipo autoinmune. Actualmente se desconoce el factor que desencadena este proceso, aunque se ha relacionado con factores tanto genéticos como ambientales, entre estos últimos destacan los virus de la familia *Herpesviridae*. En poblaciones caucásicas se ha asociado principalmente con el virus Epstein-Barr. Sin embargo, en la población mexicana Sotelo y col. han reportado una elevada incidencia de partículas de virus varicela zoster en líquido cefalorraquídeo y en células mononucleares de pacientes con esclerosis múltiple remitente-recurrente en fase de exacerbación, aunque no se ha establecido su papel en la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de los linfocitos T de pacientes con esclerosis múltiple en fase de brote y en remisión, a la estimulación con una cepa atenuada del virus varicela zoster. Para ello, se obtuvieron muestras de sangre periférica de estos pacientes y de un grupo de individuos sanos, se aislaron las células mononucleares y se estimularon con el virus varicela zoster. Se marcaron los linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y T reg con anticuerpos monoclonales conjugados para su identificación por citometría de flujo, y la proliferación fue evaluada mediante la incorporación de bromodesoxiuridina. Además, se cuantificaron las citocinas presentes en el sobrenadante del cultivo estimulado con el virus y se determinaron los anticuerpos IgG e IgM contra varicela zoster y Epstein-Barr en el suero de los pacientes y controles. Se encontró una mayor proliferación en los linfocitos T de los pacientes (tanto en brote como en remisión) en comparación con el grupo control, ante la estimulación con varicela zoster. No se obtuvo diferencia significativa entre la producción de citocinas en los cultivos de linfocitos T con y sin estímulo, en ambos grupos de pacientes. Los pacientes y los controles presentaron un perfil similar de anticuerpos IgG e IgM contra los virus varicela zoster y Epstein-Barr. En conclusión, los linfocitos T de pacientes con esclerosis múltiple remitente recurrente presentan una mayor respuesta ante la estimulación con virus varicela zoster respecto al grupo control.

ABSTRACT

Multiple sclerosis is a chronic demyelinating disease of the central nervous system, in which an autoimmune inflammatory process is involved. Currently the factor that triggers this process is unknown, although it has been related to both genetic and environmental factors, among which viruses of the family *Herpesviridae* stand out. In Caucasian populations, multiple sclerosis has been associated mainly with the Epstein-Barr virus. However, in the Mexican population Sotelo et al. have reported a high incidence of varicella zoster virus in cerebrospinal fluid and mononuclear cells of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis in the exacerbation phase, although their role in the disease has not been established. The aim of this study was to evaluate the response of T lymphocytes from patients with multiple sclerosis in the attack phase and in remission to stimulation with an attenuated strain of varicella zoster virus. For this, peripheral blood samples were obtained from these patients and from a group of healthy individuals, mononuclear cells were isolated and stimulated with varicella zoster virus. CD4+, CD8+ and regulatory T lymphocytes were labeled with monoclonal antibodies conjugated for identification by flow cytometry and proliferation was evaluated by the incorporation of bromodeoxyuridine. In addition, the cytokines in cell culture supernatant stimulated with the virus were quantified, and the IgG and IgM antibodies against varicella zoster and Epstein-Barr were determined in the serum of patients and controls. There was a significantly higher proliferation in T lymphocytes of patients (both in relapse and in remission) compared to the control group, after the stimulation with varicella zoster. There was no significant difference in both group of patients between cytokine production in T cell cultures with and without stimulation. Patients and controls had a similar profile of IgG and IgM antibodies against varicella zoster and Epstein-Barr viruses. In conclusion, T lymphocytes from patients with relapsing remitting multiple sclerosis show a higher response to stimulation with varicella zoster virus than the control group.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia de la esclerosis múltiple

Desde los primeros siglos se han descrito enfermedades caracterizadas por parálisis de lenta progresión con episodios de visión borrosa y disminución de la marcha, sin atribuirles un término específico. A finales del siglo XVIII, el término “paraplejia” fue utilizado en todas las personas con parálisis progresiva (Murray, 2005). No fue hasta el siglo XIX, cuando se inició la clasificación y separación de este tipo de enfermedades, en la que Jean-Martin Charcot, profesor de la Universidad de París a quien se ha llamado “el padre de la neurología”, tuvo una importante participación. Él y su colega Edmé Vulpian, contemplaron los temblores de ciertos pacientes e intentaron diferenciarlos de los descritos por James Parkinson en 1817, notando un patrón en adultos jóvenes con temblor y parálisis, en cuyas autopsias se revelaron placas grises dispersas a lo largo de la médula espinal, tallo y cerebro. Así fue como en 1868, Charcot le dio el nombre de “*sclérose en plaque disseminée*” o esclerosis múltiple, a este tipo de enfermedad, caracterizada también por otros problemas neurológicos como alteraciones en el habla y movimientos oculares anormales (Murray, 2005).

En los últimos 100 años se han suscitado diversos avances que han llevado a la comprensión fundamental de que la esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria multifocal que afecta principalmente a la sustancia blanca del sistema nervioso central (SNC), lo que resulta en una neurodegeneración progresiva (Nylander y Hafler, 2012). La hipótesis de que la EM es una enfermedad autoinmune puede atribuirse a las observaciones de Thomas Rivers en el Instituto Rockefeller. En 1933 Rivers demostró que la inyección de cerebro y médula espinal de conejo en primates resulta en una enfermedad desmielinizante (Rivers, Sprunt y Berry, 1933). Esta enfermedad, conocida como encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE), ha servido como un modelo animal importante para la esclerosis múltiple (Hernández y col. 2014).

1.2 Epidemiología de la esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple es una enfermedad desmielinizante, crónica e inflamatoria del SNC (Salehi y col., 2016). En gran parte de los países de Norteamérica y Europa, la EM tiene una prevalencia de 100 a 200 por 100,000 habitantes y la incidencia es de aproximadamente cinco a seis casos por 100,000 habitantes por año (Goodin, 2014). En México no hay estadísticas confiables, aunque los escasos trabajos que se han realizado sobre epidemiología de 2013 a la fecha, estiman una prevalencia de 10 a 20 casos por cada 100,000 habitantes (Fig. 1). Esta enfermedad es más frecuente en mujeres que en hombres, con una relación de 2:1 (Cree, 2014). La edad en la que se manifiesta clínicamente generalmente es entre los 20 y los 45 años, aunque puede aparecer en etapas más jóvenes o más avanzadas de la vida (Goodin, 2014).

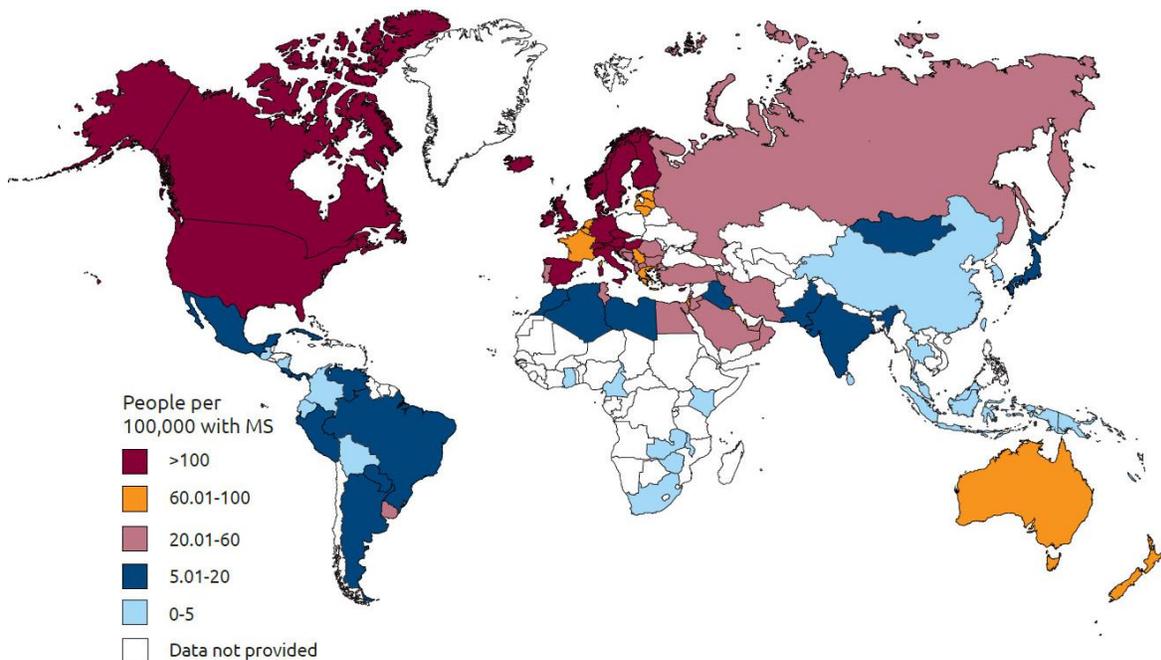


Fig.1. Prevalencia de la esclerosis múltiple por país, en el año 2013. Fuente: Federación Internacional de Esclerosis Múltiple www.msif.org.

1.3 Características clínicas

Los signos y síntomas de la esclerosis múltiple son variables, ya que puede afectar cualquier parte del SNC. Los más comunes son disminución o pérdida de sensibilidad debido al daño en las fibras espinotalámicas o de la columna posterior, pérdida de la visión por neuritis óptica, debilidad en las extremidades y espasticidad relacionadas con la alteración de los tractos corticoespinales, temores y falta de coordinación en la marcha debidas al daño en las fibras cerebelosas y espinocerebelosas, anormalidades de la función de los nervios craneales (tales como visión doble por consecuencia de las perturbaciones en el movimiento ocular conjugado) secundarias a las lesiones del tronco cerebral (Hernández y col. 2014).

Se reconocen tres formas clínicas de la enfermedad:

Síndrome clínico aislado: se reconoce como la primera presentación clínica de una enfermedad que muestra características de desmielinización inflamatoria que podría ser EM, pero que aún no cumple los criterios de diseminación en el tiempo (Lublin y col., 2014).

Remitente-recurrente (EMRR): es la forma más común de la EM, alrededor del 80-90% de todos los pacientes se incluirán en esta categoría en algún momento del curso de su enfermedad. Las recaídas ("ataques" o "brotos") son episodios discretos de disfunción neurológica que típicamente evolucionan durante horas a días y luego persisten días o semanas antes de la remisión. Entre los brotes, los pacientes tienden a ser estables, pero a menudo experimentan fatiga y sensibilidad al calor (Gelfand, 2014).

Progresiva: en esta forma clínica se observa un deterioro constante en el paciente. Aunque la progresión no se presenta de manera uniforme y puede permanecer estable durante cortos períodos de tiempo, no es posible definir períodos de brote o de remisión (Gelfand, 2014; Lublin y col., 2014). Se divide en primaria progresiva y secundaria progresiva, la primera se presenta como empeoramiento neurológico insidioso y acumulación de la discapacidad desde el inicio de la enfermedad y es diagnosticada en aproximadamente el 10% de los pacientes. La forma secundaria progresiva es diagnosticada retrospectivamente por una historia de empeoramiento gradual después de un curso inicial de tipo remitente-recurrente, con o sin exacerbaciones agudas durante el curso progresivo (Gelfand, 2014).

El diagnóstico de la EM se basa en los criterios diagnósticos de McDonald's, que vinculan la manifestación clínica con las lesiones características observadas mediante resonancia magnética (MRI), análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) y potenciales evocados visuales (Lublin y col., 2014).

1.4 Fisiopatología

La EM es un padecimiento crónico de desregulación inmunológica que produce daño a la cubierta de mielina y a los axones en el SNC. Aunque se ha comprobado que el proceso inflamatorio en la esclerosis múltiple esté mediado por una respuesta autoinmune, el factor que desencadena esta respuesta es aún desconocido (Karussis, 2014). Las placas desmielinizantes en el SNC son las lesiones características de la EM y su clasificación se ha basado en la progresión temporal del daño inflamatorio: placas agudas, crónicas activas y crónicas silenciosas. La placa aguda representa el estado más temprano de la formación de una lesión, se caracteriza por un marcado infiltrado inflamatorio combinado con desmielinización poco definida alrededor de la lesión y edema parenquimatoso. Las placas crónicas presentan una región central de hipocelularidad rodeada de pérdida de mielina, cicatrización glial y bordes bien definidos que pueden mostrar destrucción inflamatoria activa (placa crónica activa) o carecer de ésta (placa crónica silenciosa) (Wu y Alvarez, 2011).

Los infiltrados inflamatorios están constituidos por linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺ y linfocitos B, monocitos y macrófagos (Jorg y col., 2016). Las células T CD4⁺ se clasifican en células Th1 y Th17, las primeras se diferencian en respuesta a la activación en presencia de la interleucina 12 (IL-12) y se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Tbet, el cual controla un programa de expresión génica que resulta en la producción de interferón gamma (IFN- γ) y otras moléculas efectoras (O'Garra y Murphy, 2009). Por otro lado, las células Th17 se diferencian en respuesta a la activación en presencia de IL-23, aunque también pueden diferenciarse en respuesta a una combinación de factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) con IL-6 e IL-21. Estas células se caracterizan por la expresión del factor de transcripción ROR γ t, que controla un programa de

expresión génica que resulta en la expresión de IL-17 (Sie, Korn y Mitsdoerffer, 2014).

Tanto las células Th1 como las Th17 reconocen autoantígenos como la proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolípídica (PLP) y la glicoproteína asociada a mielina (MAG) (Farez y Correale, 2016) promoviendo la activación de microglia, macrófagos, astrocitos y linfocitos B a través de la producción de citocinas y factores de crecimiento, que constituyen mecanismos adicionales de neurodegeneración (Quintana, Perez-Sanchez y Farez, 2014).

A pesar de que actualmente se tiene la teoría de que los linfocitos T CD4⁺ autorreactivos son las células involucradas en el desencadenamiento de la esclerosis múltiple, sobre todo de la forma remitente-recurrente, muchas otras células del sistema inmune innato y adaptativo participan en la patogénesis de esta enfermedad. Por ejemplo, las células dendríticas han mostrado tener un papel crítico en la invasión del SNC, presentando el antígeno a los linfocitos T autorreactivos (Lande y col., 2008).

En la EM se observa un elevado número de linfocitos B en el SNC, principalmente células B de memoria y células plasmáticas (Karussis, 2014). Los linfocitos B participan en la patogénesis de esta enfermedad mediante la secreción de anticuerpos y citocinas, ya que se han encontrado anticuerpos específicos contra mielina en el líquido cefalorraquídeo (LCR), suero y placas desmielinizantes de pacientes con EM, además de presentar un incremento en la secreción de citocinas proinflamatorias por linfocitos B activados. Así, se ha observado que la linfoxina (LT) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) son mediadores de la toxicidad contra oligodendrocitos *in vitro* (Piancone y col., 2016).

Por otro lado, los linfocitos T CD8⁺ son capaces de dañar directamente los axones mediante la secreción de granzima B y perforina (Irani, 2005), se encuentran en una proporción de 3 a 10 veces mayor que los linfocitos T CD4⁺ en las placas crónicas activas y, a diferencia de éstos, no sólo se expanden clonalmente en las regiones perivasculares sino también en el parénquima (Quintana y col., 2014).

La microglia, los macrófagos residentes del SNC, constituyen aproximadamente el 10% de las células de este sistema y se encargan de la remoción de los desechos celulares y la detección de patógenos (Goldmann y Prinz, 2013). En los estadios tempranos de la EM, pueden identificarse grupos de microglia activada formando parte de las lesiones que producen el daño axonal y neuronal (Singh y col., 2013). La quimiocina CCL-2 producida por microglia activada, afecta la integridad de la barrera hematoencefálica y atrae macrófagos periféricos al SNC (Quintana y col., 2014), los cuales a su vez contribuyen al deterioro tisular liberando moléculas tóxicas como óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno y citocinas proinflamatorias (Zindler y col., 2010). Las teorías en relación con la patogénesis de la inflamación autoinmune del SNC asumen que hay una perturbación en el equilibrio entre las células que causan desmielinización y, por tanto, daño tisular (linfocitos T efectores activados) y las células que son capaces de suprimir la función de las células T autorreactivas (linfocitos T reguladores).

Los linfocitos T reguladores (Treg) se clasifican de acuerdo con el fenotipo de superficie o el perfil de secreción de citoquinas. Así, existen dos subgrupos principales de células Treg: Treg naturales (nTreg) y Treg inducibles (iTreg). La población de nTreg mejor caracterizada consiste en células $CD4^+CD25^+$. Estas células se desarrollan en el timo y se distinguen por la expresión del receptor de IL-2 (CD25) y el factor de transcripción FOXP3 (*forkhead box protein P3*). Los linfocitos iTreg incluyen células Th3, las cuales se originan a partir de linfocitos T *naive* ya sea $CD4^+$ o $CD8^+$; y células Treg tipo 1 (Tr1) secretoras de IL-10, que derivan de células precursoras de linfocitos T $CD4^+$ y pueden o no expresar el factor de transcripción FOXP3 (Zozulya y Wiendl, 2008). Debido a que los linfocitos Treg controlan la actividad de las células T efectoras, el balance entre las células efectoras y reguladoras podría condicionar el avance de la enfermedad (Sakaguchi, Miyara, Costantino y Hafler, 2010).

Los oligodendrocitos son las células gliales especializadas en la producción de vainas de mielina en el SNC. El SNC tiene una elevada capacidad de regenerar la mielina, por lo que la remielinización ocurre fácilmente después de un evento de

desmielinización. Sin embargo, con el tiempo y los recurrentes ataques a la mielina durante la EM, la remielinización eventualmente falla, produciendo discapacidades significativas en los pacientes (Gaesser y Fyffe-Maricich, 2016).

1.4.1 Activación y proliferación de linfocitos T

El reconocimiento del antígeno, junto con otros estímulos de activación, inducen la secreción de citocinas, proliferación (expansión clonal), supervivencia y diferenciación de los linfocitos T *naive* en linfocitos T efectores y de memoria. Sin embargo, para poder reconocer el antígeno, los linfocitos T *naive* requieren de células dendríticas que se los presenten en forma de péptido cargado en una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Abbas y col., 2015; (Guy y col., 2013).

Los linfocitos T efectores diferenciados, pueden responder ante antígenos presentados por otras células además de las dendríticas. Por ejemplo, en una respuesta inmune humoral, los linfocitos B presentan antígenos unidos al MHC clase II a los linfocitos T CD4⁺ y a su vez reciben las señales de activación por parte de éstos. Por otro lado, en la respuesta inmune mediada por células, son los macrófagos los que presentan el antígeno por medio del MHC clase II a los linfocitos T CD4⁺ y responden a sus estímulos, mientras que teóricamente cualquier célula nucleada puede presentar un antígeno a los linfocitos T CD8⁺ por medio del MHC clase I (Abbas y col., 2015).

Vía de señalización

Los linfocitos T efectores, además de la expresión de CD4 o CD8 según sea el caso, se caracterizan por la expresión del receptor de células T (TCR) en su superficie, formando un complejo con el correceptor CD3. Una vez que reconocen un antígeno, estos receptores se activan y se lleva a cabo la fosforilación de los motivos de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAMs) en la región citoplásmica del complejo TCR/CD3, por la tirosina cinasa de linfocitos (Lck). La proteína cinasa asociada a la cadena Z (Zap-70) es reclutada al complejo TCR/CD3, en donde cambia a su forma activada, promoviendo el reclutamiento y fosforilación de proteínas adaptadoras río abajo (Smith-Garvin, Koretzky y Jordan,

2009). La fosforilación de SLP-76 por Zap-70 favorece el reclutamiento de Vav (factor intercambiador de nucleótidos de guanina), de las proteínas adaptadoras NCK y GADS, y de la cinasa inducible de células T (Itk), que a su vez fosforila a la fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1) resultando en la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) para producir los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). El DAG activa las vías PKC θ y MAPK/ERK, las cuales promueven la activación del factor de transcripción NF- κ B. Por su parte, el IP3 desencadena la liberación de Ca²⁺ a partir del retículo endoplásmico, este calcio se une a la proteína calmodulina que activa a la fosfatasa calcineurina, la cual promueve la transcripción del gen de la IL-2 a través del factor de transcripción NFAT (Malissen, Gregoire, Malissen y Roncagalli, 2014). Así, la secreción de IL-2 y la expresión de su receptor, conlleva a la proliferación celular (Abbas y col., 2015). La incorporación de señales provenientes de receptores adicionales de superficie celular (como CD28) también regulan la respuesta de los linfocitos T (Malissen y col., 2014; Smith-Garvin y col., 2009).

De forma similar a la necesidad de que las señales proporcionadas por el TCR sean complementadas por moléculas coestimuladoras, las señales reguladoras también son favorecidas por señales de coreceptor. Las moléculas antígeno-4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y muerte programada-1 (PD-1) son dos ejemplos de tales receptores que limitan la expansión y la activación de células T activadas por TCR. Estas moléculas se encuentran en linfocitos T reguladores activados, con expresión máxima de 24 a 48 horas después de la estimulación y utilizan el mismo ligando y/ o molécula de señalización que utilizan los linfocitos T efectoras como coestimulador, configurando así el potencial de competencia (Smith-Garvin y col., 2009).

1.5 Factores de riesgo para el desarrollo de la EM

La etiología de varias enfermedades autoinmunes involucra factores ambientales que, junto con la susceptibilidad genética, contribuyen al desarrollo de la enfermedad. En la EM, estos factores incluyen infecciones sobre todo de tipo viral,

poca exposición solar (deficiencia de vitamina D), estrés psicológico, ocupación, tabaquismo y dieta (Jorg y col., 2016; Nicoletti y col., 2016).

1.5.1 Factores genéticos

La evidencia de la importancia de la genética en la susceptibilidad a EM se origina en estudios epidemiológicos de factores étnicos, área geográfica, agregación familiar y recientemente en estudios de asociación del genoma completo o GWAS (Cree, 2014). Los familiares de primer grado de un paciente con EM tienen de 15 a 25 veces más riesgo de desarrollarla. Cuando los dos padres padecen EM, el riesgo aumenta a 20%. Aproximadamente 15% de los pacientes con EM tienen al menos un familiar afectado por esta enfermedad (Domínguez Moreno y col., 2012). Los primeros estudios para establecer una relación entre la herencia de EM y ciertas variables genéticas específicas, compararon polimorfismos del antígeno leucocitario humano (HLA) entre pacientes con EM y controles sanos. Se sabe ahora que la señal primaria de susceptibilidad a la EM a nivel de HLA se origina en el MHC clase II. En la población europea, el principal alelo relacionado con la EM es HLA-DRB1*15:01, que es parte del haplotipo HLA-DRB1*15:01, DQA1*01:02, DQB1*0602. Este haplotipo codifica para glicoproteínas de superficie que pueden presentar péptidos derivados de mielina a los linfocitos T (Cree, 2014). En México, se ha observado una asociación entre el locus HLA-DRB1 y la EM, sin embargo, no se ha determinado un alelo específico que se relacione con esta enfermedad.

1.5.2 Factores ambientales

Deficiencia de vitamina D

La vitamina D se ha asociado con la maduración de células dendríticas y con la modulación de las respuestas inmunes antígeno-específicas *in vivo*. Las células humanas deciduales sintetizan vitamina D de manera activa durante la gestación (especialmente en las primeras semanas de embarazo), lo que sugiere que la vitamina D puede desempeñar un papel en la regulación de las respuestas inmunitarias innatas y adquiridas en la interfase materno-fetal (Evans y col., 2006).

Estrés psicológico

Una posible asociación entre el estrés psicológico y la EM es difícil de evaluar. La naturaleza y la gravedad de la tensión producida por acontecimientos de la vida (por ejemplo, el matrimonio, la pérdida del trabajo, abuso emocional, una inversión financiera, o la muerte de un cónyuge) pueden variar considerablemente tanto entre los individuos como en la misma persona en diferentes momentos de su vida. Sin embargo, existen evidencias de asociaciones entre antecedentes de estrés psicológico y el inicio de una fase de exacerbación en la EM (Goodin, 2016).

Tabaquismo

A pesar de que algunos estudios individuales no han alcanzado significancia estadística, cada uno demuestra un exceso de casos de EM en los fumadores en comparación con los no fumadores, por lo que esta asociación parece estar razonablemente establecida. La evidencia obtenida de varios estudios apoya al tabaquismo como un factor independiente de riesgo a desarrollar la enfermedad y además se asocia con la forma progresiva al incrementar la discapacidad. Los mecanismos por los cuales el tabaquismo podría influir en el riesgo de esclerosis múltiple y su curso clínico no están claros (Wingerchuk, 2012).

Dieta

Hace más de 60 años, Swank (1950) emitió la hipótesis de que las variaciones en la frecuencia de la EM en todo el mundo podrían ser explicadas por variaciones en la cantidad (y, posiblemente, la naturaleza) del consumo de grasa. Por ejemplo, en América del Norte y Europa, donde tienen niveles altos (>100 g/día) de consumo de grasas per cápita hay una mucho mayor prevalencia de EM en comparación con Asia, América Latina y África, donde el consumo de grasa per cápita es mínimo (<60 g/día), lo que constituye un indicio de que los factores dietéticos podrían estar implicados (al menos parcialmente), ya sea en el inicio o en la exacerbación de la EM (Goodin, 2016).

Agentes virales

Dentro de los factores ambientales, los agentes virales han sido los más estudiados debido a su elevada frecuencia en pacientes con EM. Se ha planteado la hipótesis de que la estimulación del sistema inmunológico por infecciones virales es la principal causa de EM entre los individuos susceptibles (Najafi, Ghane, Yousefzadeh-Chabok y Amiri, 2016).

Las enfermedades de origen viral que se han relacionado con la etiología de la EM son sarampión, varicela zoster (VVZ), encefalitis por garrapatas, así como infección por el virus linfotrópico de células T (HTVL-1), virus herpes 6 y virus Epstein-Barr (Domínguez Moreno y col., 2012).

1.6 Características del virus varicela zoster

1.6.1 Características clínicas

La infección primaria por el virus varicela zoster causa varicela, el virus puede establecer latencia en ganglios sensoriales y reactivarse causando herpes zoster (Reichelt, Brady y Arvin, 2009; Zerboni, Sen, Oliver y Arvin, 2014). La varicela es más frecuente en niños que en adultos y se manifiesta con fiebre, erupciones cutáneas que evolucionan a vesículas pruriginosas y altamente diseminadas principalmente en cabeza y tronco. Estos síntomas generalmente se resuelven en 7 a 10 días, pero en raros casos (principalmente en bebés y adultos) se presentan complicaciones por invasión visceral como hepatitis, pancreatitis, neumonitis y encefalitis (Pergam, Limaye y Practice, 2009).

La transmisión se produce principalmente a través de la inhalación o contacto de mucosas con aerosoles procedentes de secreciones respiratorias, así como del fluido de las vesículas cutáneas. También se puede transmitir mediante contacto directo con lesiones cutáneas y objetos recientemente contaminados (Pergam y col., 2009).

Inmunología de la infección por varicela zoster

Después de la exposición, el VVZ infecta las células dendríticas de la región

nasofaríngea y éstas migran a los nódulos linfáticos adyacentes donde los linfocitos T residentes son infectados. Al infectarse los linfocitos T, éstos expresan el antígeno cutáneo asociado a linfocito (CLA) y el receptor de citocinas tipo 4 (CXCR4). Los linfocitos T CD4⁺ que expresan factores *homing* dirigidos a la piel, migran entre las células endoteliales dérmicas y una vez en la piel, el virus infecta fibroblastos y queratinocitos. Inicialmente la inmunidad innata retrasa la multiplicación viral en la piel, lo que proporciona tiempo para que la inmunidad adaptativa se desarrolle (Gershon y col., 2015). A medida que la infección transcurre, la secreción de citocinas proinflamatorias por las células infectadas produce la formación de las vesículas características de la infección por varicela (Abendroth, Kinchington y Slobedman, 2010; Eshleman, Shahzad y Cohrs, 2011). Los nervios sensoriales de la raíz dorsal terminan dentro de la dermis y se localizan en la región donde se libera el VVZ. Por lo tanto, se favorece la infección axonal por este virus, lo que llevará al desarrollo de la latencia (Eshleman y col., 2011).

1.6.2 Características estructurales

El virus varicela zoster pertenece a la familia *Herpesviridae* y a la subfamilia *Alphaherpesviridae* junto con los virus herpes simple tipo 1 y 2, es un virus con DNA lineal de doble cadena de aproximadamente 125,000 pb. Cada partícula mide entre 80 y 100 nanómetros de diámetro y consta de una nucleocápside icosaédrica formada por las proteínas codificadas por *orf20*, *orf21*, *orf23*, *orf33*, *orf40* y *orf41*, rodeada de un tegumento que a su vez está rodeado por una envoltura lipídica (Zerboni y col., 2014).

El genoma del virus de varicela zoster consiste en una región única larga (UL) delimitada por repetidos terminales largos (TRL) y repetidos internos largos (IRL); y de una región única corta (US) delimitada por repetidos internos cortos (IRS) y repetidos terminales cortos (TRS). Contiene al menos 70 marcos de lectura abiertos (ORFs), 7 de los cuales codifican para glicoproteínas (g): gB (*orf31*), gC (*orf14*), gE (*orf68*), gH (*orf37*), gI (*orf67*), gK (*orf5*), gL (*orf60*), gM (*orf50*) y presumiblemente gN (*orf9A*). Se han realizado estudios en donde se

comprueba que la gB es crítica para la entrada del virus a la célula, la gE se une al receptor celular (enzima degradante de insulina) y las gH y gM son importantes para la diseminación del virus de una célula a otra (Cohen, 2010).

1.6.3 Ciclo de replicación

Las partículas virales se adhieren a la membrana plasmática y se fusionan con ella liberando las proteínas del tegumento. Las nucleocápsides desnudas llegan a los poros nucleares por donde el DNA genómico es inyectado al núcleo y se circulariza. Los genes inmediatamente tempranos se expresan, seguidos por los genes tempranos y tardíos. Así, las cápsides se ensamblan, el DNA recién sintetizado se empaqueta dentro de éstas y migran hacia la membrana nuclear brotando a través de ella, adquiriendo una envoltura primaria. Una vez que las cápsides entran en el citoplasma, las glicoproteínas virales maduran en la región *trans*-Golgi y las proteínas del tegumento se ensamblan en vesículas para posteriormente adquirir una envoltura secundaria a partir de las cisternas del *trans*-Golgi. Las partículas virales maduras son transportadas a la superficie celular, donde son liberadas directamente hacia otra célula (Zerboni y col., 2014).

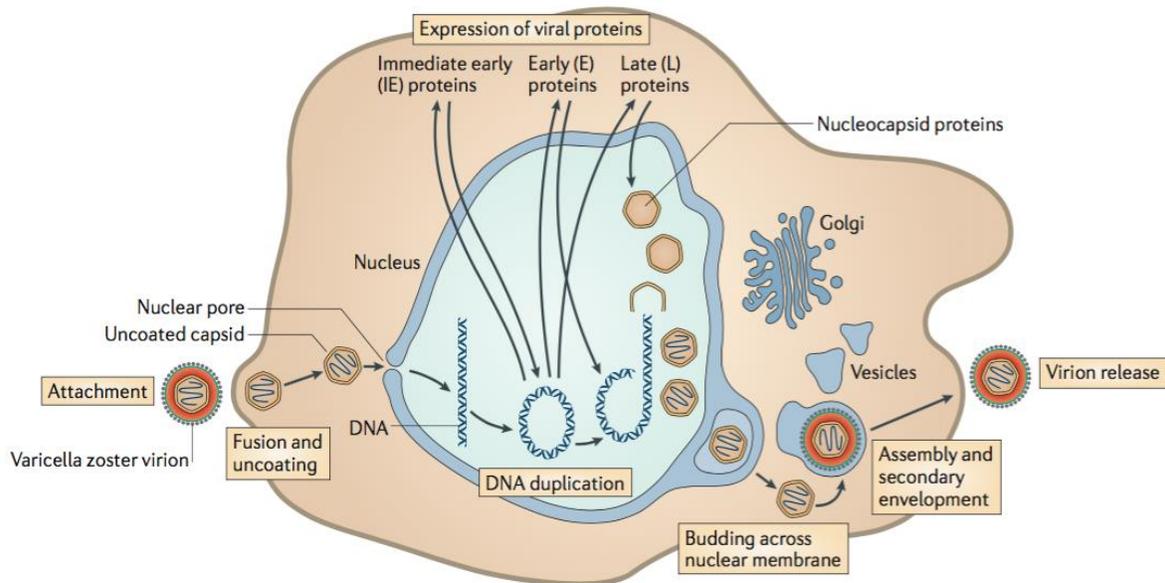


Fig. 2. Ciclo de replicación del virus varicela zoster. Fuente: Zerboni y col., 2014.

2. ANTECEDENTES

En el año 2001, Marrie y Wolfson llevaron a cabo una investigación bibliográfica evaluando la evidencia epidemiológica del papel de la infección por el VVZ en el desarrollo de EM. La búsqueda en MEDLINE de estudios realizados durante el período de 1965-1999 produjo 40 resultados. Trece estudios fueron categorizados como sero-epidemiológicos, 23 como caso-control, dos de cohorte histórico y dos ecológicos. Sin embargo, estos estudios no logran demostrar un incremento en el riesgo de desarrollar esclerosis múltiple por una infección de varicela zoster (Marrie y Wolfson, 2001).

Posteriormente, en 2002 Tarrats y col. realizaron un estudio de casos y controles en 94 pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México (INNN), con diagnóstico definitivo de EM; eran mestizos y siempre habían vivido en el país. Utilizaron un cuestionario que incluía antecedentes demográficos, nutricionales, infecciosos y personales, previamente identificados en otros trabajos como posibles factores de riesgo para la EM. Seleccionaron un grupo control (C1) de 110 pacientes del INNN con una variedad amplia de enfermedades neurológicas, excluyendo trastornos desmielinizantes y un grupo adicional control (C2) de 100 trabajadores sanos del hospital. La diferencia en la frecuencia de la varicela, la lactancia materna efímera y el eczema en la historia clínica de los pacientes con EM fue significativa en comparación con los controles. Los autores concluyen que estos factores pudieron participar en el aumento de la EM en países como México, tradicionalmente considerado como de muy baja incidencia (Tarrats, Ordonez, Rios y Sotelo, 2002).

Tomando en cuenta los antecedentes anteriores, en 2008 Sotelo y col. realizaron observaciones ultraestructurales de partículas virales por microscopía electrónica en el LCR de 15 pacientes con EM en fase de brote, 19 pacientes con EM en remisión y 28 sujetos control con trastornos neurológicos inflamatorios o funcionales, todos originarios de México. Además, el DNA del VVZ se cuantificó por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y LCR de 78 pacientes con EM. Se

encontraron abundantes partículas virales idénticas al VVZ en el LCR obtenido de pacientes con EM en los primeros días de una recaída aguda. Por el contrario, las partículas virales no fueron vistas en las muestras de LCR de pacientes con esclerosis múltiple en remisión o de los sujetos control. Por otro lado, la carga viral media era 542 veces mayor en el LCR en la recaída que en LCR en remisión y 328 veces mayor en LCR que en CMSP, concluyendo que los resultados obtenidos apoyan la participación del VVZ en la patogénesis de la EM (Sotelo, Martínez-Palomo, Ordonez y Pineda, 2008).

Sotelo y col. llevaron a cabo un estudio en 2014 en el que incluyeron 53 pacientes mexicanos con EM definida; 31 pacientes fueron estudiados durante la primera semana de una recaída clínica, mientras que 16 fueron estudiados durante la remisión; también se estudiaron seis pacientes con EM progresiva. Los genes de cinco tipos de herpesvirus (varicela zoster, herpes simple 1 y 2, Epstein-Barr y herpes 6) fueron amplificados por PCR en el LCR y en CMSP. Como controles se incluyeron 21 pacientes con trastornos neurológicos inflamatorios o funcionales. El DNA del VVZ se encontró en el LCR de los pacientes con EM estudiados durante la recaída (100%) y en CMSP de 28 de ellos (90%). Sin embargo, este DNA fue encontrado en el LCR de sólo 5 pacientes con EM en remisión (31%) y en CMSP de 3 de ellos (19%). El DNA del VVZ también fue encontrado, pero en cantidades inferiores, en el LCR (83%) y CMSP (33%) de los pacientes con EM progresiva. Por el contrario, el DNA de este virus no se encontró ni en LCR ni en CMSP de los controles. Los resultados de los otros herpesvirus probados fueron similares en los pacientes con EM y en los controles. Los resultados corroboran la presencia conspicua, pero efímera del VVZ durante las recaídas de la EM y apoyan la hipótesis de la participación de VVZ en la etiopatogenia de la EM (Sotelo, Ordonez, Pineda y Flores, 2014).

En 2016 Najafi y col. investigaron la prevalencia del VVZ en plasma y CMSP de 171 individuos asiáticos, de los cuales 82 fueron pacientes con EMRR y 89 fueron individuos control. Se evaluó la presencia de anticuerpos anti-VVZ y del DNA del virus por los métodos ELISA y PCR. De todos los pacientes con EM, 78

(95.1%) y 21 (25.6%) fueron positivos para anticuerpos anti-VVZ y para el DNA, respectivamente. El análisis estadístico de los resultados de la PCR mostró una correlación significativa entre la abundancia de VVZ y la enfermedad ($P < 0.001$). Sin embargo, no hubo correlación significativa entre la abundancia de anticuerpos anti-VVZ y la EM por el método de ELISA. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el VVZ puede contribuir al desarrollo de EM mediante el establecimiento de un proceso de infección sistémica y la inducción de una respuesta inmune (Najafi y col., 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

La etiología de la esclerosis múltiple es aún desconocida. Sin embargo, se ha relacionado con factores genéticos y ambientales, dentro de este último grupo se han señalado algunos agentes infecciosos, en particular ciertos virus de la familia *Herpesviridae*, como Epstein-Barr (VEB) y varicela zoster. A pesar de los reportes de la elevada incidencia de este último virus en sangre periférica y LCR de individuos con esclerosis múltiple en México, no se ha logrado establecer su participación en la enfermedad. Conocer la respuesta de los linfocitos T de estos pacientes ante la estimulación con el VVZ aporta información a la patogenia de la esclerosis múltiple.

4. HIPÓTESIS

La respuesta de los linfocitos T estimulados por el VVZ será mayor en los pacientes con esclerosis múltiple en fase de exacerbación, con respecto a la respuesta de los linfocitos de pacientes en período de remisión y de los individuos sanos.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta a la estimulación con el VVZ, de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y T regs de sangre periférica de pacientes con esclerosis múltiple en fase de exacerbación y de remisión y compararla con la respuesta de linfocitos T provenientes de individuos sanos.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar una base de datos de los pacientes con EMRR y de los individuos control, incluidos en este trabajo.
2. Identificar y cuantificar las subpoblaciones proliferantes de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y Tregs estimulados con VVZ.
3. Comparar la proliferación de estas subpoblaciones antes y después de ser estimuladas con VVZ, entre los tres grupos de estudio.
4. Cuantificar las citocinas secretadas por las células T CD4⁺ (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-17), CD8⁺ (IFN- γ) y Tregs (IL-10) activadas.
5. Determinar la presencia de anticuerpos IgG e IgM específicos contra el VVZ y el virus Epstein-Barr en el suero de pacientes y controles.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Se llevó a cabo un estudio analítico, experimental, longitudinal, prospectivo, en una cohorte de pacientes con diagnóstico de EMRR definida, atendidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), hospital de asistencia terciaria de la Ciudad de México. El brote fue definido por el médico tratante, por la aparición de nuevos síntomas neurológicos o empeoramiento de los síntomas preexistentes con duración de más de 24 horas, tras un periodo de al menos 30 días de mejoría o estabilidad en ausencia de infección o fiebre.

Consideraciones éticas

El presente trabajo fue aprobado por los comités de ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y del Cinvestav. Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes para la realización del estudio.

SUJETOS Y PERÍODO DE ESTUDIO

Se incluyeron 48 sujetos de estudio, 20 pacientes con EMRR en fase de exacerbación, 12 de los cuales fueron estudiados también en remisión y 28 individuos sanos como control. Las muestras de los sujetos fueron recolectadas durante el período de agosto de 2016 a junio de 2017.

Criterios de inclusión

Hombres y mujeres con EMRR, que cursaban con un período de exacerbación con tiempo de evolución igual o menor a 8 días.

No haber recibido tratamiento con esteroides durante la fase actual de brote.

Criterios de exclusión

Pacientes con una forma clínica de esclerosis múltiple diferente a remitente-recurrente.

Pacientes con EMRR que hayan recibido tratamiento con esteroides durante el brote actual.

Pacientes cuya sintomatología de exacerbación tenga más de 8 días de evolución.

6.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Se obtuvo sangre periférica de pacientes y controles. Para la estimulación de linfocitos T se utilizó la vacuna Varivax[®] III, que contiene la cepa Oka/Merck del virus de varicela zoster vivo y atenuado. Como control de especificidad de antígeno se utilizó una cepa de Adenovirus tipo C (humano) donada por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

6.3 REACTIVOS

PBS (Buffer Salino de Fosfatos) a un pH de 7.4, azul tripano 0.4%, medio de cultivo RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 Gibco[™], medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) Gibco[™], suero fetal bovino (SFB) Gibco[™], tripsina/EDTA, histopaque densidad 1.077 g/ml, Recovery Cell Culture Freezing Gibco[™], sonda para la glicoproteína B (gB) del VVZ Custom TaqMan[®], TaqMan[®] Universal PCR Master mix (Applied Biosystems), solución de lisis QIAGEN, proteinasa K (20 mg/ml) Invitrogen, solución de precipitación de proteínas QIAGEN, isopropanol, etanol al 70%, agua inyectable PiSA, anticuerpos monoclonales IgG₁ de ratón BALB/c anti CD8-PerCP-Cy5.5, anti CD4-PE, anti FoxP3-PerCP-Cy5.5 y anti CD25-APC humanos, kit comercial BD[™] FITC BrdU Flow, kit comercial BD[™] Cytometric Bead Array Human Th1/Th2/Th17 Cytokine (ver apéndice).

6.4 TÉCNICAS DE LABORATORIO

6.4.1 Procesamiento de la vacuna de VVZ

Se reconstituyó una vacuna Varivax[®] III con el diluyente comercial y se almacenó a -20°C en alícuotas de 50 µl.

A. Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó mediante el protocolo modificado de Gentra Puregene Handbook 2011. Se colocaron 20 µl de la vacuna de varicela zoster reconstituida, en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se agregaron 245 µl de solución de lisis QIAGEN y 5 µl de proteinasa K (20 mg/ml), esta mezcla se agitó en vortex

durante 2 minutos para posteriormente incubar a 56°C en baño de agua durante 24 horas. Terminada la incubación, se agregaron 100 µl de solución de precipitación de proteínas y se agitó en vortex durante 1 minuto. Se incubó en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 minutos a 4°C. En un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo, se adicionaron 300 µl de isopropanol y se añadió el sobrenadante del paso anterior, descartando el botón de proteínas, se mezcló por inversión 50 veces y se incubó a -20°C durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, el tubo se mezcló por inversión 50 veces y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se secó el tubo por inversión sobre papel absorbente. Se agregaron 300 µl de etanol al 70%, se lavó el DNA mediante inversión 50 veces y se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol mediante inversión en papel absorbente durante 10 minutos. Finalmente, el DNA se diluyó en 20 µl de agua inyectable incubando a 56°C durante 5 minutos, en agitación de 500 rpm.

Cuantificación del DNA en NanoDrop 2000

El equipo NanoDrop 2000, permite la cuantificación del DNA por espectrofotometría, mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 280nm. Brevemente, se enciende el equipo y se abre el programa NanoDrop2000, se elige la opción de ácidos nucleicos y se coloca 1 µl de agua inyectable en el lugar donde se absorbe la muestra. Se da clic en la opción *Blank* para permitir al equipo el registro del blanco, se limpia la superficie de absorción con papel seda y se coloca 1 µl del DNA a cuantificar. Se da clic en la opción *Measure* y el programa arroja el valor de la cuantificación en ng/µl, de acuerdo con la absorbancia de la muestra a 260 nm. Además, proporciona la relación de la absorbancia 260/280, para conocer la pureza de la muestra, con respecto a la presencia de proteínas.

B. PCR en tiempo real

La qPCR se realizó para conocer la carga viral en la vacuna, amplificando el gen de la gB del VVZ. Se prepararon diluciones 10^{-1} y 10^{-2} del DNA de la vacuna de VVZ. En un tubo eppendorf de 1.5 ml, se preparó la mezcla de reacción agregando por cada reacción (tomando en cuenta el control negativo) 12.5 μ l de TaqMan universal PCR Master mix, 1.25 μ l de la sonda y 8.25 μ l de agua libre de RNasas y DNasas. Se agregaron a la placa de PCR 22 μ l de la mezcla de reacción por cada pozo a utilizar y posteriormente se adicionaron 3 μ l del DNA a cuantificar en el pozo correspondiente (cada dilución se cuantificó por triplicado). En el pozo del control negativo, se sustituyó el DNA por 3 μ l de agua libre de RNasas y DNasas. Se selló la placa con una cubierta adhesiva y se centrifugó durante 15 segundos a 1000 rpm, para eliminar burbujas. La placa se colocó en el equipo de PCR en tiempo real para su lectura, eligiendo el programa del gen de la gB (ver apéndice). La curva estándar para la obtención del número de copias virales fue estandarizada previamente en el laboratorio de Neuroinmunología del INNN (ver apéndice). Al finalizar el programa de amplificación, el equipo reporta un número de ciclo umbral o *threshold cycle* (Ct) para cada reacción, el cual se interpoló en la curva estándar para obtener el número neto de copias de DNA viral presente en la muestra.

C. Cuantificación de proteínas totales

Se llevó a cabo la cuantificación de proteínas totales de la vacuna y de la suspensión de adenovirus (AV), por triplicado, utilizando el equipo Qubit 3.0; el cual se fundamenta en la espectrometría de fluorescencia. Se preparó la solución de trabajo agregando en un tubo eppendorf de 1.5 ml, 199 μ l de buffer de proteínas y 1 μ l de reactivo de proteínas (compuesto que emite fluorescencia al unirse a proteínas), por cada determinación. En un tubo de plástico liso de 500 μ l, se agregaron 199 μ l de la solución de trabajo y 1 μ l de la muestra, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se procedió a su lectura en el equipo, obteniendo la concentración de proteínas totales en μ g/ μ l.

6.4.2 Obtención y procesamiento de muestras

Las muestras de sangre periférica de los pacientes y controles se obtuvieron mediante punción venosa. Se extrajeron 4 ml en un tubo estéril con EDTA y 4 ml en un tubo sin anticoagulante, por individuo.

A. Separación y congelación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

La separación de CMSP se realizó a partir de las muestras recolectadas en los tubos estériles con EDTA, dentro de una cabina de flujo laminar. En un tubo de ensayo de 13x100 mm, se adicionaron 2 ml de ficol-histopaque y posteriormente se añadieron cuidadosamente los 4 ml de sangre. Se centrifugó a 2000 rpm durante 20 minutos a 25°C. Después de la centrifugación se obtuvieron 4 fases en el tubo, de inferior a superior: pastilla con el paquete eritrocitario, ficol, CMSP y plasma. En un tubo cónico de 15 ml, se agregó 1 ml de PBS pH 7.4 y se transfirieron a éste las CMSP, utilizando una micropipeta. Se centrifugó a 1800 rpm durante 5 minutos a 25°C, para lavar las células y se desechó el sobrenadante. Se lavaron por segunda vez las células y se resuspendieron en 2 ml de Recovery Cell Culture Freezing. La suspensión celular se transfirió a dos crioviales (1 ml/vial) y se almacenaron en nitrógeno líquido (-196°C).

B. Descongelación de CMSP

Por cada muestra se descongeló uno de los dos crioviales almacenados en nitrógeno líquido. En un tubo cónico de 15 ml se agregaron 8 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico (medio completo), previamente atemperado a 37°C. Se sacó el criovial del nitrógeno líquido y se transfirió a un baño de agua a 37°C hasta su descongelación (aproximadamente 2 minutos), posteriormente se transfirió su contenido en el tubo cónico con RPMI. Se mezclaron las células por pipeteo suave y se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 ml de RPMI fresco. Se sembraron 8 pozos por muestra, en una placa de 96 pozos con fondo en U; cada pozo con 125 µl de la suspensión celular.

La placa se incubó a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ durante 24 horas.

C. Conteo y evaluación de la viabilidad de las CMSP

Se cosecharon las células de los 8 pozos en un tubo cónico de 15 ml, se centrifugaron a 1800 rpm por 5 minutos a 25°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de RPMI suplementado con 10% de SFB. Se tomaron 10 µl de la suspensión celular y se colocaron en un vial de 600 µl. Se agregaron 40 µl de azul tripano 0.4% y se mezcló por pipeteo suave. Se cargó la cámara de Neubauer con 10 µl de la mezcla y se enfocó con el objetivo 10X en el microscopio óptico. Una vez enfocada la cuadrícula, se cambió al objetivo 40X y realizó el conteo celular en los 4 cuadrantes de los extremos (zona de glóbulos blancos). Se contaron por separado las células vivas y muertas (teñidas de azul) y se realizó el cálculo del número de células totales con la siguiente fórmula:

$$\text{Células/ml} = \frac{\text{total de células contadas} \times 5 \times 10,000}{4}$$

Se obtuvo el porcentaje de células muertas y se le restó al total de células contadas para obtener el número neto de células vivas.

D. Cultivo de CMSP

En una placa de 96 pozos con fondo en U, por cada muestra se sembraron 8 pozos con 60,000 células cada uno, en un volumen de 200 µl de medio completo.

Estimulación de linfocitos

Para cada muestra se tuvieron 4 condiciones de cultivo, por duplicado:

En el primer pozo no se agregó antígeno (control negativo), en el segundo se adicionó concanavalina A en una concentración de 10 µg/ml de medio de cultivo (control positivo), en el tercero se adicionaron 0.3 µl de la vacuna de varicela zoster, equivalentes a 1.32 µg de proteínas totales (problema) y en el cuarto pozo se añadió 1 µl de la suspensión de adenovirus, equivalente a 1.32 µg de proteínas totales (control de especificidad de antígeno). Al igual que varicela, adenovirus es

también un virus de DNA de doble cadena y posee una elevada prevalencia en México, según la Organización Mundial de la Salud. La placa se incubó a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂, durante 5 días. Al tercer día de incubación, se añadió a cada pozo BrdU en una concentración de 10 µM, el cual es un análogo de la timina, por lo que nos permitió identificar las subpoblaciones de linfocitos T que llevaron a cabo síntesis de DNA y, por lo tanto, proliferaron.

E. Evaluación de la proliferación de los linfocitos T

Transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales conjugados. Cuatro de los pozos fueron utilizados para el marcaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, con los anticuerpos anti CD8 PerCP-Cy5.5, anti CD4 PE, anti CD25 APC y anti BrdU FITC; mientras que los otros 4 se utilizaron para el marcaje de linfocitos T reguladores, con los anticuerpos anti CD4 PE, anti FoxP3 PerCP-Cy5.5, anti CD25 APC y anti BrdU FITC (ver apéndice). Las muestras se leyeron en el citómetro de flujo durante las primeras 2 horas después del marcaje. Se adquirieron 10,000 eventos dentro de una región de linfocitos definida por sus características de tamaño (Forward-scatter, FCS) y complejidad (Side-scatter, SSC) (Figura 3, región R1), tomando en cuenta su estado de activación (Bohmer, Bandala-Sanchez y Harrison, 2011), utilizando el programa Cell-Quest.

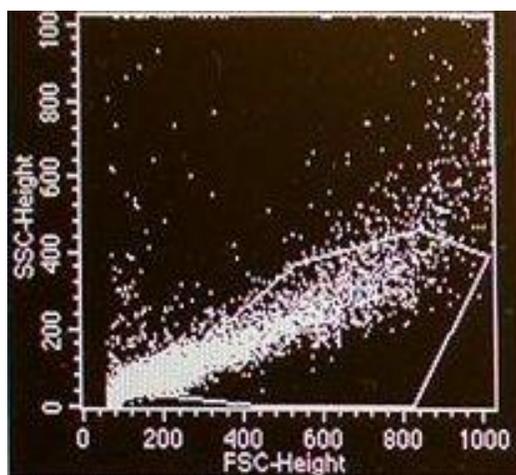
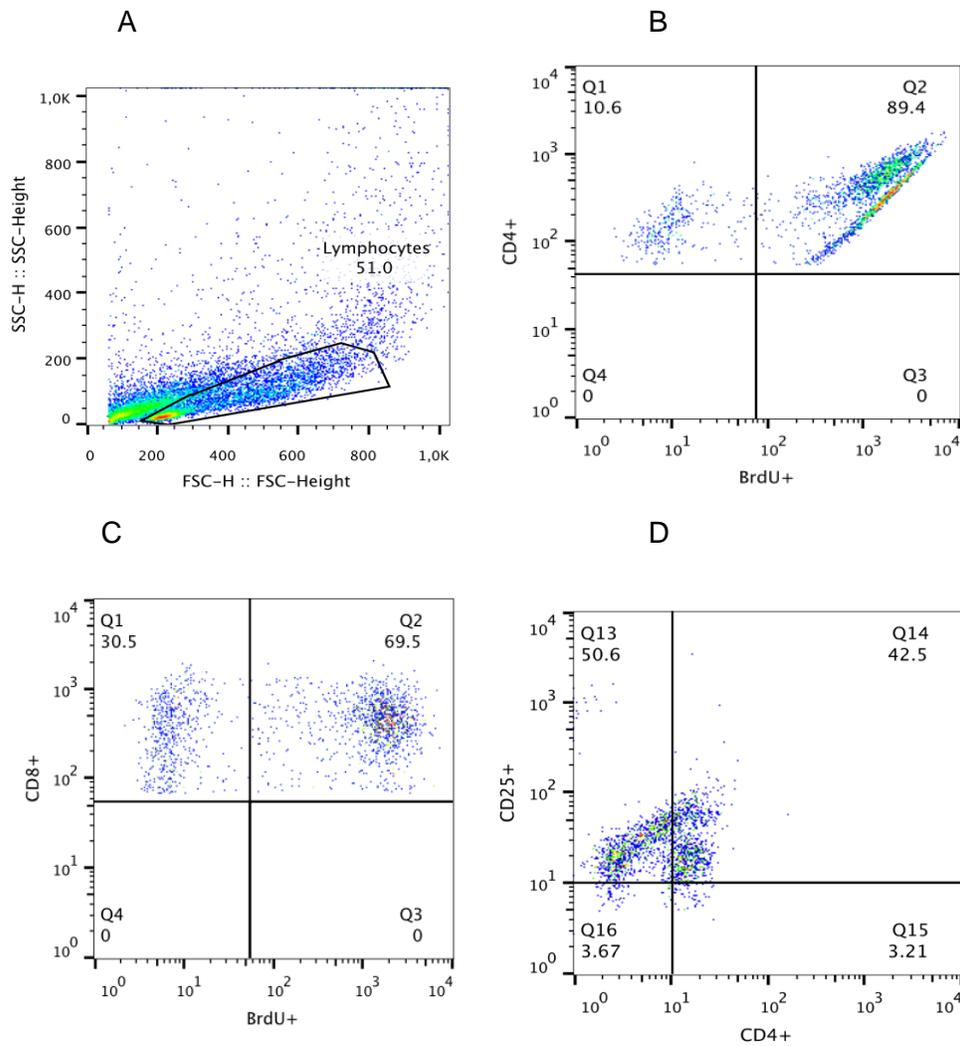


Figura 3. Selección de la región de linfocitos (R1) en el citómetro de flujo.

Los datos obtenidos en la citometría de flujo se analizaron con el software FlowJo vX.0.7. Se seleccionó la región de linfocitos y dentro de ésta se identificaron las subpoblaciones de linfocitos T proliferantes (figura 4A). Se consideró como linfocitos T CD4⁺ proliferantes, aquella población CD4⁺ BrdU⁺ (figura 4B); como linfocitos T CD8⁺ proliferantes a la población CD8⁺ BrdU⁺ (figura 4C); y como linfocitos T reguladores proliferantes a la población CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ BrdU⁺, en las muestras correspondientes al marcaje de linfocitos T reguladores (figura 4D y 4E).



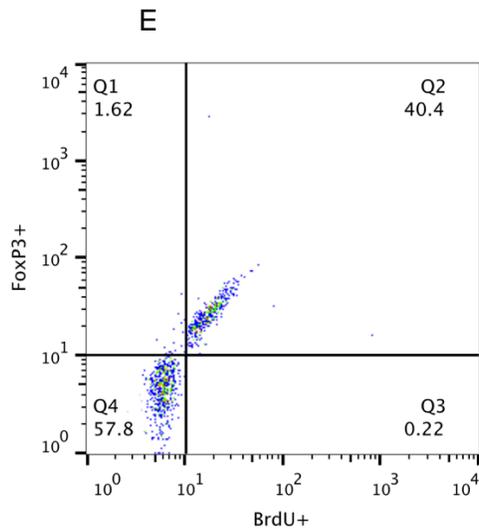


Figura 4. Identificación de subpoblaciones de linfocitos T proliferantes en el software FlowJo.

F. Cuantificación de citocinas

Después del período de incubación de los linfocitos T con los agentes virales, se centrifugaron los cultivos celulares y los sobrenadantes de los linfocitos sin estímulo y estimulados con VVZ se congelaron a -20°C durante dos semanas, hasta la determinación de citocinas. Una vez terminados los ensayos de proliferación, se descongelaron los sobrenadantes de los cultivos celulares y se cuantificaron las citocinas IL-2, IFN- γ , TNF, IL-17 e IL-10, utilizando el kit CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine de BD™, siguiendo las indicaciones del fabricante. Este método se basa en la captura de los analitos a cuantificar, con perlas de tamaño y fluorescencia conocidos, haciendo posible su detección por citometría de flujo. Las muestras se leyeron en el citómetro de flujo y los datos se analizaron en el software FlowJo, obteniendo las intensidades de fluorescencia (IF) tanto de la curva estándar proporcionada en el kit, como de las muestras problema. Los valores de IF de las muestras problema se interpolaron en la curva estándar para así obtener la concentración en pg/ml.

G. Determinación de anticuerpos IgG e IgM contra VVZ y VEB

Se determinaron los anticuerpos IgG e IgM contra varicela zoster en el suero de pacientes y controles, mediante los kits Varicella-Zoster virus IgG e IgM- ELISA de NovaLisa™. Para la determinación de anticuerpos IgG e IgM contra Epstein-Barr se utilizaron los kits Epstein-Barr Virus EBNA-1 IgG e IgM ELISA de IBL. En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante. Los cuatro kits permiten la determinación de anticuerpos mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la placa proporcionada por el kit tiene acoplado en cada pozo el antígeno ya sea de varicela zoster o de Epstein-Barr, si la muestra del individuo contiene el anticuerpo específico para el virus, éste se unirá al antígeno; por lo que podrá ser identificado mediante un anticuerpo secundario anti IgG o IgM humanos acoplado a peroxidasa, agregando el sustrato de esta enzima (TMB). Si la muestra problema no contiene anticuerpos contra el virus, la reacción enzimática no se llevará a cabo. La lectura se realiza mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 450 nm.

6.5 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Los valores de proliferación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y reguladores, se expresaron en porcentaje de proliferación; la cuantificación de citocinas se expresó en pg/ml; mientras que las determinaciones de anticuerpos IgG e IgM contra VVZ y VEB se expresaron como positivo o negativo.

6.5.1 Pruebas estadísticas

Ensayos de proliferación y cuantificación de citocinas

Se llevó a cabo la prueba de ANOVA de dos vías (*Two-Way ANOVA*). Las comparaciones múltiples se realizaron mediante las pruebas de Tukey y Sidak. El análisis de la varianza exige el cumplimiento de una serie de condiciones para poder ser aplicada: la variable ha de seguir una distribución normal en los grupos estudiados y las varianzas han de ser homogéneas entre los grupos. Este análisis realizó en el software GraphPad Prism versión 6.01.

7. RESULTADOS

7.1 Bases de datos de pacientes y controles

Se revisaron los expedientes clínicos de todos los pacientes incluidos en este estudio, los datos obtenidos se muestran en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los pacientes (n=20)

Edad, media en años	30
Género, cociente mujeres/hombres	12/8
Tiempo de evolución, media en años	1.5
Tiempo de evolución del brote, media en días	4.9
Media del EDSS ¹	3.4
Media del número de brotes por año	2.1

¹: *expanded disability status scale*

Tabla 2. Tratamiento médico de los pacientes (n=20)

Tratamiento actual	Número de pacientes
IFN- β	6
Teriflunomida	2
Azatioprina	2
Metotrexato	1
Acetato de Glatiramer	1
Sin tratamiento	8

Tabla 3. Lugar de nacimiento de los pacientes (n=20)

Estado	Número de pacientes
Ciudad de México	14
Edo. de México	1
Puebla	2
Morelos	1
Michoacán	1
Baja California	1

Después de la toma de muestra, se interrogó a los individuos control sobre su edad y lugar de nacimiento, estos datos se presentan en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Datos generales de los individuos control (n=28)	
Edad, media en años	27.36
Género, cociente mujeres/hombres	17/11

Tabla 5. Lugar de nacimiento de los individuos control (n=28)	
Estado	Número de individuos
Ciudad de México	12
Morelos	3
Edo. de México	5
Veracruz	3
Oaxaca	1
Tlaxcala	1
Guerrero	1
Chihuahua	1
Chiapas	1

Se buscó que el grupo control estuviera en el mismo rango de edad que los pacientes, tuvieran la misma nacionalidad y que, al igual que ellos, la mayoría fuera originario de la Ciudad de México. Todo esto con el fin de homogeneizar las poblaciones, siendo la esclerosis múltiple la única diferencia entre ellas.

7.2 Identificación y cuantificación de las subpoblaciones proliferantes de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y Tregs.

Se realizó el análisis de los valores obtenidos en el citómetro de flujo, utilizando el software FlowJo. De esta manera se obtuvieron los porcentajes de cada subpoblación de linfocitos T que presentaban la marca de BrdU y, por lo tanto, proliferaron, bajo las cuatro condiciones de cultivo: sin antígeno, con concanavalina A, con VVZ y con AV. Se determinó la media de estas poblaciones y los datos fueron recopilados en la tabla 6.

Tabla 6. Promedios de los porcentajes de proliferación de las subpoblaciones de linfocitos T de los grupos de estudio, bajo cuatro diferentes condiciones de cultivo.

	% CD4⁺	% CD8⁺	% T reg
Control negativo			
Controles	2.65	3.46	4.82
Brote	16.22	18.86	13.46
Remisión	16.85	22.15	23.8
Control positivo			
Controles	63.02	61.16	44.94
Brote	68.45	67.7	40.16
Remisión	65.12	62.08	51.72
VVZ			
Controles	5.208	7.085	6.88
Brote	30.55	34.65	22.09
Remisión	20.87	26.78	27.28
AV			
Controles	4.02	5.55	5.26
Brote	17.66	22.87	16.34
Remisión	18.75	23.05	23.68

7.3 Comparación de la proliferación de las subpoblaciones de linfocitos T antes y después de ser estimuladas con VVZ, entre los grupos de estudio.

Se llevó a cabo la prueba *Two-Way* ANOVA, utilizando la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Se comparó la media del porcentaje de proliferación entre cada tipo de estímulo (sin estímulo, con VVZ y con AV) y entre los grupos de estudio (controles, pacientes en brote y pacientes en remisión), para cada subpoblación de linfocitos T. La respuesta de las subpoblaciones linfocitarias ante la estimulación con Concanavalina A no fue incluida en el análisis estadístico, sólo se verificó para comprobar la capacidad proliferativa de los linfocitos T. Se utilizó un intervalo de confianza de 95%, el cual indica que existe un 95% de probabilidad de que la media obtenida en la muestra contiene la media de toda la población. Una vez desarrollada la prueba, el reporte muestra la diferencia entre las medias de los grupos comparados (*Mean Diff.*), el intervalo de confianza de la diferencia entre estas medias (*95% CI of diff*), la significancia estadística (*Significant?*) y el resultado final o *Summary*.

Tabla 7. Prueba de Tukey para la subpoblación de linfocitos T CD4⁺, comparación entre grupos de estudio.

<i>Number of comparisons per family</i>	3			
<i>Alpha</i>	0.05			
<i>Tukey's multiple comparisons test</i>	<i>Mean Diff.</i>	<i>95% CI of diff.</i>	<i>Significant?</i>	<i>Summary</i>
<i>Control negativo</i>				
<i>Controles vs. Brote</i>	-13.57	-23.22 to -3.919	Yes	**
<i>Controles vs. Remisión</i>	-14.19	-25.09 to -3.298	Yes	**
<i>Brote vs. Remisión</i>	-0.6253	-11.94 to 10.69	No	ns
<i>VVZ</i>				
<i>Controles vs. Brote</i>	-25.35	-34.99 to -15.70	Yes	****
<i>Controles vs. Remisión</i>	-15.66	-26.56 to -4.767	Yes	**
<i>Brote vs. Remisión</i>	9.684	-1.629 to 21.00	No	ns
<i>Adenovirus</i>				
<i>Controles vs. Brote</i>	-13.64	-23.28 to -3.987	Yes	**
<i>Controles vs. Remisión</i>	-14.73	-25.62 to -3.834	Yes	**
<i>Brote vs. Remisión</i>	-1.093	-12.41 to 10.22	No	ns

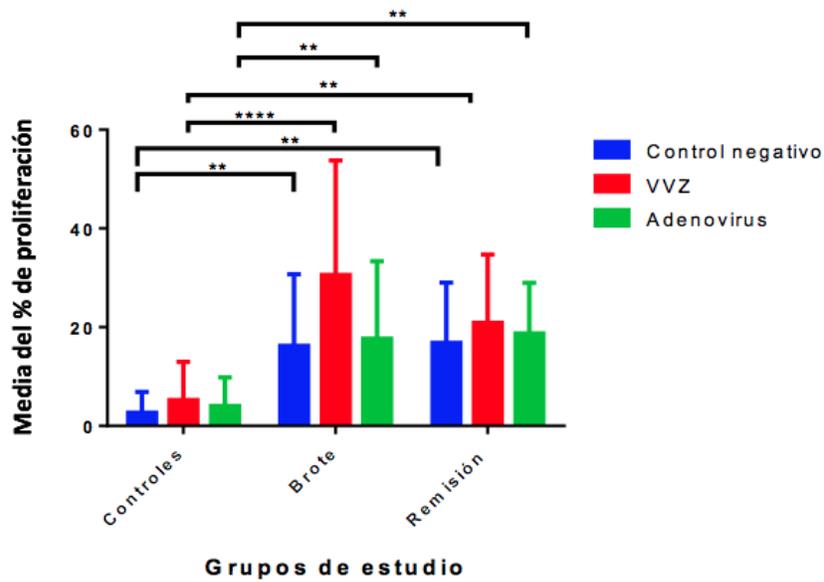


Figura 5. Comparación de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ entre los grupos de estudio.

Tabla 8. Prueba de Tukey para la subpoblación de linfocitos T CD4⁺, comparación entre los estímulos.

Number of comparisons per family 3
Alpha 0.05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
<i>Controles</i>				
Control negativo vs. VVZ	-2.555	-11.71 to 6.598	No	ns
Control negativo vs. Adenovirus	-1.368	-10.52 to 7.786	No	ns
VVZ vs. Adenovirus	1.188	-7.966 to 10.34	No	ns
<i>Brote</i>				
Control negativo vs. VVZ	-14.33	-24.45 to -4.214	Yes	**
Control negativo vs. Adenovirus	-1.436	-11.56 to 8.684	No	ns
VVZ vs. Adenovirus	12.9	2.779 to 23.02	Yes	**
<i>Remisión</i>				
Control negativo vs. VVZ	-4.024	-16.42 to 8.370	No	ns
Control negativo vs. Adenovirus	-1.903	-14.30 to 10.49	No	ns
VVZ vs. Adenovirus	2.121	-10.27 to 14.51	No	ns

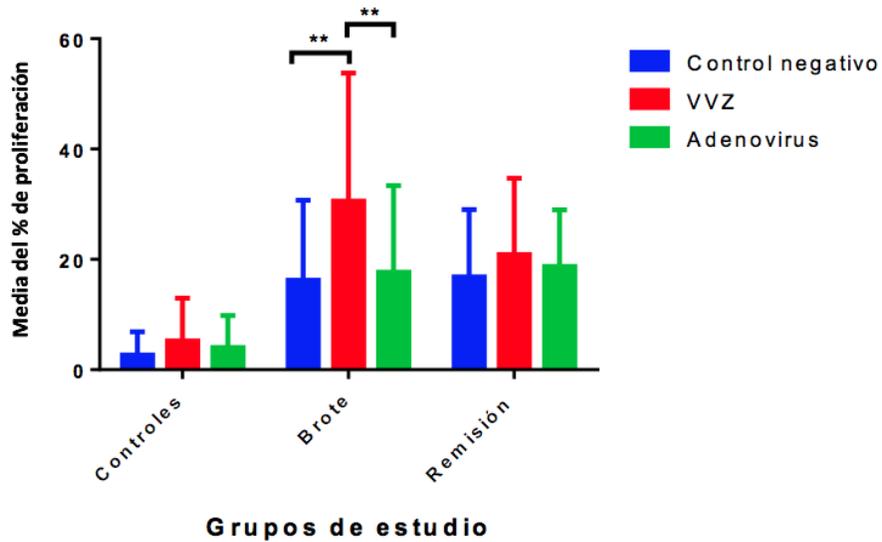


Figura 6. Comparación de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ entre los diferentes estímulos.

El análisis de resultados de los linfocitos T CD4⁺, mostró una proliferación significativamente menor en el grupo control respecto al grupo de pacientes en brote y al grupo de pacientes en remisión, para las tres condiciones de cultivo. No se observó diferencia significativa entre los pacientes en brote y en remisión. Dentro del grupo de pacientes en brote, se observó una diferencia significativa entre la proliferación de los linfocitos del control negativo y los estimulados con VVZ. Además, éstos últimos tuvieron una mayor proliferación que los linfocitos estimulados con AV.

Tabla 9. Prueba de Tukey para la subpoblación de linfocitos T CD8⁺, comparación de los grupos de estudio.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
<i>Control negativo</i>				
Controles vs. Brote	-15.4	-26.37 to -4.426	Yes	**
Controles vs. Remisión	-18.69	-31.08 to -6.299	Yes	**
Brote vs. Remisión	-3.29	-16.15 to 9.575	No	ns
<i>VVZ</i>				
Controles vs. Brote	-27.57	-38.54 to -16.59	Yes	****
Controles vs. Remisión	-19.7	-32.09 to -7.312	Yes	***
Brote vs. Remisión	7.866	-4.998 to 20.73	No	ns
<i>AV</i>				
Controles vs. Brote	-17.32	-28.29 to -6.348	Yes	***
Controles vs. Remisión	-17.5	-29.89 to -5.113	Yes	**
Brote vs. Remisión	-0.1828	-13.05 to 12.68	No	ns

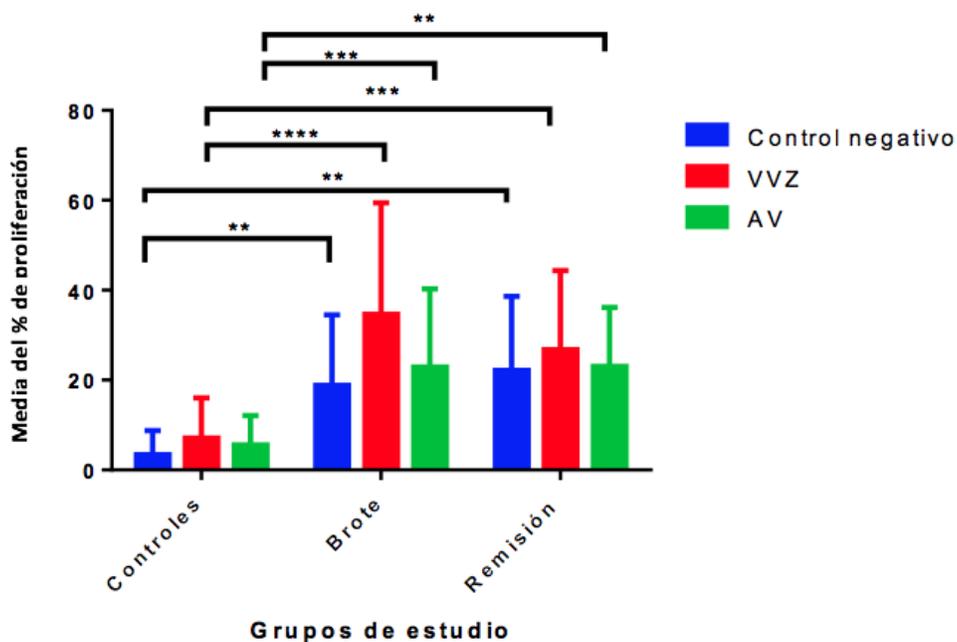


Figura 7. Comparación de la proliferación de linfocitos T CD8⁺ entre los grupos de estudio.

Tabla 10. Prueba de Tukey para la subpoblación de linfocitos T CD8⁺, comparación entre los estímulos.

<i>Number of comparisons per family</i>	3			
<i>Alpha</i>	0.05			
<i>Tukey's multiple comparisons test</i>	<i>Mean Diff.</i>	<i>95% CI of diff.</i>	<i>Significant?</i>	<i>Summary</i>
<i>Controles</i>				
<i>Control negativo vs. VVZ</i>	-3.625	-14.03 to 6.783	No	ns
<i>Control negativo vs. AV</i>	-2.089	-12.50 to 8.319	No	ns
<i>VVZ vs. AV</i>	1.536	-8.872 to 11.94	No	ns
<i>Brote</i>				
<i>Control negativo vs. VVZ</i>	-15.79	-27.30 to -4.287	Yes	**
<i>Control negativo vs. AV</i>	-4.011	-15.52 to 7.496	No	ns
<i>VVZ vs. AV</i>	11.78	0.2768 to 23.29	Yes	*
<i>Remisión</i>				
<i>Control negativo vs. VVZ</i>	-4.638	-18.73 to 9.455	No	ns
<i>Control negativo vs. AV</i>	-0.9033	-15.00 to 13.19	No	ns
<i>VVZ vs. AV</i>	3.734	-10.36 to 17.83	No	ns

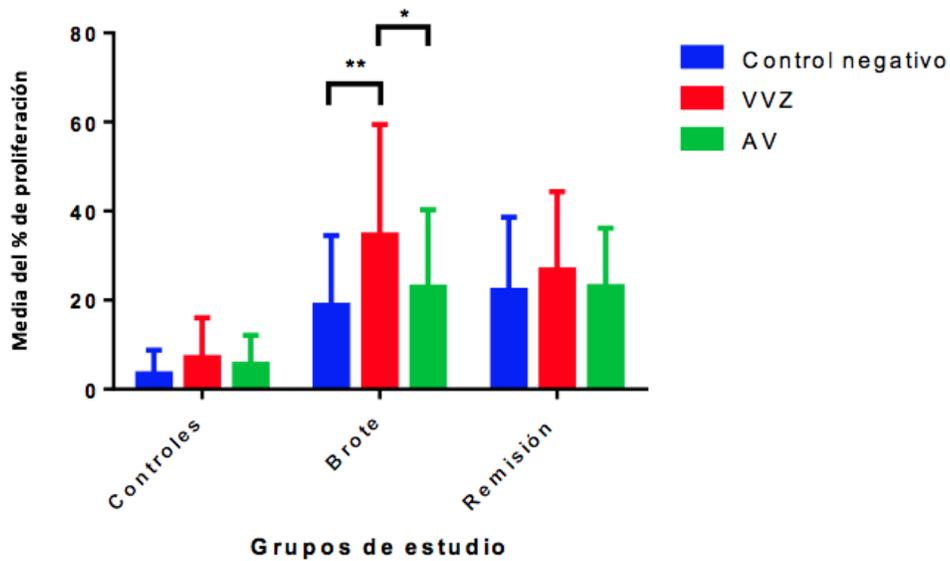


Figura 8. Comparación de la proliferación de linfocitos T CD8⁺ entre los diferentes estímulos.

Los linfocitos T CD8⁺ presentaron un comportamiento similar al de los T CD4⁺, tanto entre los grupos de estudio, como dentro de éstos; ya que se observó una proliferación significativamente menor en los linfocitos del grupo control, respecto a los pacientes, en cada una de las condiciones de cultivo, además de un mayor porcentaje de proliferación en los linfocitos de pacientes en brote estimulados con VVZ, respecto a los controles negativos y los estimulados con AV.

Tabla 11. Prueba de Tukey para la subpoblación de linfocitos Treg, comparación de los grupos de estudio.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
<i>Control negativo</i>				
Controles vs. Brote	-8.632	-18.65 to 1.386	No	ns
Controles vs. Remisión	-18.98	-30.29 to -7.666	Yes	***
Brote vs. Remisión	-10.35	-22.09 to 1.401	No	ns
<i>VVZ</i>				
Controles vs. Brote	-15.21	-25.23 to -5.192	Yes	**
Controles vs. Remisión	-20.39	-31.70 to -9.080	Yes	***
Brote vs. Remisión	-5.182	-16.93 to 6.566	No	ns
<i>AV</i>				
Controles vs. Brote	-11.09	-21.10 to -1.067	Yes	*
Controles vs. Remisión	-18.42	-29.73 to -7.110	Yes	***
Brote vs. Remisión	-7.337	-19.08 to 4.411	No	ns

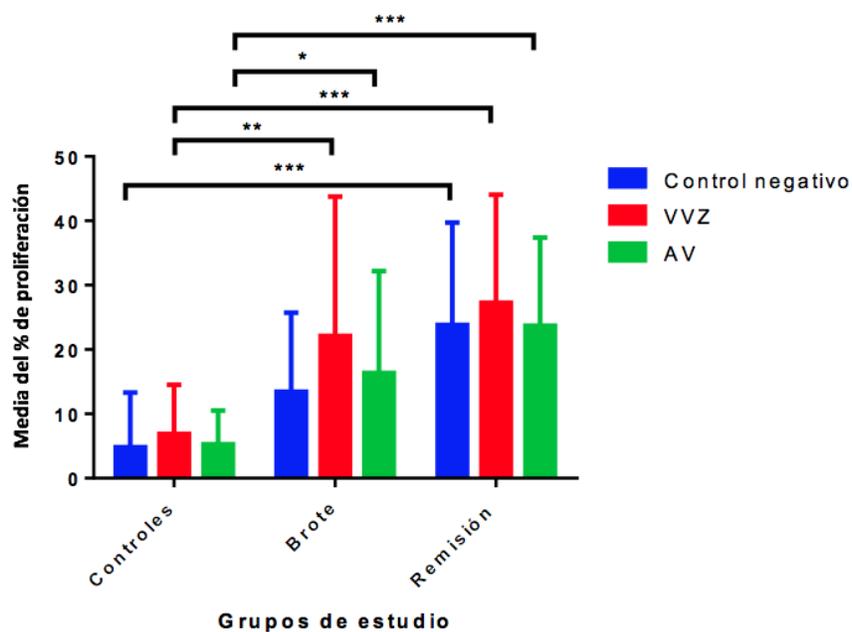


Figura 9. Comparación de la proliferación de linfocitos Treg entre los grupos de estudio.

Tabla 12. Prueba de Tukey para la subpoblación de linfocitos Treg, comparación entre los estímulos.

<i>Number of comparisons per family</i>	3			
<i>Alpha</i>	0.05			
<i>Tukey's multiple comparisons test</i>	<i>Mean Diff.</i>	<i>95% CI of diff.</i>	<i>Significant?</i>	<i>Summary</i>
<i>Controles</i>				
<i>Control negativo vs. VVZ</i>	-2.059	-11.56 to 7.445	No	ns
<i>Control negativo vs. AV</i>	-0.4332	-9.938 to 9.071	No	ns
<i>VVZ vs. AV</i>	1.626	-7.879 to 11.13	No	ns
<i>Brote</i>				
<i>Control negativo vs. VVZ</i>	-8.637	-19.14 to 1.870	No	ns
<i>Control negativo vs. AV</i>	-2.886	-13.39 to 7.621	No	ns
<i>VVZ vs. AV</i>	5.751	-4.756 to 16.26	No	ns
<i>Remisión</i>				
<i>Control negativo vs. VVZ</i>	-3.473	-16.34 to 9.397	No	ns
<i>Control negativo vs. AV</i>	0.1233	-12.75 to 12.99	No	ns
<i>VVZ vs. AV</i>	3.596	-9.273 to 16.46	No	ns

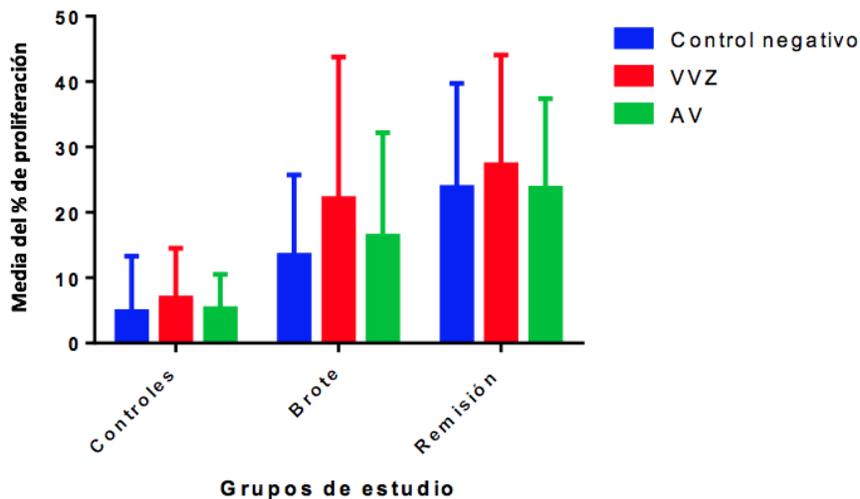


Figura 10. Comparación de la proliferación de linfocitos T reg entre los diferentes estímulos.

No se observó diferencia significativa entre la respuesta de los linfocitos T reg de los pacientes en brote y en remisión; bajo ningún estímulo. Sin embargo, al compararlos con el grupo control, se observó una menor proliferación en éste. Ninguno de los grupos de estudio respondió de manera diferente ante la estimulación con los antígenos virales.

7.4 Cuantificación de citocinas secretadas por los linfocitos T CD4+, CD8+ y Tregs activados.

Se cuantificaron las citocinas en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos T sin estimulación y estimulados con VVZ, mediante citometría de flujo. Los valores obtenidos en pg/ml a partir de la interpolación en la curva estándar, se analizaron con la prueba *Two-Way* ANOVA. Para la comparación entre los grupos de estudio se aplicó la prueba de Tukey, para la comparación entre cada condición de cultivo por grupo de estudio, se utilizó la prueba de Sidak.

Tabla 13. Prueba de Tukey para el análisis de la IL-2, comparación de los grupos de estudio.

<i>Number of comparisons per family</i>	3			
<i>Alpha</i>	0.05			
<i>Tukey's multiple comparisons test</i>	<i>Mean Diff.</i>	<i>95% CI of diff.</i>	<i>Significant?</i>	<i>Summary</i>
<i>Control negativo</i>				
<i>Controles vs. Brote</i>	-0.000202	-0.1535 to 0.1531	No	ns
<i>Controles vs. Remisión</i>	0.02341	-0.1497 to 0.1966	No	ns
<i>Brote vs. Remisión</i>	0.02361	-0.1562 to 0.2034	No	ns
<i>VVZ</i>				
<i>Controles vs. Brote</i>	-0.1531	-0.3065 to 0.0002131	No	ns
<i>Controles vs. Remisión</i>	-0.01841	-0.1916 to 0.1547	No	ns
<i>Brote vs. Remisión</i>	0.1347	-0.04509 to 0.3145	No	ns

Tabla 14. Prueba de Sidak para el análisis de la IL-2, comparación con y sin estímulo.

<i>Number of comparisons per family</i>	3			
<i>Alpha</i>	0.05			
<i>Sidak's multiple comparisons test</i>	<i>Mean Diff.</i>	<i>95% CI of diff.</i>	<i>Significant?</i>	<i>Summary</i>
<i>Control negativo - VVZ</i>				
<i>Controles</i>	0.001818	-0.1467 to 0.1503	No	ns
<i>Brote</i>	-0.1511	-0.3153 to 0.01306	No	ns
<i>Remisión</i>	-0.04	-0.2411 to 0.1611	No	ns

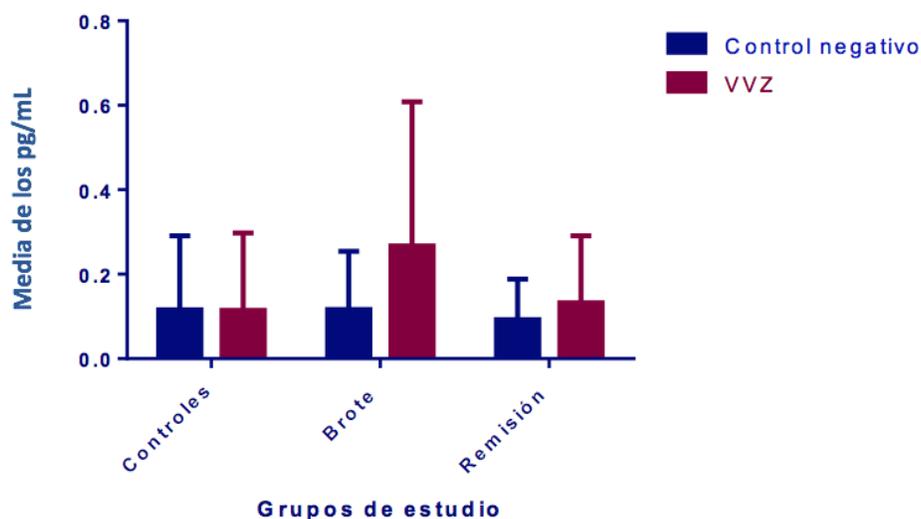


Figura 11. Comparación de la concentración de IL-2 secretada por los linfocitos T, con y sin estímulo, entre los tres grupos de estudio.

La concentración de IL-2 en los cultivos de linfocitos T de los tres grupos de estudio no mostraron diferencia significativa. Sin embargo, se puede observar un incremento de su secreción en los linfocitos T de pacientes en brote, estimulados con VVZ.

Tabla 15. Prueba de Tukey para el análisis del IFN- γ , comparación de los grupos de estudio.

<i>Number of comparisons per family</i>	3			
<i>Alpha</i>	0.05			
<i>Tukey's multiple comparisons test</i>	<i>Mean Diff.</i>	<i>95% CI of diff.</i>	<i>Significant?</i>	<i>Summary</i>
<i>Control negativo</i>				
<i>Controles vs. Brote</i>	0.02677	-0.1593 to 0.2128	No	ns
<i>Controles vs. Remisión</i>	0.05538	-0.1547 to 0.2654	No	ns
<i>Brote vs. Remisión</i>	0.02861	-0.1895 to 0.2468	No	ns
<i>VVZ</i>				
<i>Controles vs. Brote</i>	0.208	0.02200 to 0.3941	Yes	*
<i>Controles vs. Remisión</i>	0.1422	-0.06786 to 0.3523	No	ns
<i>Brote vs. Remisión</i>	-0.06583	-0.2840 to 0.1523	No	ns

Tabla 16. Prueba de Sidak para el análisis del IFN- γ , comparación con y sin estímulo.

<i>Number of comparisons per family</i>	3			
<i>Alpha</i>	0.05			
<i>Sidak's multiple comparisons test</i>	<i>Mean Diff.</i>	<i>95% CI of diff.</i>	<i>Significant?</i>	<i>Summary</i>
<i>Control negativo - VVZ</i>				
<i>Controles</i>	-0.1568	-0.3370 to 0.02333	No	ns
<i>Brote</i>	0.02444	-0.1747 to 0.2236	No	ns
<i>Remisión</i>	-0.07	-0.3139 to 0.1739	No	ns

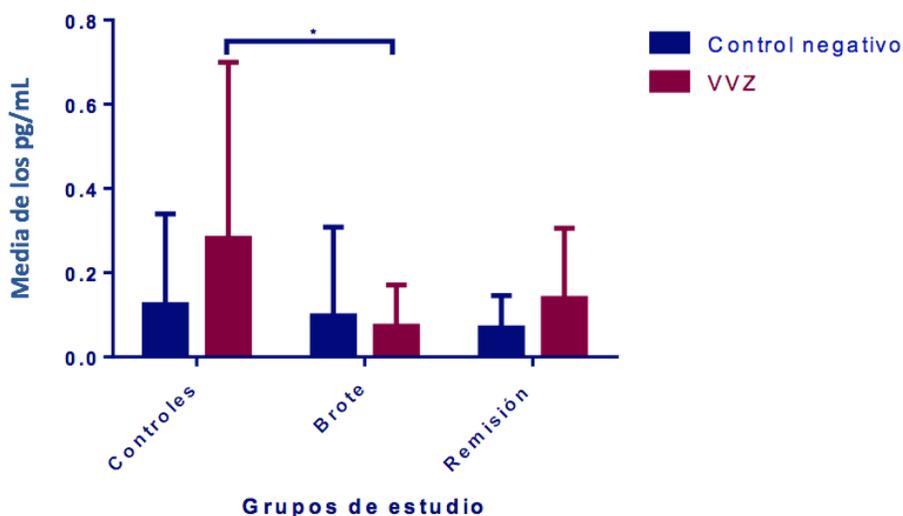


Figura 12. Comparación de la concentración de IFN- γ secretada por los linfocitos T, con y sin estímulo, entre los grupos de estudio.

El grupo control produjo una mayor concentración de IFN- γ después del estímulo con VVZ, respecto a los pacientes en brote. Ninguno de los grupos de estudio aumentó la producción de esta citocina ante el estímulo con VVZ.

Tabla 17. Prueba de Tukey para el análisis del TNF, comparación de los grupos de estudio.

<i>Number of comparisons per family</i>	3			
<i>Alpha</i>	0.05			
<i>Tukey's multiple comparisons test</i>	<i>Mean Diff.</i>	<i>95% CI of diff.</i>	<i>Significant?</i>	<i>Summary</i>
<i>Control negativo</i>				
<i>Controles vs. Brote</i>	0.08778	-0.09845 to 0.2740	No	ns
<i>Controles vs. Remisión</i>	0.085	-0.1253 to 0.2953	No	ns
<i>Brote vs. Remisión</i>	-0.002778	-0.2212 to 0.2156	No	ns
<i>VVZ</i>				
<i>Controles vs. Brote</i>	0.1307	-0.05552 to 0.3169	No	ns
<i>Controles vs. Remisión</i>	0.09848	-0.1118 to 0.3088	No	ns
<i>Brote vs. Remisión</i>	-0.03222	-0.2506 to 0.1862	No	ns

Tabla 18. Prueba de Sidak para el análisis del TNF, comparación con y sin estímulo.

Number of comparisons per family 3
Alpha 0.05

Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
<i>Control negativo - VVZ</i>				
Controles	-0.03682	-0.2172 to 0.1435	No	ns
Brote	0.006111	-0.1933 to 0.2055	No	ns
Remisión	-0.02333	-0.2675 to 0.2208	No	ns

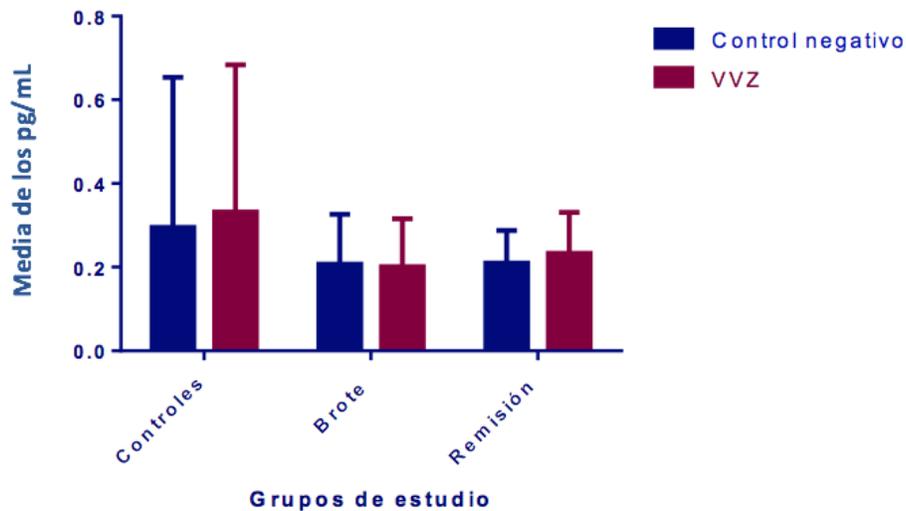


Figura 13. Comparación de la concentración de TNF secretada por los linfocitos T, con y sin estímulo, entre los grupos de estudio.

La concentración de TNF en los cultivos de linfocitos T de los tres grupos de estudio no mostraron diferencia significativa, aún después del estímulo con varicela zoster.

Tabla 19. Prueba de Tukey para el análisis de la IL-17A, comparación de los grupos de estudio.

<i>Number of comparisons per family</i>	3			
<i>Alpha</i>	0.05			
<i>Tukey's multiple comparisons test</i>	<i>Mean Diff.</i>	<i>95% CI of diff.</i>	<i>Significant?</i>	<i>Summary</i>
<i>Control negativo</i>				
<i>Controles vs. Brote</i>	0.2466	0.05594 to 0.4373	Yes	**
<i>Controles vs. Remisión</i>	0.2386	0.02325 to 0.4539	Yes	*
<i>Brote vs. Remisión</i>	-0.008056	-0.2316 to 0.2155	No	ns
<i>VVZ</i>				
<i>Controles vs. Brote</i>	0.4887	0.2980 to 0.6794	Yes	****
<i>Controles vs. Remisión</i>	0.4701	0.2548 to 0.6854	Yes	****
<i>Brote vs. Remisión</i>	-0.01861	-0.2422 to 0.2050	No	ns

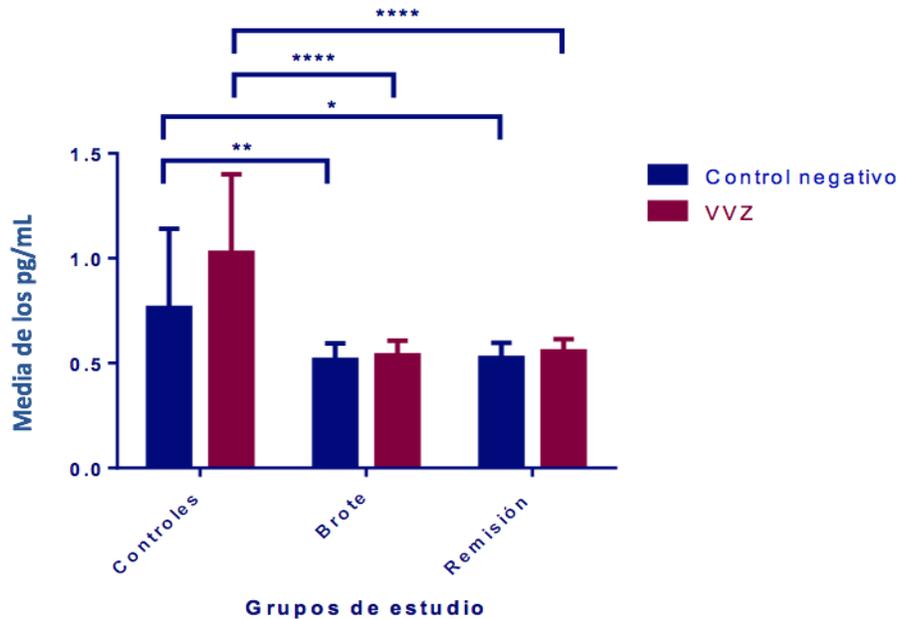


Figura 14. Comparación de la concentración de la IL-17A secretada por los linfocitos T, entre los grupos de estudio.

Tabla 20. Prueba de Sidak para el análisis de la IL-17A, comparación con y sin estímulo.

<i>Number of comparisons per family</i>	3			
<i>Alpha</i>	0.05			
<i>Sidak's multiple comparisons test</i>	<i>Mean Diff.</i>	<i>95% CI of diff.</i>	<i>Significant?</i>	<i>Summary</i>
<i>Control negativo - VVZ</i>				
<i>Controles</i>	-0.2632	-0.4478 to -0.07853	Yes	**
<i>Brote</i>	-0.02111	-0.2252 to 0.1830	No	ns
<i>Remisión</i>	-0.03167	-0.2817 to 0.2183	No	ns

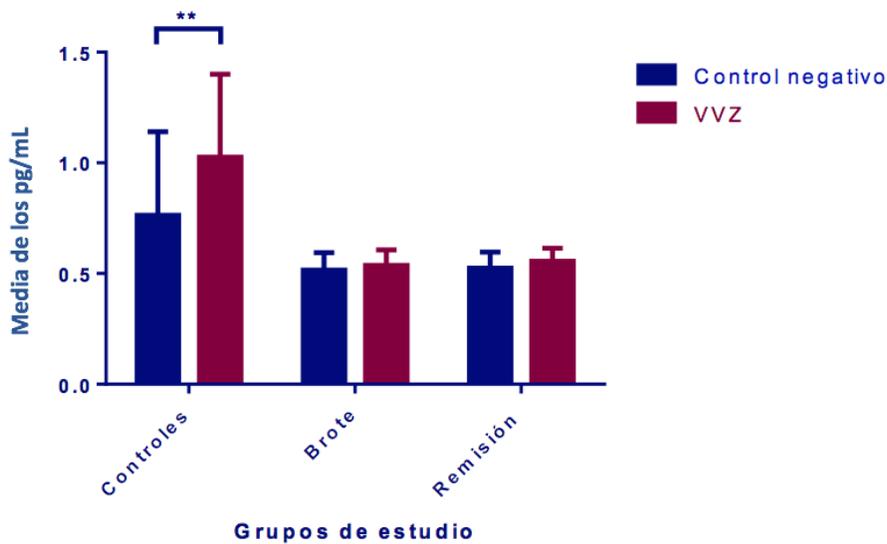


Figura 15. Comparación de la concentración de la IL-17A secretada por los linfocitos T, con y sin estímulo.

La concentración de IL-17A fue mayor en los cultivos de linfocitos T de los individuos sanos, con respecto a ambos grupos de pacientes, especialmente tras ser estimulados con VVZ. El grupo control fue el único que mostró diferencia significativa entre la secreción de IL-17A antes y después del estímulo.

Tabla 21. Prueba de Tukey para el análisis de la IL-10, comparación de los grupos de estudio.

<i>Number of comparisons per family</i>	3			
<i>Alpha</i>	0.05			
<i>Tukey's multiple comparisons test</i>	<i>Mean Diff.</i>	<i>95% CI of diff.</i>	<i>Significant?</i>	<i>Summary</i>
<i>Control negativo</i>				
<i>Controles vs. Brote</i>	0.3366	0.1547 to 0.5184	Yes	****
<i>Controles vs. Remisión</i>	0.1705	-0.03490 to 0.3758	No	ns
<i>Brote vs. Remisión</i>	-0.1661	-0.3794 to 0.04715	No	ns
<i>VVZ</i>				
<i>Controles vs. Brote</i>	0.3631	0.1813 to 0.5450	Yes	****
<i>Controles vs. Remisión</i>	0.2242	0.01889 to 0.4296	Yes	*
<i>Brote vs. Remisión</i>	-0.1389	-0.3521 to 0.07437	No	ns

Tabla 22. Prueba de Sidak para el análisis de la IL-10, comparación con y sin estímulo.

<i>Number of comparisons per family</i>	3			
<i>Alpha</i>	0.05			
<i>Sidak's multiple comparisons test</i>	<i>Mean Diff.</i>	<i>95% CI of diff.</i>	<i>Significant?</i>	<i>Summary</i>
<i>Control negativo - VVZ</i>				
<i>Controles</i>	-0.02045	-0.1966 to 0.1557	No	ns
<i>Brote</i>	0.006111	-0.1886 to 0.2008	No	ns
<i>Remisión</i>	0.03333	-0.2051 to 0.2718	No	ns

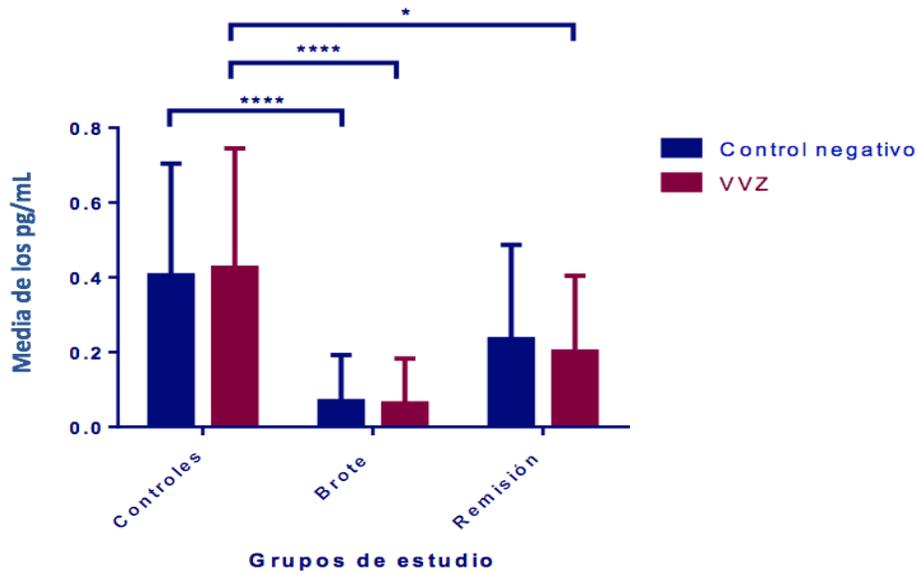


Figura 16. Comparación de la concentración de IL-10 secretada por los linfocitos T, con y sin estímulo, entre los grupos de estudio.

En la figura 16 se puede destacar la baja concentración de IL-10 en los pacientes en fase de brote. Aunque en el grupo control se produjo una mayor cantidad de esta citocina, en comparación con los pacientes, no mostraron diferencia significativa antes y después del estímulo.

7.5 Determinación de anticuerpos IgG e IgM específicos contra VVZ y VEB en el suero de pacientes y controles.

Los resultados de las determinaciones de anticuerpos IgG e IgM contra VVZ y VEB se analizaron como porcentajes de positividad o negatividad, para así poder comparar cada grupo de estudio.

Tabla 23. Determinación de anticuerpos IgG e IgM contra VVZ.

	IgG pos No. (%)	IgG neg No. (%)	IgM pos No. (%)	IgM neg No. (%)
Controles (n=28)	26 (92.86)	2 (7.14)	2 (7.14)	26/92.86
Pacientes en brote (n=18)	18 (100)	0 (0)	1 (5.56)	17 (94.44)
Pacientes en remisión (n=12)	12 (100)	0 (0)	12 (100)	0 (0)

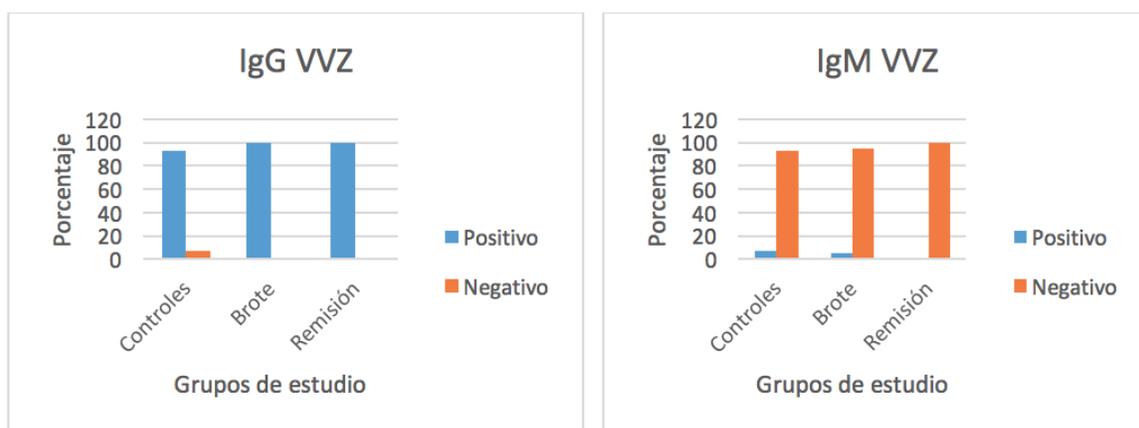


Figura 17. Comparación de la presencia de anticuerpos IgG e IgM contra VVZ entre los grupos de estudio.

Tabla 24. Determinación de anticuerpos IgG e IgM contra VEB.

	IgG pos No. (%)	IgG neg No. (%)	IgM pos No. (%)	IgM neg No. (%)
Controles (n=28)	23 (82.14)	5 (17.86)	1 (3.57)	27 (96.43)
Pacientes en brote (n=18)	17 (94.44)	1 (5.56)	0 (0)	18 (100)
Pacientes en remisión (n=12)	12 (100)	0 (0)	12 (100)	0 (0)

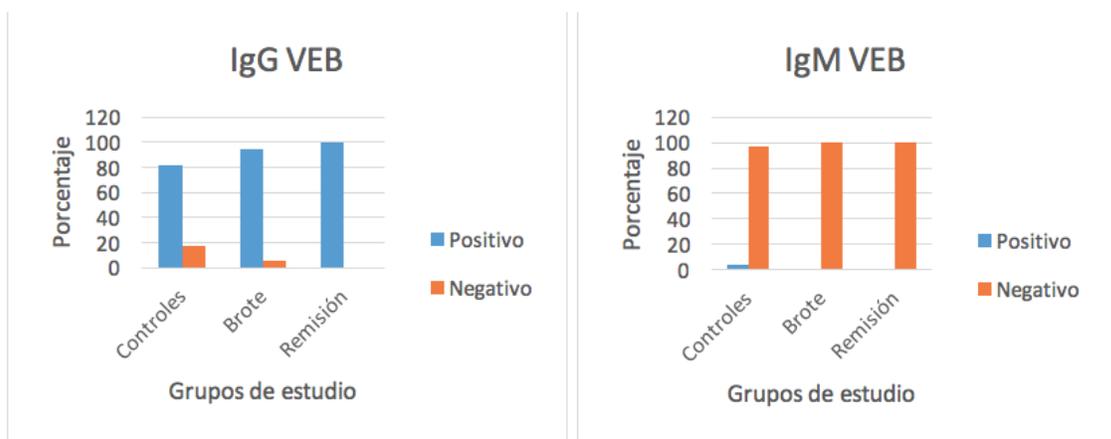


Figura 18. Comparación de la presencia de anticuerpos IgG e IgM contra VEB entre los grupos de estudio.

Los resultados de las pruebas de ELISA para la determinación de anticuerpos IgG e IgM contra VVZ y VEB muestran que, en los tres grupos de estudio, la mayoría de los individuos fueron positivos a IgG y negativos a IgM para ambos virus.

8. DISCUSIÓN

8.1 Proliferación de las subpoblaciones de linfocitos T estimulados con VVZ

En el cultivo de CMSP, los monocitos y los linfocitos B presentan los antígenos virales a los linfocitos T específicos para cada antígeno y, aunque son menos eficientes que las células dendríticas que los presentan *in vivo*, es posible obtener una respuesta, que en un individuo sano debe ser mínima (Hayward, 2001).

Si comparamos la respuesta de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ del grupo control, ya sea sin estímulo, con VVZ o con AV, con la de los pacientes en brote y en remisión, se observa diferencia significativa para todas las condiciones de cultivo (figuras 5, 7 y 9). Esto nos indica que los linfocitos T de los pacientes se encuentran en un estado susceptible a la activación, sin importar el tipo de estímulo existe una mayor activación que en un sujeto sano. En un estudio realizado por Fransson y col., en donde estimulan CMSP de pacientes con EMRR en brote y en remisión con antígenos de mielina, encuentran que los linfocitos T expresan niveles significativamente más altos ($p < 0.001$) del marcador de activación CD28, que los controles sanos, independientemente de si el paciente estaba en remisión clínica, brote o en tratamiento (Fransson, Liljenfeldt, Fagius, Totterman y Loskog, 2009). Respecto a los linfocitos T reg, en la figura 9 se puede observar que la diferencia del porcentaje de proliferación entre los grupos de estudio tiene menor significancia que la que se presenta en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, incluso desaparece en el cultivo sin estímulo entre el grupo control y el grupo de pacientes en brote. Actualmente se sabe que, si bien la cifra de células T reguladoras se mantiene en un rango normal en los pacientes con EM, su función se encuentra alterada (Zozulya y Wiendl, 2008).

Aunque en el presente trabajo la respuesta proliferativa de los linfocitos T en general fue mayor en los pacientes con EMRR, esta diferencia fue mayor entre el grupo control y los pacientes en brote que entre el grupo control y los pacientes en remisión; sobre todo en el caso del estímulo con el VVZ. Además, no se obtuvo diferencia significativa entre la fase de exacerbación y de remisión. Por lo que

ahora comparamos la respuesta de cada grupo de estudio ante cada estímulo, con el fin de conocer si en los pacientes existía predilección hacia el VVZ, o respondían de igual manera ante otro antígeno no relacionado (adenovirus); y si el resultado era el mismo en la fase de brote y en remisión.

La respuesta de los linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y T reg en el grupo control, ante la estimulación con VVZ y AV no mostró diferencia significativa respecto al control sin estímulo (figuras 6,8 y 10). La respuesta inmune de memoria que continúa después de la infección primaria por varicela zoster, se caracteriza por la persistencia de anticuerpos IgG y, en la mayoría de los casos, IgA contra este virus; así como de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ de memoria. Se ha estimado que la frecuencia total de células T de memoria específicas para VVZ con capacidad proliferativa es de 1:40,000 CMSP (Asanuma, Sharp, Maecker, Maino y Arvin, 2000). Considerando estas cifras y el hecho de que se estimularon 60,000 células con cada virus, la falta de respuesta proliferativa de los linfocitos T de individuos control, coincide con el resultado esperado.

Un resultado diferente se obtuvo en los pacientes de EM en fase de exacerbación, en las figuras 6 y 8 podemos observar que sólo las células T CD4⁺ y T CD8⁺ de estos pacientes tuvieron una proliferación significativamente mayor ante la estimulación con VVZ, respecto a adenovirus. Para que se produzca esta mayor respuesta debe haber un mayor número de linfocitos T de memoria en circulación al momento en el que se tomó la muestra, por lo que estos resultados indican un contacto relativamente reciente con el virus. A pesar de que no hubo diferencia significativa de la respuesta al VVZ entre la fase de brote y de remisión, se debe tomar en cuenta que la n de los pacientes en remisión fue menor y si se amplía tal vez sería posible observar esta diferencia. Por lo anterior, se puede considerar la participación del virus varicela zoster en el desarrollo de los brotes.

En ninguno de los grupos de estudio se observó una respuesta diferente de los linfocitos T reg ante la estimulación con los antígenos virales, a pesar de la elevada proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ de los pacientes. Esto

confirma la alteración en la función de las células T reguladoras en la esclerosis múltiple.

8.2 Cuantificación de citocinas producidas por los linfocitos T activados.

La IL-2 es una citocina producida por los linfocitos T y su principal función es promover la proliferación de estas células (Malissen y col., 2014). Se observó una mayor secreción de IL-2 por parte de los linfocitos T de los pacientes en brote, estimulados con VVZ, comparados con el grupo control y los pacientes en remisión (figura 11). Sin embargo, esta diferencia no fue significativa, lo cual sugiere un aumento en el número y afinidad de los receptores para IL-2 en estas células, aunado a la mayor expresión de CD28, que explicaría su elevado porcentaje de proliferación.

En un individuo sano, tras la infección primaria con el virus de varicela se producen linfocitos T de memoria que reconocen las glicoproteínas gE, gB, gC, gH y la proteína IE62 de este virus y, en su mayoría, producen IFN- γ y TNF- α (Arvin, 2008) En las figuras 12 y 13 se observa que los linfocitos T del grupo control produjeron predominantemente IFN- γ ante la estimulación con VVZ. Aunque no se obtuvo diferencia significativa respecto al control negativo, ésta podría observarse ampliando el período de incubación de las CMSP con el virus.

Los linfocitos T de los pacientes presentaron una baja secreción de IFN- γ , comparados con el grupo control (figuras 12 y 13). En la fisiopatología de la esclerosis múltiple, se ha descrito la importancia de la participación de las células Th1 productoras de IFN- γ (Jones y col., 2017). Es por ello que estas células han sido un blanco terapéutico para la industria farmacéutica. Así, la administración de IFN- β en estos pacientes promueve, entre otras cosas, la desviación de un perfil Th1 hacia uno Th2 (Hernández y col., 2014; Kallaur y col., 2013). Seis de los pacientes se encontraban en tratamiento con IFN- β al momento de la toma de muestra, tanto en el período de brote como en remisión, por lo que es posible que este medicamento interfiriera con la producción de IFN- γ como respuesta a la estimulación con VVZ en los linfocitos T de los pacientes.

Kallaur y col. cuantificaron diferentes citocinas en el suero de pacientes con EMRR y esclerosis múltiple secundaria progresiva y observaron que en la forma clínica remitente-recurrente la concentración de TNF no difería de la que presentaban los controles sanos (Kallaur y col., 2013). Es posible que el VVZ promueva la producción de IFN- γ más que de TNF en estos pacientes.

La IL-17A es una citocina es producida por las células Th17 y es de tipo pro-inflamatorio. Las células Th17 contribuyen a la desmielinización del SNC a través de sus efectos sobre las células epiteliales cerebrales protectoras y la activación de células inmunes inflamatorias. La IL-17 altera la integridad de la barrera hematoencefálica, permitiendo la entrada de células inmunitarias circulantes en el SNC, al tiempo que estimula astrócitos y microglia para producir un mediador inflamatorio (Waisman, Regen, Mufazalov y Hauptmann, 2015). Se han reportado proporciones elevadas de células Th17 en varias formas clínicas de la enfermedad, incluyendo el síndrome clínicamente aislado, la forma remitente-remitente (Zhang y col., 2015), así como en las manifestaciones progresivas primarias y secundarias (Jones y col., 2017). En 2009, Durelli y col. llevaron a cabo un estudio en el que midieron la expresión de citocinas intracelulares, los linfocitos T estimulados con proteína básica de mielina que producían IL-17 y la expresión de la cadena de receptor I de IFN tipo I (IFN-alphaR1); en pacientes con EMRR en fase de brote y en remisión. Ellos concluyen que el nivel de IFN-alphaR1 expresado por las células Th17, podría convertirlos en un objetivo selectivo para la terapia con IFN- β (Durelli y col., 2009). Por lo anterior, el tratamiento con IFN- β en seis de los pacientes, podría estar inhibiendo la producción de IL-17 (figura 15), además del IFN- γ . La medición de estas citocinas en el suero de los pacientes en tratamiento con IFN- β , puede ser un dato que ayude a la comprobación de esta teoría.

En la figura 16 se observa una mayor producción de IL-10 por parte de los linfocitos del grupo control, en comparación con los pacientes. En ninguno de los grupos de estudio se obtuvo diferencia significativa en la secreción de IL-10 al estimular las células con VVZ. En el caso del grupo control, esto se explica por la

escasa respuesta de los linfocitos T ante la estimulación con el virus, comprobada con los ensayos de proliferación y con la baja producción de IL-2. Como se mencionó anteriormente, se sabe que existe una alteración en la función de los linfocitos T reguladores en los pacientes con esclerosis múltiple, principalmente en las fases de brote, caracterizadas por una baja producción de IL-10 (Nylander y Hafler, 2012); por lo que, aún al existir una respuesta por parte de los linfocitos T efectores ante la presencia del virus varicela zoster, los linfocitos T reg no están suprimiendo esta respuesta debido a la falta de producción de IL-10.

8.3 Determinación de anticuerpos IgG e IgM contra VVZ y VEB

Como se puede ver en las figuras 17 y 18, el grupo control y los grupos de pacientes (en brote y remisión) presentan un perfil similar de anticuerpos contra VVZ y VEB. En los tres grupos de estudio, la mayoría de individuos fueron positivos a IgG contra VVZ y VEB y negativos a IgM contra ambos virus.

Los resultados para VVZ coinciden con lo reportado en el estudio de Sotelo y col del 2008, en donde cuantifican los anticuerpos IgG e IgM contra VVZ en LCR y en suero de pacientes con EMRR y controles sanos; sin encontrar diferencias significativas entre pacientes, ya sea en recaída o remisión, y sujetos control (Sotelo y col., 2008). En el 2016 se reportó una prevalencia de 98, 690 casos de varicela en México, según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, mientras que en un estudio realizado por Conde-Glez y col., reportaron una seroprevalencia de 85.8% (Conde-Glez y col., 2013). Aunque no se tienen cifras exactas de la seroprevalencia de Epstein-Barr en la población mexicana, es también un virus ampliamente distribuido en el país. Es por ello, que la memoria inmunológica para estos virus, presente en los individuos sanos y los pacientes incluidos en este estudio era un resultado esperado. Cabe mencionar que el paciente que mostró positividad ante la determinación de IgM contra VVZ, tiene poco tiempo de evolución de la enfermedad (2 meses) y dio negativo a IgG e IgM contra Epstein-Barr, por lo que valdría la pena realizar un estudio comparativo del tiempo de evolución de la EM y la seropositividad a IgM contra VVZ.

9. CONCLUSIÓN

Se encontró una mayor respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de pacientes con EMRR tanto en brote como en remisión, ante la estimulación con VVZ, en comparación con la respuesta de linfocitos T de individuos sanos. Al comparar la respuesta de los linfocitos T de los pacientes en brote, frente al estímulo con VVZ y AV, la primera fue significativamente mayor. La IL-2 fue la única citocina que se secretó en mayor concentración en los pacientes en brote, ante el estímulo con VVZ; aunque este valor no fue estadísticamente significativo. Los tres grupos de estudio presentaron una seropositividad similar a los anticuerpos IgG e IgM contra VVZ y virus Epstein-Barr.

Hasta ahora no se había evaluado la respuesta de los linfocitos T de pacientes con EM ante la estimulación con el virus varicela zoster. Por lo que este trabajo contribuye a los estudios realizados por Sotelo y col., reforzando la asociación de este virus con la EM.

10. PERSPECTIVAS

En este trabajo se evaluó la respuesta de los linfocitos T de pacientes con EMRR a la estimulación con una cepa atenuada del virus varicela zoster. Futuros trabajos podrían comprobar la especificidad a este virus mediante la estimulación de linfocitos T con antígenos purificados. Además, la búsqueda de anticuerpos IgM contra VVZ en etapas tempranas de la esclerosis múltiple contribuiría a establecer su papel en el origen de la enfermedad.

Si estudios adicionales demuestran un papel central del VVZ en la patogénesis de la EM, se abrirían nuevas posibilidades de prevención y tratamiento.

11. REFERENCIAS

1. Abbas, A., Lichtman, A. y Pillai, S. (2015). Cellular and Molecular Immunology. 8º ed. Filadelfia, Estados Unidos. Elsevier.
2. Domínguez Moreno, R., Morales Esponda, M., Rossiere Echazarreta, N. y col. (2012). Esclerosis múltiple: revisión de la literatura médica. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*; 55(5): 26-35.
3. Goodin, D. (2016). The epidemiology of multiple sclerosis: insights to a causal cascade. *Handbook of Clinical Neurology*; 138: 173-206.
4. Hernández, A., O'Connor, K. y Hafler, D. (2014). Multiple Sclerosis. N. Rose y I Mackay: The Autoimmune Diseases, 5ª ed; 735-756.
5. Irani, D.N. (2005). Immunological mechanisms in multiple sclerosis. *Clinical and Applied Immunology Reviews*; 5(4):257-269.
6. Murray, T. J. (2005) Multiple sclerosis the history of a disease. Nueva York, Estados Unidos. Demos Medical Publishing.
7. Abendroth, A., Kinchington, P. R. y Slobedman, B. (2010). Varicella Zoster Virus Immune Evasion Strategies. *Varicella-Zoster Virus*, 342, 155-171.
8. Arvin, A. M. (2008). Humoral and cellular immunity to varicella-zoster virus: An overview. *Journal of Infectious Diseases*, 197, S58-S60.
9. Asanuma, H., Sharp, M., Maecker, H. T., Maino, V. C. y Arvin, A. M. (2000). Frequencies of memory T cells specific for varicella-zoster virus, herpes simplex virus, and cytomegalovirus by intracellular detection of cytokine expression. *Journal of Infectious Diseases*, 181(3), 859-866.
10. Bohmer, R. M., Bandala-Sanchez, E. y Harrison, L. C. (2011). Forward Light Scatter Is a Simple Measure of T-Cell Activation and Proliferation but Is Not Universally Suited for Doublet Discrimination. *Cytometry Part A*, 79A(8), 646-652.
11. Cohen, J. I. (2010). The Varicella-Zoster Virus Genome. *Varicella-Zoster Virus*, 342, 1-14.
12. Conde-Glez, C., Lazcano-Ponce, E., Rojas, R., DeAntonio, R., Romano-Mazzotti, L., Cervantes, Y. y col. (2013). Seroprevalences of varicella-zoster virus, herpes simplex virus and cytomegalovirus in a cross-sectional study in Mexico. *Vaccine*, 31(44), 5067-5074.
13. Cree, B. A. C. (2014). Multiple sclerosis genetics. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 122, 193-209.
14. Durelli, L., Conti, L., Clerico, M., Boselli, D., Contessa, G., Ripellino, P. y col. (2009). T-Helper 17 Cells Expand in Multiple Sclerosis and Are Inhibited by Interferon-beta. *Annals of Neurology*, 65(5), 499-509.
15. Eshleman, E., Shahzad, A. y Cohrs, R. J. (2011). Varicella zoster virus latency. *Future Virology*, 6(3), 341-355.
16. Evans, K. N., Nguyen, L., Chan, J., Innes, B. A., Bulrner, J. N., Kilby, M. D. y col. (2006). Effects of 25-hydroxyvitamin D-3 and 1,25-dihydroxyvitamin D-3 on cytokine production by human decidual cells. *Biology of Reproduction*, 75(6), 816-822.
17. Farez, M. F. y Correale, J. (2016). Sphingosine 1-phosphate signaling in astrocytes: Implications for progressive multiple sclerosis. *Journal of the*

- Neurological Sciences*, 361, 60-65.
18. Fransson, M. E., Liljenfeldt, L. S. E., Fagius, J., Totterman, T. H. y Loskog, A. S. I. (2009). The T-cell pool is anergized in patients with multiple sclerosis in remission. *Immunology*, 126(1), 92-101.
 19. Gaesser, J. M. y Fyffe-Maricich, S. L. (2016). Intracellular signaling pathway regulation of myelination and remyelination in the CNS. *Experimental Neurology*, 283, 501-511.
 20. Gelfand, J. M. (2014). Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 122, 269-290.
 21. Gershon, A. A., Breuer, J., Cohen, J. I., Cohrs, R. J., Gershon, M. D., Gilden, D. y col. (2015). Varicella zoster virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 1.
 22. Goldmann, T. y Prinz, M. (2013). Role of Microglia in CNS Autoimmunity. *Clinical y Developmental Immunology*.
 23. Goodin, D. S. (2014). The epidemiology of multiple sclerosis: insights to disease pathogenesis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 122, 231-266.
 24. Guy, C. S., Vignali, K. M., Temirov, J., Bettini, M. L., Overacre, A. E., Smeltzer, M. y col. (2013). Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. *Nature Immunology*, 14(3), 262-270.
 25. Hayward, A. R. (2001). In vitro measurement of human T cell responses to varicella zoster virus antigen. *Immunity to and Prevention of Herpes Zoster*, 17, 143-149.
 26. Jones, A. P., Kermode, A. G., Lucas, R. M., Carroll, W. M., Nolan, D. y Hart, P. H. (2017). Circulating immune cells in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 187(2), 193-203.
 27. Jorg, S., Grohme, D. A., Erzler, M., Binsfeld, M., Haghikia, A., Muller, D. N. y col. (2016). Environmental factors in autoimmune diseases and their role in multiple sclerosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(24), 4611-4622.
 28. Kallaur, A. P., Oliveira, S. R., Simao, A. N. C., De Almeida, E. R. D., Morimoto, H. K., Lopes, J. y col. (2013). Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients and the association between progression and activity of the disease. *Molecular Medicine Reports*, 7(3), 1010-1020.
 29. Karussis, D. (2014). The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: A critical review. *Journal of Autoimmunity*, 48-49, 134-142.
 30. Lande, R., Gafa, V., Serafini, B., Giacomini, E., Visconti, A., Remoli, M. E. y col. (2008). Plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis: Intracerebral recruitment and impaired maturation in response to interferon-beta. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 67(5), 388-401.
 31. Lublin, F. D., Reingold, S. C., Cohen, J. A., Cutter, G. R., Sorensen, P. S., Thompson, A. J. y col. (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis The 2013 revisions. *Neurology*, 83(3), 278-286.
 32. Malissen, B., Gregoire, C., Malissen, M. y Roncagalli, R. (2014). Integrative biology of T cell activation. *Nature Immunology*, 15(9), 790-797.

33. Marrie, R. A. y Wolfson, C. (2001). Multiple sclerosis and varicella zoster virus infection: A review. *Epidemiology and Infection*, 127(2), 315-325.
34. Najafi, S., Ghane, M., Yousefzadeh-Chabok, S. y Amiri, M. (2016). The High Prevalence of the Varicella Zoster Virus in Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Case-Control Study in the North of Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(3).
35. Nicoletti, A., Messina, S., Bruno, E., Mostile, G., Quattrocchi, G., Raciti, L. y col. (2016). Risk factors in multiple sclerosis: a population-based case-control study in Sicily. Background and methods. *Neurological Sciences*, 37(12), 1931-1937.
36. Nylander, A. y Hafler, D. A. (2012). Multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1180-1188.
37. O'Garra, A. y Murphy, K. M. (2009). From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T(H)1 development. *Nature Immunology*, 10(9), 929-932.
38. Pergam, S. A., Limaye, A. P. y Practice, A. S. T. I. D. C. (2009). Varicella Zoster Virus (VZV) in Solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*, 9, S108-S115.
39. Piancone, F., Saresella, M., Marventano, I., La Rosa, F., Zoppis, M., Agostini, S. y col. (2016). B Lymphocytes in Multiple Sclerosis: Bregs and BTLA/CD272 Expressing-CD19+Lymphocytes Modulate Disease Severity. *Scientific Reports*, 6.
40. Quintana, F. J., Perez-Sanchez, S. y Farez, M. F. (2014). Immunopathology of multiple sclerosis. *Medicina-Buenos Aires*, 74(5), 404-410.
41. Reichelt, M., Brady, J. y Arvin, A. M. (2009). The Replication Cycle of Varicella-Zoster Virus: Analysis of the Kinetics of Viral Protein Expression, Genome Synthesis, and Virion Assembly at the Single-Cell Level. *Journal of Virology*, 83(8), 3904-3918.
42. Rivers, T. M., Sprunt, D. H. y Berry, G. P. (1933). Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *Journal of Experimental Medicine*, 58(1), 39-U58.
43. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M. y Hafler, D. A. (2010). FOXP3(+) regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 490-500.
44. Salehi, Z., Doosti, R., Beheshti, M., Janzamin, E., Sahraian, M. A. y Izad, M. (2016). Differential Frequency of CD8+T Cell Subsets in Multiple Sclerosis Patients with Various Clinical Patterns. *Plos One*, 11(7).
45. Sie, C., Korn, T. y Mitsuhashi, M. (2014). Th17 cells in central nervous system autoimmunity. *Experimental Neurology*, 262, 18-27.
46. Singh, S., Metz, I., Amor, S., van der Valk, P., Stadelmann, C. y Bruck, W. (2013). Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons. *Acta Neuropathologica*, 125(4), 595-608.
47. Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. y Jordan, M. S. (2009). T Cell Activation. *Annual Review of Immunology*, 27, 591-619.

48. Sotelo, J., Martinez-Palomo, A., Ordonez, G. y Pineda, B. (2008). Varicella-zoster virus in cerebrospinal fluid at relapses of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 63(3), 303-311.
49. Sotelo, J., Ordonez, G., Pineda, B. y Flores, J. (2014). The participation of varicella zoster virus in relapses of multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 119, 44-48.
50. Tarrats, R., Ordonez, G., Rios, C. y Sotelo, J. (2002). Varicella, ephemeral breastfeeding and eczema as risk factors for multiple sclerosis in Mexicans. *Acta Neurologica Scandinavica*, 105(2), 88-94.
51. Waisman, A., Regen, T., Mufazalov, I. y Hauptmann, J. (2015). The role of IL-17 in CNS diseases. *Cytokine*, 76(1), 64-64.
52. Wingerchuk, D. M. (2012). Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 5(1), 13-22.
53. Wu, G. F. y Alvarez, E. (2011). The Immunopathophysiology of Multiple Sclerosis. *Neurologic Clinics*, 29(2), 257-+.
54. Zerboni, L., Sen, N., Oliver, S. L. y Arvin, A. M. (2014). Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 12(3), 197-210.
55. Zhang, X., Tao, Y. Z., Chopra, M., Dujmovic-Basuroski, I., Jin, J. P., Tang, Y. N. y col. (2015). IL-11 Induces Th17 Cell Responses in Patients with Early Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Journal of Immunology*, 194(11), 5139-5149.
56. Zozulya, A. L. y Wiendl, H. (2008). The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nature Clinical Practice Neurology*, 4(7), 384-398.
57. Zindler, E. y Zipp, F. (2010). Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology*, 24(4): 551-562.

12. APÉNDICE

12.1 SOLUCIONES

PBS (Buffer Salino de Fosfatos) 1X

- Composición

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

- Preparación

1. Disolver las sales en 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7.4 con HCl.
2. Aforar a 1 L con agua destilada.
3. Esterilizar por filtración.

Azul tripano al 0.4%

- Composición

Azul tripano	40 mg
--------------	-------

- Preparación

Disolver el azul tripano en 10 ml de agua destilada y agitar para mezclar.

12.2 KITS COMERCIALES

FITC BrdU Flow KIT BD No. Cat. 557891

- Composición

1. Anticuerpo anti BrdU conjugado con FITC	1 vial con 65 µl
2. Buffer Cytotfix/Cytoperm™ BD	1 botella con 25 ml
3. Buffer Perm/Wash™ (10X) BD	2 botellas con 25 ml
4. Buffer Plus Cytoperm™ Permeabilization BD	1 botella con 10 ml
5. 7-AAD (7-aminoactinomicina D)	1 vial con 1 ml
6. BrdU 10 mg/ml	5 viales con 0.5 ml
7. DNasa	5 viales con 300 µl

BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit

- Composición

1. Perlas de captura para IL-2 humana	1 vial con 0.8 ml
2. Perlas de captura para IL-4 humana	1 vial con 0.8 ml
3. Perlas de captura para IL-6 humana	1 vial con 0.8 ml
4. Perlas de captura para IL-10 humana	1 vial con 0.8 ml
5. Perlas de captura para TNF humano	1 vial con 0.8 ml
6. Perlas de captura para IFN-γ humano	1 vial con 0.8 ml
7. Perlas de captura para IL-17A humana	1 vial con 0.8 ml
8. Reactivo de detección Human Th1/Th2/Th17 PE	1 vial con 4 ml
9. Estándares de citocinas Th1/Th2/Th17 humanas	2 viales liofilizados
10. Perlas para el ajuste del citómetro	1 vial con 1.5 ml
11. Control positivo de detección de PE	1 vial con 0.5 ml
12. Control positivo de detección de FITC	1 vial con 0.5 ml

Varicella-Zoster Virus (VZV) IgG-ELISA
Varicella-Zoster Virus (VZV) IgM-ELISA

- Composición

1. Placa de 96 pozos con el antígeno de VVZ acoplado.
2. Diluyente de la muestra, dos frascos con 50 ml de buffer a un pH de 7.2 ± 0.2 .
3. Solución de paro, 1 frasco con 15 ml de ácido sulfúrico 0.2 M
4. Solución de lavado 20x, 1 frasco con 50 m.
5. Para el caso del kit para detección de IgG: conjugado anti IgG humana, 1 frasco con 20 ml de conjugado anti IgG humano producido en conejo, marcado con peroxidasa. Para el caso del kit para detección de IgM: Conjugado anti IgM humana, 1 frasco con 20 ml de conjugado anti IgM humano producido en conejo, marcado con peroxidasa
6. Sustrato TMB, 1 frasco con 15 ml de 3,3',5,5'-tetra-metil-benzidina (TMB).
7. Control positivo, 1 frasco con 2 ml
8. Control *Cut-off*, 1 frasco con 3 ml
9. Control negativo, 1 frasco con 2 ml.

Epstein-Barr virus EBNA-1 IgG ELISA
Epstein-Barr virus EBNA-1 IgM ELISA

- Composición

1. Placa de 96 pozos con el antígeno de VEB acoplado.
2. Para el caso del kit para detección de IgG: conjugado enzimático anti IgG, 1 frasco con 15 ml de conjugado anti IgG humano producido en conejo, acoplado a peroxidasa. Para el caso del kit para detección de IgM: conjugado enzimático anti IgM, 1 frasco con 15 ml de conjugado anti IgG humano producido en conejo, acoplado a peroxidasa.
3. Estándar A y B, 1 frasco por cada uno, con 2 ml.
4. Buffer de dilución, 1 frasco con 60 ml, contiene PBS, BSA y $< 0.1\%$ de NaN_3
5. Buffer de lavado 10x, 1 frasco con 60 ml, contiene PBS y Tween 20.
6. Sustrato TMB, 1 frasco de 15 ml.
7. Solución de paro, 1 frasco con 15 ml, contiene ácido sulfúrico 0.5 M.

12.3 DETALLES DE LOS PROTOCOLOS

PARÁMETROS UTILIZADOS PARA LA qPCR

- Secuencia de la gB del virus varicela zoster

TGCTTTTTATGCATATTTTCTATGTTTGTACGGCGGTTGTGTCTGGTCTCTCCAAGCTCGTTTTA
TGAGAGTTTACAAGTAGAGCCACACAATCAGAAGATATAACCCGGTCTGCTCATCTGGGCGA
TGGTGATGAAATCAGAGAAGCTATACACAAGTCCCAGGACGCCGAAACAAAACCCACGTTTTA
CGTCTGCCACCGCCAACAGGCTCCACAATCGTACGATTAGAACCAACTCGGACATGTCCGGA
TTATCACCTTGGTAAAACTTTACAGAGGGTATTGCTGTTGTTTATAAAGAAAACATTGCAGCGT
ACAAGTTAAGGCGACGGTATATTACAAAGATGTTATCGTTAGCACGGCGTGGGCCGGAAGTT
CTTATACGCAAATTACTAATAGATATGCGGATAGGGTACCAATTCCCGTTTTAGAGATCACGGA
CACCATTGATAAGTTTGGCAAGTGTCTTCTAAAGCAACGTACGTACGAAATAACCACAAAGTT
GAAGCCTTTAATGAGGATAAAAAATCCACAGGATATGCCTCTAATCGCATCAAAATATAATTCTGT
GGGATCCAAAGCATGGCATACTACCAATGACACGTACATGGTTGCCGGAACCCCGGAACATA
TAGGACGGGCACGTCCGTGAATTGCATCATTGAGGAAGTTGAAGCCAGATCAATATTCCCTTA
TGATAGTTTTGGACTTTCCACGGGAGATATAATATACATGTCCCGTTTTTTGGCCTACGGGAT
GGTGCATACAGAGAACATTCCAATTATGCAATGGATCGTTTTCCACGTTTTGAGGGTTATAGAC
AAAGGGATCTTGACACTAGAGCATTACTGGAACCTGCAGCGCGGAACTTTTTAGTCACGCCTC
ATTTAACGGTTGTTGGAAGCTGGAAGCCAAAACGAACGGAAGTTTGTTCGCTTGCAAGTGGC
GTGAGTTGAAGACGTAGTTCCGCGATGAGTATGCACACAATTTTCGCTTACAATGAAAACACT
TTCTACCACGTTTATAAGTGAACAAAACGAGTTTAACTTAACCAAATCCATCTCAGTCAATGTG
TAAAGGAGGAAGCCCGGGCTATTATTAACCGGATCTATACAACCAGATACAACCTCATCTCATGT
TAGAACCGGGGATATCCAGACCTACCTTGCCAGAGGGGGTTTGTGTTGGTGTTCACCCCT
GCTGAGCAATTCCCTCGCCGTCTCTATCTCCAAGAATTGGTCCGTGAAAACACTAATCATTCA
CCACAAAAACCCGACTCGAAATACCAGATCCCGACGAAGCGTGCCAGTTGAGTTGCGTGC
CAATAGAACAATAACAACCACCTCATCGGTGGAATTTGCTATGCTCCAGTTTACATATGACCAC
ATTCAGAGCATGTTAATGAAATGTTGGCACGTATCTCCTCGTCGTGGTGCCAGCTACAAAATC
GCCAACGCGCCCTTTGGAGCGGACTATTTCCAATTAACCAAAGTGCTTTAGCGAGCACCATTT
TGGATCAACGTGTTAAAGCTCGTATTCTCGGCGACGTTATCTCCGTTTCTAATTGTCCAGA
GGGATCAGATACACGCATTATACTTCAAACCTCTATGAGGGTATCTGGTAGTACTACGCGTTGT
TATAGCCGTCCTTTAATTTCAATAGTTAGTTAAATGGGTCCGGGACGGTGGAGGGCCAGCTT
GGAACAGATAACGAGTTAATTATGTCCAGAGATCTGTTAGAACCATGCGTGGCTAATCACAAGC
GATATTTTCTATTTGGGCATCACTACGTATATTATGAGGATTATCGTTACGTCCGTGAAATCGCA
GTCCATGATGTGGGAATGATTAGCACTTACGTAGATTTAAACTTAACTTCTTAAAGATAGAGA
GTTTATGCCGCTGCAAGTATATACAAGAGACGAGCTGCCGGATACAGGATTACTAGACTACAG
TGAAATTCAACGCCGAAATCAAATGCATTGCTGCGTTTTTATGACATAGACAAGGTTGTGCAA
TATGATAGCGGAACGGCCATTATGCAGGGCATGGCTCAGTTTTTCCAGGGACTTGGGACCGC
GGGCCAGGCCGTTGGACATGTGGTTCTTGGGGCCACGGGAGCGCTGCTTTCCACCGTACACG
GATTTACCACGTTTTTATCTAACCCATTTGGGGCATTGGCCGTGGGATTATTGGTTTTGGCGGG
ACTGGTAGCGGCCTTTTTTGCCTACCGGTACGTGCTTAAACTTAAACAAGCCCGATGAAGGC
ATTATATCCACTCACAACCAAGGGGTTAAAACAGTTACCGGAAGGAATGGATCCCTTTGCCGA
GAAACCAACGCTACTGATACCCCAATAGAAGAAATTGGCGACTCACAAAACACTGAACCGTC
GGTAAATAGCGGGTTTGGATCCCGATAAATTTGAGAAGCCAGGAAATGATTAATATATGACG
TTAGTATCTGCGGCTGAGCGCCAAGAATCTAAAGCCCGCAAAAAAATAAGACTAGCGCCCTT
TTAACTTCACGTCTTACCGGCCTTGCTTTACGAAATCGCCGAGGATACTCCCGTGTTGCGCACC
GAGAATGTAACGGGGGTGTAA 1299=ABC

- Sondas de VVZ (Applied Biosystems)

Forward	Reverse	Tamaño del producto
5'-CACAAAAACACCCGACTCGAA-3'	5'-AATGGCACGAACTCAACTG-3'	65 pb

- Programa de amplificación de la gb del VVZ por PCR en tiempo real

Etapa	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (h:min:s)	Número de ciclos
1	1	50	0:02:00	1
2	1	95	0:10:00	1
3	1	95	0:00:15	40
	2	60	0:01:00	

- Procedimiento de estandarización de la curva estándar para la obtención de copias virales

La curva estándar se preparó con 10 diluciones en serie del plásmido (pET) que portaba el gen gB. El inserto en el vector fue completamente secuenciado con el sistema CEQ (versión 9.0.25). Para cada reacción, los valores de fluorescencia en tiempo real se midieron en función de la cantidad del fluorocromo reportero 6-carboxi-fluoresceína (FAM) liberado durante las amplificaciones. Se definió el valor umbral de ciclo (Ct) para cada muestra como el número de ciclo en el que la fluorescencia medida excedió el umbral (10 veces la desviación estándar de la línea de base). La masa de una sola molécula de plásmido se determinó mediante la fórmula: $m = (n) (1.096 \times 10^{-21} \text{ g/pb})$, donde $n =$ tamaño del DNA (pb), $m =$ masa, tomando en cuenta que el número de Avogadro es igual a 6.023×10^{23} moléculas/mol y el peso molecular de una molécula de DNA de doble cadena es igual a 660 g/mol.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE VIRUS UTILIZADA PARA LA ESTIMULACIÓN DE CMSP

Se estimularon los linfocitos T de un sujeto sano con 0.27, 1.35 y 2.7 μg de proteínas totales de VVZ por cada 60,000 células y se evaluó su proliferación mediante citometría de flujo, agregando BrdU al cultivo y utilizando un anticuerpo monoclonal anti BrdU acoplado a FITC. Como control positivo se utilizó concanavalina A, mitógeno específico de linfocitos T. Los linfocitos estimulados con 0.27 μg de proteínas totales tuvieron un porcentaje de proliferación de 0.29%, los estimulados con 1.35 μg proliferaron en un 2.3%, mientras que los estimulados con 2.7 μg de proteínas totales mostraron una proliferación de 2.4%. Como se puede observar, al incrementar al doble la concentración de virus (de 1.35 a 2.7) no se obtiene una mayor proliferación, por lo que se decidió utilizar la concentración de 1.35 μg de proteínas totales para la estimulación de los linfocitos T. Esta concentración de proteínas se encuentra en 0.3 μl de vacuna de VVZ y son equivalentes a 4,500,000 copias virales, de acuerdo con la cuantificación por qPCR.

PROTOCOLO DE TINCIÓN PARA CITOMETRÍA DE FLUJO

1. Transferir el cultivo de cada pozo en tubos Falcon de 12 x 75 mm para citómetro de flujo, cosechar las células mediante centrifugación a 1800 rpm durante 5 minutos.
2. Tomar el sobrenadante de los cultivos sin estímulo y estimulados con VV y almacenarlos a -20°C hasta su uso.
3. Resuspender el botón celular en 50 μl del buffer de tinción.
4. Separar los tubos que serán marcados para CD8 y CD4 de los de las células reguladoras (CD4, CD25, FoxP3).
5. En los tubos para CD4 y CD8 adicionar 10 μl de los anticuerpos anti CD4 PE, CD25 APC y CD8 PerCP-Cy5.5 (diluidos 1:50 en PBS), en los tubos para reguladoras adicionar 10 μl de los anticuerpos anti CD4 PE y CD25 APC. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad.
6. Después de la incubación, lavar las células adicionando 1 ml de buffer de tinción y centrifugando a 2000 rpm durante 5 minutos. Desechar el sobrenadante y proceder a la fijación y permeabilización.
7. Resuspender las células en 100 μl de buffer Cytotfix/ Cytoperm e incubar durante

20 minutos a temperatura ambiente.

8. Lavar con 1 ml de buffer Perm/Wash 1X y centrifugar por 5 minutos a 2000 rpm. Descartar el sobrenadante.
9. Resuspender las células en 100 μ l de buffer de permeabilización Cytoperm Plus e incubar durante 10 minutos en hielo.
10. Lavar nuevamente las células y resuspenderlas en 100 μ l de buffer Cytofix/Cytoperm.
11. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y lavar.

Tratamiento con DNasa para exponer la BrdU incorporada.

12. Resuspender las células en 100 μ l de DNasa (diluida a 300 μ g/ml en DPBS).
13. Incubar a 37°C durante 1 hora.
14. Lavar las células.
15. Agregar a todos los tubos 50 μ l del anticuerpo anti-BrdU-FITC diluido 1:50 en buffer Perm/Wash.
16. Agregar a los tubos para la tinción de linfocitos T reguladores, 50 μ l del anticuerpo anti FoxP3 PerCP-Cy5.5, diluido 1:50 en PBS.
17. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad.
18. Lavar y resuspender las células en 1 ml de PBS para su lectura en el citómetro de flujo.