



Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del  
Instituto Politécnico Nacional

Unidad Zacatenco

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

**Infectividad del virus varicela zoster presente en el líquido cefalorraquídeo  
de pacientes con esclerosis múltiple**

Tesis que presenta la

**M. en C. Olivia Hernández González**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

Directores de Tesis

Dra. Martha Espinosa Cantellano

Dr. Adolfo Martínez Palomo

Ciudad de México

Enero, 2019

## Asesores de Tesis

Dra. Bibiana Chávez Munguía, Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav

Dra. Rosa María del Ángel Núñez, Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav

Dr. Juan E. Ludert, Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav

Dr. Julio Sotelo, Laboratorio de Neuroinmunología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”

Dr. José Tapia, Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología Celular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Cinvestav, bajo la tutoría de la Dra. Martha Espinosa Cantellano y del Dr. Adolfo Martínez Palomo, y en el laboratorio de Neuroinmunología de la Unidad de Investigación del Sistema Nervioso, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), bajo la asesoría del Dr. Julio Sotelo.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo con la beca otorgada a la M. en C. Olivia Hernández González (Becaria de CONACyT N°. 214466) y los proyectos de investigación FOSISS otorgados a la M. en C. Graciela Ordoñez (No. 2012-01-181031) y a la Dra. Martha Espinosa Cantellano (No. 2015-01-261698). Asimismo, el trabajo contó con el apoyo financiero de la Fundación Miguel Alemán, a través del Programa de Salud, con apoyos otorgados a la Dra. Martha Espinosa Cantellano en sus ediciones 2016 y 2017.

## **Agradecimientos**

A Dios y a mis padres, porque siempre han estado conmigo, por el amor brindado, por su confianza y el gran apoyo incondicional en cada instante de mi vida.

Agradezco de una manera muy especial al Dr. Adolfo Martínez Palomo a quien admiro mucho y le agradezco la confianza que depositó en mí, su tiempo, dedicación, sus enseñanzas y el haberme permitido ser parte de su equipo de trabajo.

A la Dra. Martha Espinosa Cantellano por su apoyo, su confianza, su paciencia, sus enseñanzas, su tiempo y dedicación.

Al Dr. Julio Sotelo a quien admiro mucho y le agradezco la confianza que depositó en mí, sus enseñanzas, su tiempo y el haberme permitido ser parte de su equipo de trabajo.

A la Dra. Bibiana Chávez y al Dr. Arturo González por sus enseñanzas en el laboratorio, su tiempo, su apoyo y dedicación.

A la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y Rosa Ma. Del Ángel por sus enseñanzas, sus conocimientos y todo el apoyo brindado durante mi formación académica.

A Graciela Ordoñez por sus conocimientos, sus enseñanzas, por la confianza que depositó en mí, su tiempo, dedicación y los buenos momentos compartidos.

A Benjamín Pineda por sus conocimientos y sus enseñanzas.

A los miembros del comité revisor: Dra. Bibiana Chávez, Dr. Julio Sotelo, Dra. Rosa Ma. Del Angel, Dr. Juan E. Ludert, Dr. José Tapia por los valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo.

A Anel Lagunes por sus conocimientos, sus enseñanzas en el laboratorio, sobre todo por su gran amistad y apoyo incondicional. A Jud por su apoyo y amistad.

A Jimmy Álvarez por su apoyo, comprensión, conocimientos, sobre todo tu paciencia y tus buenos consejos. ILU

A Liz, Paty, Karla, Dany y Hugo por su apoyo, sus conocimientos y sus buenos consejos.

A mis compañeros del laboratorio de neuroinmunología del INNN.

## **Dedicatoria**

A Dios, ya que siempre ha estado conmigo además de concederme el regalo más grande de la vida.

A mis padres Jesús e Irma, a quienes amo con todo mi corazón, agradezco todo el apoyo brindado durante toda mi vida, su gran amor y sobre todo por saberme guiar en el camino del aprendizaje.

A mi hermano Omar a quien amo y le agradezco el enseñarme a luchar por mis sueños, por su apoyo, por sus buenos consejos durante mi formación académica.

A mis tías Silvia y Haydee a quienes agradezco su apoyo incondicional, su paciencia, sus consejos y el haberme guiado durante mi formación académica.

A mis tíos Luis, Fe y Javier. A mis primas y sobrinas

Al pequeñín Abdiel por traer alegría a mi vida.

## Índice

<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	2
<b>1. Introducción</b>	3
1.1 Tipos clínicos de la EM	4
1.2 Diagnóstico de la EM	4
1.2.1 Identificación de bandas oligoclonales (BOC)	5
1.2.2 Resonancia magnética nuclear: principios básicos	6
1.2.3 Contraste a base de gadolinio	7
1.3 Epidemiología de la EM	8
1.4 Tratamiento de la EM	9
1.5 Etiología de la EM	13
1.6 La posible relación de la EM con infecciones virales	15
1.7 Propiedades del VVZ	16
<b>2 Justificación</b>	19
<b>3 Hipótesis</b>	19
<b>4 Objetivo general</b>	19
4.1 Objetivos específicos	19
<b>5 Material y Métodos</b>	20
5.1 Población de estudio	20
5.2 Criterios de inclusión	20
5.3 Criterios de exclusión	21
5.4 Extracción y cuantificación del ADN del VVZ en la vacuna cepa OKA y en el LCR de pacientes con EM	21
5.5 Identificación del VVZ por microscopía electrónica	22
5.6 Cultivos celulares	22
5.6.1 Fibroblastos	22
5.6.2 Células VERO C1008 [Vero 76, clone E6, Vero E6] (ATCC® CRL-1586™)	22

5.7 Propagación del VVZ presente en el LCR	23
5.8 Análisis de las interacciones de los cultivos celulares con la vacuna OKA, con los LCRs de pacientes con EM en brote y con el LCR de pacientes controles por microscopía electrónica de transmisión	24
5.9 Análisis de las interacciones de los cultivos celulares con la vacuna OKA, con los LCRs de pacientes con EM en brote y con el LCR de pacientes controles por microscopía confocal	24
<b>6 Resultados</b>	<b>25</b>
6.1 Identificación del ADN del virus varicela-zoster en el LCR de pacientes con esclerosis múltiple	25
6.2 Caracterización ultraestructural del virus varicela-zoster	26
6.3 Visualización del virus varicela-zóster en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple, por microscopía electrónica de transmisión	28
6.4 Efecto citopático del LCR de pacientes con esclerosis múltiple en fibroblastos humanos de piel	29
6.5 Análisis por microscopía electrónica de fibroblastos incubados con LCR de pacientes con esclerosis múltiple	30
6.6 Identificación de la glicoproteína gB en fibroblastos humanos incubados con LCR de pacientes con esclerosis múltiple por microscopía confocal	31
6.7 Microscopía óptica del efecto citopático en células Vero E6 incubadas con sobrenadantes de cultivos previamente inoculados con LCR de pacientes	32
6.8 Identificación de las glicoproteínas gB e IE62 en células Vero E6 incubadas con virus varicela-zoster propagado del LCR de pacientes con esclerosis múltiple	

por microscopía confocal	33
6.9 Análisis por microscopía confocal de células Vero E6 incubadas con el LCR de pacientes con otros padecimientos neurológicos	34
6.10 Visualización por microscopía electrónica de partículas semejantes al VVZ en células Vero E6 incubadas con virus propagados del LCR de pacientes con esclerosis múltiple	35
<b>7 Discusión</b>	<b>36</b>
<b>8 Referencias</b>	<b>43</b>
<b>Apéndice 1: Lista de Abreviaturas</b>	<b>50</b>
<b>Apéndice 2: Lista de Tablas</b>	<b>52</b>
<b>Apéndice 3: Lista de Figuras</b>	<b>53</b>
<b>Apéndice 4: Protocolos</b>	<b>55</b>
<b>Apéndice 5: Artículo publicado</b>	<b>70</b>

## Resumen

Se ha sugerido la participación del virus varicela-zoster (VVZ) en la etiopatogenia de la esclerosis múltiple (EM). En estudios previos se identificaron partículas virales morfológicamente semejantes al VVZ en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM en los primeros ocho días de exacerbación. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si esas partículas virales son infectivas. Por ello, una vez confirmada la presencia del VVZ en LCR de pacientes con EM, se analizó la infectividad del virus al inocularlo en cultivos celulares permisivos.

La carga viral del VVZ fue elevada en cinco LCR de pacientes con EM en los primeros días de exacerbación. En cambio, no se detectó el VVZ en cinco LCR de pacientes con otros padecimientos neurológicos no desmielinizantes. Los LCR de pacientes con EM se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-gI, gB y gE y se procesaron para análisis mediante microscopia electrónica de transmisión (MET). Se encontraron partículas semejantes a los VVZ de la vacuna OKA y los del líquido vesicular de un paciente con herpes zoster. Para analizar la infectividad de las partículas virales se probaron distintos cultivos celulares: cultivos primarios de fibroblastos humanos, líneas celulares U87, Mewo, Vero y Vero E6. Los mejores resultados fueron obtenidos cuando los LCR positivos al VVZ se inocularon en cultivos de células Vero E6. A las 72 horas de inoculación se observó acentuado daño citopático en las células Vero E6, manifestado como aumento de volumen celular, despegamiento de las células del sustrato o formación de sincitios. En esos cultivos procesados para microscopia confocal, marcando con anticuerpos anti-gB e IE62, se observó positividad en la región perinuclear de las células Vero E6. La MET confirmó la presencia de virus en los cultivos incubados con LCR de pacientes con EM.

Los resultados permiten afirmar por vez primera que, en condiciones *in vitro*, el LCR de pacientes con EM en exacerbación contiene VVZ infectivos.

## **Abstract**

**Background:** We have reported the presence of varicella-zoster virus (VZV) DNA and viral particles in the cerebrospinal fluid (CSF) of multiple sclerosis (MS) patients during exacerbation. It is not known whether these viruses are infective.

**Objective:** To determine whether the VZV found in CSF of MS patients in exacerbation phases are infective.

**Methods:** Vero E6 cell cultures were incubated with CSF of five MS cases positive for VZV DNA, containing herpes-like viral particles. Localization of an immediate-early and a late structural VZV proteins was monitored by confocal microscopy after 72 h at 37°C. CSF from five non-inflammatory neurological patients were used as controls.

**Results:** A cytopathic effect was found in cultured cells inoculated with CSF from MS patients. Both, structural VZV glycoprotein (gB) and immediate-early VZV protein (IE62) replicated in Vero E6 cultures with samples from all five MS cases. CSF from control patients produced no effect on Vero E6 cells.

**Conclusion:** When present in the CSF at relapses of MS, VZV is infective under *in vitro* conditions.

## 1. Introducción

La EM es una enfermedad crónica del sistema nervioso central mediada por respuestas autoinmunes y caracterizada clínicamente por la pérdida gradual de funciones motoras y sensoriales. Las alteraciones celulares consisten en infiltrados de células mononucleares, desmielinización, daño axonal y gliosis, con formación de múltiples placas en el cerebro y medula espinal (Karussis, 2014; Milo y Miller, 2014).

El pionero de la neurología, Jean-Martin Charcot, fue el primero en 1868 en describir y dar nombre a la EM en una serie de artículos publicados con el título “La sclerose en plaques”, en los que definió la sintomatología de la enfermedad y los principales cambios patológicos, el reconocimiento de las células inflamatorias, la pérdida de la mielina, el daño axonal, las características clínicas y el deterioro cognitivo. Sus observaciones condujeron al desarrollo del primer criterio diagnóstico, nombrado la triada de Charcot (nistagmo, ataxia y disartria) (Milo y Miller, 2014).

La EM se clasifica dentro del grupo de las enfermedades desmielinizantes y se caracteriza por la presencia de placas focales múltiples de desmielinización tanto en la materia blanca, como en la materia gris del sistema nervioso central. Los infiltrados inflamatorios están constituidos principalmente por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, linfocitos B, monocitos y macrófagos (Jörg y col., 2016). En las etapas tempranas de la enfermedad los axones y las neuronas se conservan; sin embargo, la progresión de la enfermedad produce pérdida axonal gradual que correlaciona con la discapacidad del paciente. La inflamación está presente en todas las etapas de la EM, pero es más pronunciada en las fases agudas (Dendrou, Fugger y Friese, 2015).

La inoculación de componentes de la mielina en animales susceptibles produce encefalitis autoinmune experimental, una enfermedad autoinmune mediada por células T CD4<sup>+</sup>, que comparte similitudes con la EM y puede ser transferida a otros animales vírgenes por células T CD4<sup>+</sup> encefalitogénicas. La

encefalitis autoinmune experimental no puede ser transferida por anticuerpos (Zamvil y Steinman, 1990).

### **1.1 Tipos clínicos de la EM**

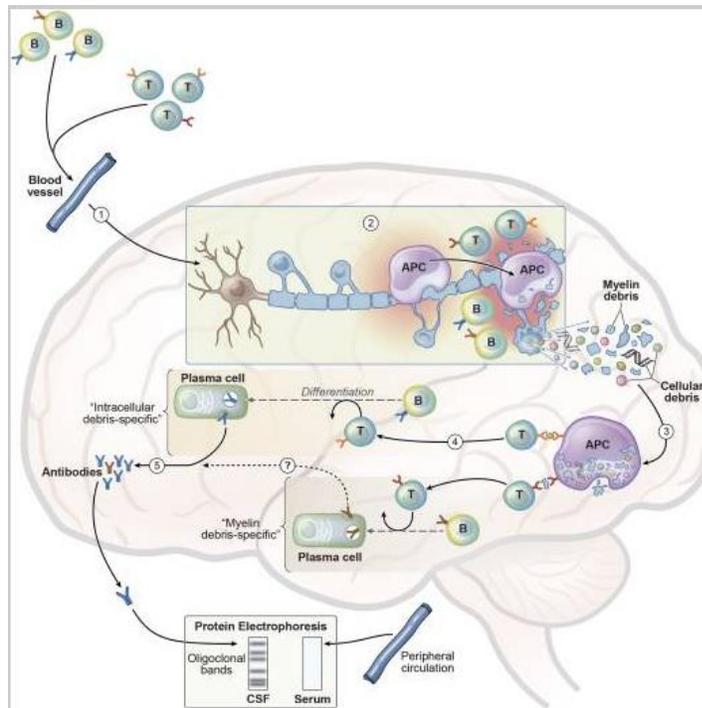
A pesar de que la presentación clínica y el curso de la EM son altamente variables, se describen cuatro patrones clínicos diferentes de la enfermedad: EM recurrente-remitente (EMRR), EM primaria progresiva (EMPP), EM secundaria-progresiva (EMSP) y EM progresiva-recurrente (EMPR). Cada uno de estos patrones puede ser leve, moderado o grave (Milo y Miller, 2014).

El 85 al 90 por ciento de los pacientes con EM presentan el patrón recurrente-remitente de la enfermedad, que inicia el curso clínico con recaídas y remisiones. La recaída o brote es la aparición de síntomas neurológicos de más de 24 horas de duración, en ausencia de fiebre, mientras que la remisión es la mejoría de los síntomas y signos, que permanecen estables al menos durante un mes. Las manifestaciones clínicas a menudo son reversibles, sobre todo al inicio de la enfermedad, pero con el tiempo los ataques repetidos del sistema inmunológico van dejando secuelas que aumentan la discapacidad.

### **1.2 Diagnóstico de la EM**

En 2001 el Comité Internacional McDonald estableció los criterios diagnósticos de la EM, que fueron revisados en 2011. Los criterios incluyen (1) evidencia de diseminación de lesiones en tiempo y espacio, (2) exclusión de otras causas que produzcan el cuadro clínico, (3) presencia objetiva de enfermedad neurológica multifocal y (4) confirmación del diagnóstico por estudios de laboratorio (detección de bandas oligoclonales) y gabinete (resonancia magnética nuclear) (Polman y col. 2011)

## 1.2.1 Identificación de bandas oligoclonales (BOC)



Modelo para explicar el desarrollo de anticuerpos secundarios específicos de desechos intracelulares BOC en LCR

(1) Tras la activación en tejidos linfoides secundarios periféricos, las células T específicas de la mielina, incluidas las células T con reactividad cruzada de organismos infecciosos (es decir, mimetismo molecular) pasan a la sangre, cruzan la barrera hematoencefálica, ingresan al sistema nervioso central (SNC), e infiltran el parénquima. De manera similar, las células B pueden comigrar con las células T activadas. (2) Dentro del SNC, las células T específicas de la mielina inician una inflamación focal con la producción de citoquinas y la activación de la microglía residente, que puede servir como células presentadoras de antígeno (CPA) para esas células T. Esta respuesta inflamatoria inicial del SNC conduce al reclutamiento de macrófagos y células dendríticas que también pueden servir como CPA, así como otras células inmunes, que culminan en la destrucción y liberación de residuos de la mielina y los oligodendrocitos formadores de mielina.

(3) Los residuos intracelulares y de mielina se fagocitan y procesan por CPA, y se presentan a las células T infiltrantes que pueden reconocer esos neoantígenos. (4) Las células T específicas de antígeno activadas (por ejemplo, las células auxiliares foliculares T) ayudan a las células B infiltrantes que pueden reconocer los residuos intracelulares a diferenciarse en células plasmáticas productoras de anticuerpos. (5) Estas células plasmáticas expandidas clonalmente producen IgG en el LCR, que se representan como bandas "oligoclonales" discretas cuando se analizan mediante electroforesis en gel de proteínas.

Debido a que esta respuesta inmunitaria está compartimentalizada en el SNC, las bandas correspondientes no se detectan mediante electroforesis de proteínas séricas. No se sabe si los anticuerpos producidos por esas células B específicas de los residuos de mielina también contribuyen a la formación de bandas discretas (indicado por un signo de interrogación en el paso 4) (Winger & Zamvil, 2016).

### **1.2.2 Resonancia magnética nuclear: principios básicos**

La resonancia magnética (RM) constituye el estudio más valioso y sensible para demostrar las lesiones producidas por la EM, ya que confirma la presencia de lesiones desmielinizantes, aún aquellas no sospechadas clínicamente, y descarta otros diagnósticos. Asimismo, permite evaluar el curso de la enfermedad (Swanton y col., 2007). La RM utiliza las propiedades magnéticas de ciertos núcleos atómicos, como el núcleo de hidrógeno (protón único) presente en las moléculas de agua y, por lo tanto, en todos los tejidos del cuerpo. Los núcleos de hidrógeno se alinean parcialmente cuando están sometidos a un fuerte campo magnético. Al introducir una onda de radio, los núcleos rotan y al eliminar la onda de radio oscilan en el campo magnético mientras regresan al equilibrio, al tiempo que emiten una señal de radio. Esta señal es detectada y utilizada para obtener imágenes detalladas de los tejidos. La RM no utiliza radiactividad ni radiación ionizante y la radiofrecuencia utilizada no produce efectos adversos para la salud.

La señal de RM es sensible a una amplia gama de influencias, como la movilidad nuclear, la estructura molecular, el flujo y la difusión; por ello, una técnica que permite analizar tanto estructura como función.

### **1.2.3 Contraste a base de gadolinio**

El gadolinio libre (Gd) es un metal pesado de la serie de lantánidos, que es tóxico para los humanos. Para reducir su toxicidad, los agentes de contraste basados en gadolinio (GBCA, por sus siglas en inglés) se forman por quelación de gadolinio a ligandos orgánicos. Estructuralmente, existen 2 tipos de GBCA: 1) moléculas macrocíclicas en las cuales el ión  $Gd^{3+}$  está dentro de la cavidad del ligando, y 2) moléculas de cadena abierta o "lineales". En cada categoría hay GBCAs iónicos y no iónicos. A pesar de sus diferentes estructuras moleculares y propiedades fisicoquímicas, todos los GBCA utilizados para la obtención de imágenes de contraste ("contrast-enhanced magnetic resonance", CE-MR) del SNC tienen un mecanismo de acción idéntico: acortamiento de las constantes de tiempo de relajación T1, T2 y T2\* de protones de agua adyacentes en tejidos y perfiles de biodistribución similares, ya que ninguno cruza la barrera hematoencefálica intacta. El tiempo de relajación T1, también conocido como tiempo de relajación de la red de espín, es una medida de la rapidez con que el vector de magnetización neta (NMV) se recupera a su estado fundamental en la dirección de B0. Otras dos formas de relajación son el tiempo de relajación T2 (relajación spin-spin) y la relajación T2\*. La capacidad de los GBCA para acortar selectivamente la relajación T1 dentro de una lesión en comparación con el tejido normal es la base para el uso más comúnmente aplicado de los agentes de contraste en la práctica clínica.

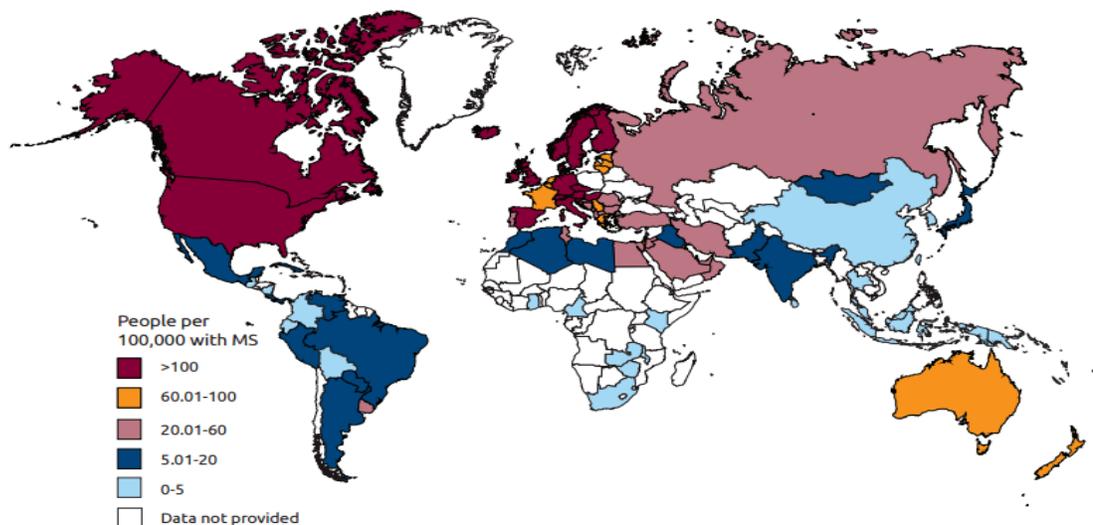
Uno de los GBCA aprobados, "MultiHance", interactúa débil y transitoriamente con la albúmina sérica in vivo. Esta interacción reduce la velocidad de rotación molecular del complejo, lo que lo acerca a la frecuencia de resonancia de las

moléculas de agua a la intensidad de campo en la que se toman imágenes (Kanal, Maravilla, & Rowley, 2014).

### 1.3 Epidemiología de la EM

La distribución de la esclerosis múltiple a nivel mundial es irregular. Existe una mayor frecuencia de casos en zonas alejadas del Ecuador, entre los 40 y 60 grados de latitudes norte y sur. Las zonas geográficas de riesgo alto son aquellas con 30 o más casos por 100,000 habitantes; de riesgo medio de 5 a 25, y de bajo riesgo de 5 o menos casos por 100,000 habitantes (Kurtzke, Hyllested, y Heltberg, 1995).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha alertado sobre un incremento de la incidencia de EM en la población mundial, que aumentó de 30 casos por 100,000 habitantes en 2008 a 33 casos por 100,000 en 2013 (OMS). Las regiones con mayor prevalencia son Europa (80 casos por 100,000), Estados Unidos y Canadá, seguido por Australia, Nueva Zelanda, Rusia y el Mediterráneo Oriental. Con riesgo medio se encuentran México, algunos países de América del Sur, Argelia, Libia, India y Mongolia, como se muestra en la Fig. 1 (Browne y col. 2014).



**Figura 1.** Prevalencia por país de la esclerosis múltiple.

La EM es más común en mujeres que en hombres, en proporción 2:1. El diagnóstico se realiza entre los 20 y 40 años de edad, y en promedio se presenta una discapacidad seria después de 15 años del diagnóstico.

#### **1.4 Tratamiento de la EM**

Existen tres tipos de medicamentos empleados en la (EM): (1) los que modifican el curso de la enfermedad, (2) los utilizados para tratar las recaídas (exacerbaciones) y (3) los empleados para controlar los síntomas.

##### *Medicamentos modificadores del curso de la enfermedad.*

Los siguientes medicamentos han sido aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para la EM, pues han demostrado en ensayos clínicos que reducen el número de recaídas, retrasan la progresión de la discapacidad y limitan la aparición de nuevas lesiones en la RM. Los medicamentos se administran por vía parenteral, vía oral y por infusión.

##### 1. Medicamentos inyectables

- Interferón beta-1a
- Interferón beta-1b

Existen varios mecanismos de acción del IFN $\beta$ , que tienen efectos en múltiples niveles de la función celular. Por un lado, el IFN $\beta$  parece actuar incrementando la expresión y concentración de agentes antiinflamatorios mientras reduce la expresión de citoquinas proinflamatorias. Entre otros efectos, esto puede reducir el tráfico de células inflamatorias a través de la barrera hematoencefálica y aumentar la producción del factor de crecimiento nervioso (NGF), que aumenta la supervivencia y reparación neuronal. Asimismo, el IFN $\beta$  también puede aumentar el número de células NK CD56+ en sangre, que producen mediadores antiinflamatorios. Finalmente, se ha sugerido una participación viral en la

etiopatogenia de la EM, por lo que la acción antiviral del IFN $\beta$  es otro posible mecanismo de acción (García & Lorente, 2002; Kieseier, 2011; Abdolvahab, Mofrad, & Schellekens, 2016).

- Acetato de glatiramer

Modifica varios procesos inmunes: induce la proliferación de las células T supresoras; establece enlaces promiscuos de alta afinidad al MHC en las células presentadores de antígeno (CPA) para evitar presentación de antígenos del SNC; induce un cambio Th1-Th2 en las respuestas de las células T a través de los “cluster of differentiation” (CD) y promueve la migración de células Th2 al SNC. Inhibe las respuestas de células T específicas de MBP. Puede ejercer efectos neurotróficos directos y promover remielinización por inducción de Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Prod’homme & Zamvil, 2018)

- Daclizumab (se retiró del mercado mundial el 2 de marzo de 2018).

## 2. Medicamentos orales

- Teriflunomida

El metabolito activo es la leflunomida, es similar al dimetil fumarato. La leflunomida, utilizada por primera vez para artritis reumatoide, se convierte en teriflunomida de una manera no enzimática en el plasma o mucosa intestinal. La teriflunomida inhibe de forma selectiva y reversible la dihidroorotato deshidrogenasa, enzima mitocondrial clave en la síntesis de novo de pirimidina. Esto reduce la proliferación de linfocitos T y B activados sin causar muerte celular. Deteriora la formación de sinapsis inmunológica y disminuye la liberación de IL-6, IL-8 y MCP-1 de los monocitos (Bar-Or y col. 2014; Kasarekto y col. 2017)

- Fingolimod

El fingolimod se une a los receptores esfingosina 1 fosfato (S1P), causando retención de células linfoides en el tejido linfoide secundario. Al prevenir la salida de linfocitos autoagresivos de los tejidos linfoides, se reduce su infiltración en el SNC y disminuye la inflamación del tejido (Chun & Hartung, 2010). Asimismo,

actúa sobre el SNC promoviendo la neuroprotección y reparación al proteger a los oligodendrocitos de las lesiones y modular la remielinización.

- Dimetil fumarato (DMF)

Los primeros experimentos con DMF se hicieron para el tratamiento de la psoriasis. Los datos importantes fueron obtenidos por de Jong y col. (1996), quien observó que el metabolito principal de la DMF es el fumarato de monometilo (MMF), el cual actúa sobre las células mononucleares y células T, incrementando la producción de IL-4 e IL-5, incluso después de la estimulación. Esto induce un cambio de respuesta inmune de Th1 hacia Th2. La DMF produce disminución en el número de linfocitos circulantes, especialmente CD8+ e induce apoptosis de las células T activadas in vitro y de monocitos derivados de células dendríticas. Asimismo, induce la activación de la vía dependiente del factor nuclear E2 que aumenta la síntesis de enzimas antioxidantes, lo que disminuye el daño de la mielina en el SNC y ejerce una acción neuroprotectora. (Kasarekto y col., 2017)

### 3. Medicamentos infundidos

- Alemtuzumab

Es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 que se une a CD52, un antígeno que se expresa en la superficie de las células T, células B, células NK, monocitos y células dendríticas. El mecanismo de acción de alemtuzumab en la EM es complejo, e incluye la actividad citotóxica contra los linfocitos por vías dependientes de complemento y anticuerpos, lo que reduce significativamente el número de células T y B circulantes. Asimismo, parece haber un aumento de células T reguladoras y disminución de células T de memoria, lo que se ha señalado como el mecanismo más probable que explica la eficacia prolongada en la EM. Finalmente, los linfocitos que aparecen después del tratamiento con alemtuzumab secretan niveles elevados del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), con posible efecto neuroprotector (Ontaneda & Cohen, 2013).

- Mitoxantrona

Es un antineoplásico que se intercala con el ADN y rompe las cadenas sencillas y dobles. Inhibe la reparación del ADN mediante la inhibición de la enzima ADN topoisomerasa II. Es citotóxico para los linfocitos T y B activados. Finalmente, modula la actividad de los astrocitos e induce la proliferación de células T supresoras (Bar-Or y col. 2014)

- Ocrelizumab

Es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el antígeno CD20. La unión a CD20 produce lisis de linfocitos B mediada por complemento y/o citotoxicidad dependiente de anticuerpo. La disminución de los linfocitos modula la respuesta inmune. (Jakimovski y col. 2017).

- Natalizumab

Es un anticuerpo monoclonal humanizado anti- $\alpha$ 4 integrina; se une a la subunidad  $\alpha$ 4 de las integrinas  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 y  $\alpha$ 4 $\beta$ 7, bloqueando la unión a sus receptores endoteliales MadCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) y VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1). En consecuencia, el natalizumab inhibe el paso de los linfocitos inmunoreactivos de la sangre al cerebro y la médula espinal (Frohman y col. 2006; Rommer & Zettl, 2018).

### *Manejo de recaídas*

Las recaídas de la EM son causadas por la inflamación aguda en el sistema nervioso central que daña la capa de mielina alrededor de las fibras nerviosas. Este daño retarda o interrumpe la transmisión de los impulsos nerviosos y causa los síntomas de la esclerosis múltiple. La mayoría de las recaídas se resolverán gradualmente sin tratamiento. Para las recaídas graves (que incluyen por ejemplo pérdida de la visión, debilidad severa o falta de equilibrio), que interfieren con la movilidad, la seguridad o la capacidad general de una persona para funcionar, se utilizan corticosteroides intravenosos en dosis altas por 3 a 5 días para reducir la

inflamación. Este régimen puede o no seguirse de la prednisona oral que gradualmente se va disminuyendo.

### *Manejo de la sintomatología*

Se utiliza una amplia variedad de medicamentos para ayudar a controlar los síntomas de la EM, que son muy variados y pueden incluir:

- Fatiga
- Dificultad para caminar
- Espasticidad
- Temblores
- Dolor
- Mareos y vértigo
- Problemas de vejiga
- Disfunción intestinal
- Infección
- Depresión
- Cambios emocionales
- Hormigueo
- Problemas sexuales

### **1.5 Etiología de la EM**

A pesar de numerosas investigaciones sobre las causas de la EM a lo largo de varias décadas, la etiología de la enfermedad sigue siendo desconocida, si bien se acepta que intervienen en ella tanto factores ambientales como factores genéticos.

La predisposición genética a la EM sólo explica una fracción del riesgo de la enfermedad; el estilo de vida y los factores ambientales son clave que contribuyen

al riesgo de desarrollar la enfermedad. Es importante destacar que estos factores no genéticos pueden influir en las vías patogénicas, y algunos de ellos pueden modificarse.

En lo que se refiere a la predisposición genética, se ha señalado al complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés), específicamente HLA-DRB1 y sus variantes con más de 59 locus (20 ya reconocidos y 39 nuevos) como los responsables de la susceptibilidad de algunos individuos (Sawcer y col., 2011). Además, se han identificado genes inmunológicamente relevantes con los locus de diferenciación de los linfocitos T-helper (LTh) relacionados con la patogénesis de la EM.

Además de los factores genéticos, la relación con uno o más agentes ambientales pueden predisponer al desarrollo de la EM, tales como la radiación solar ultravioleta, los niveles de vitamina D, las vacunas, los solventes orgánicos, el consumo de tabaco, el clima húmedo, el clima frío y el estrés (Ascherio, Munger, y Simon, 2010).

Se ha relacionado el hábito del tabaquismo con un aumento en la frecuencia de recaídas y del número de lesiones cerebrales activas en la RMN de los pacientes con EM. Se han propuesto mecanismos de regulación epigenética para explicar tal asociación, al analizar la sangre de adolescentes cuyas madres fumaron durante su embarazo; la exposición prenatal al tabaco se asocia con una mayor metilación del promotor del “brain derived neurotrophic factor” (BDNF), el cual promueve la diferenciación y crecimiento de nuevas células neuronales. En otro estudio analizaron el patrón de metilación del ADN, mediante técnicas de PCR, encontraron alteraciones en la metilación del ADN en 25 genes de los no fumadores y en 438 genes de los fumadores (Zulet y col., 2017).

La relación de la vitamina D con la EM está sustentada en un estudio con enfermeras estadounidenses que encontró que las que tomaron suplementos alimentarios con más de 400 unidades internacionales (UI) de vitamina D por día tuvieron un riesgo 40 por ciento menor a desarrollar EM que las que no usaron esos suplementos (Munger y col., 2004). La vitamina D es capaz de provocar

cambios epigenéticos como se comprobó al analizar los efectos de la 1,25(OH)2D3 (forma activa de la vitamina D producida en la piel tras la exposición a luz ultravioleta) en la producción humana de IL-17A mediante células T CD4+. La 1,25(OH)2D3 inhibe directamente el *locus* del IL-17 responsable de la transcripción de las citoquinas proinflamatorias mediante una modificación de la histona deacetilasa 2 (HDAC2) en la región promotora del IL17A (Zulet y col., 2017).

### **1.6 La posible relación de la EM con infecciones virales**

Entre los factores ambientales que pueden contribuir a la aparición de la EM se ha mencionado la participación de agentes infecciosos, sobre todo, los siguientes virus (Cermelli y Jacobson, 2000):

- virus varicela zoster (VVZ),
- virus Epstein Barr (VEB),
- virus herpes simple tipos 1 y 2 (VHS1, VHS2),
- citomegalovirus,
- virus herpes humano tipos 6, 7 y 8 (VHH).

Los virus herpes pueden permanecer latentes y producir infecciones recurrentes con exacerbaciones periódicas, como el VHS1 que produce el típico “fuego labial” y el VVZ, responsable de la varicela durante la niñez y de herpes zoster en adultos mayores y pacientes inmunosuprimidos. Algunos virus herpes son neurotrópicos, particularmente los del subgrupo alfa-herpes virus, como los VHS y el VVZ (Perez-Cesari, Saniger, y Sotelo, 2005).

El antecedente de infección por el VVZ durante la niñez es uno de los hallazgos más relevantes en la historia clínica de los pacientes con EM. Se ha descrito la presencia del DNA de VVZ en células de mononucleares de sangre periférica (CMNSP) cuando el paciente cursa con un brote agudo, que

desaparecen durante la remisión (Ordoñez y col., 2004). Subsecuentemente el DNA del VVZ fue encontrado en CMNSP de la mayoría de los pacientes durante la fase de brote, sin la presencia de otros virus herpes, en un grupo mayor de pacientes (Sotelo y col., 2007). Estos resultados fueron corroborados por otro grupo de investigación que detectó ADN de VVZ por PCR convencional en el LCR de pacientes en fase de brote (Mancuso y col., 2007).

La participación del VVZ en la patogenia de la EM es aún motivo de debate. Mientras un estudio similar en cuatro pacientes con EM en brote encontró el VVZ como antígeno relevante (Burgoon y col., 2009), otro estudio reportó que el antecedente de infección por zoster es más común en las personas con EM que en la población general (Manouchehrinia y col., 2017). Recientemente, se ha encontrado ADN del VVZ en células sanguíneas mononucleares de 80 pacientes con EM (Najafi y col., 2016), y se reportaron títulos significativamente más altos de IgG anti-VVZ en el suero de 800 pacientes con EM en comparación con 1,000 individuos sanos (Karampoor y col., 2017). Además, un estudio realizado a nivel nacional en la población taiwanesa mostró que la incidencia de la EM se correlaciona con la activación del herpes zoster (Kang y col., 2011).

## **1.7 Propiedades del VVZ**

El VVZ tiene un genoma de ADN de doble cadena lineal, de aproximadamente 125,000 pares de base (pb), que codifica al menos 70 marcos de lectura abiertos (open reading frames, ORF). El VVZ tiene una región larga fija (UL) unida covalentemente a una región genómica corta (S) compuesta por un par de secuencias repetidas invertidas que unen un segmento corto único (US) (Zerboni y col., 2014).

Los genes del VVZ se han designado como genes inmediatamente tempranos, genes tempranos y genes tardíos. Las proteínas codificadas por los genes inmediatamente tempranos actúan como reguladores de la transcripción, mientras que las producidas por los genes tempranos están involucradas principalmente en

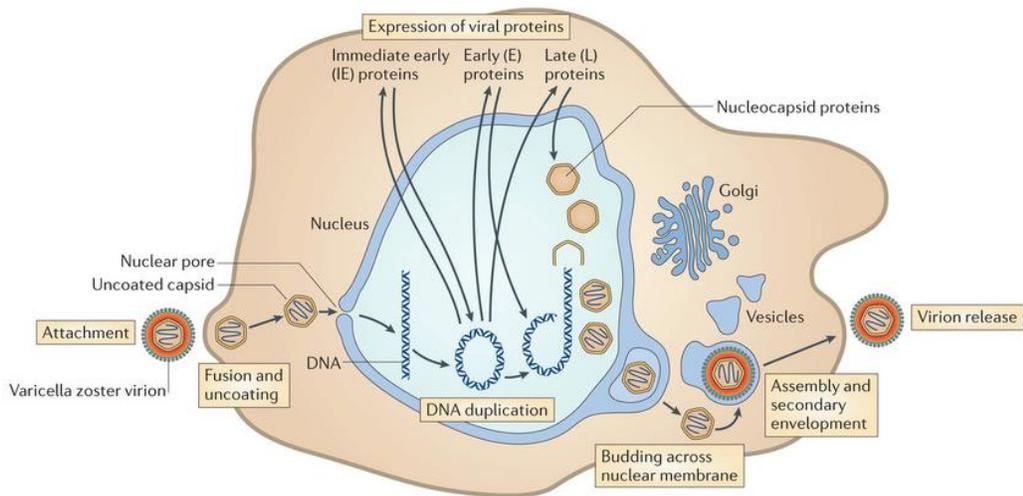
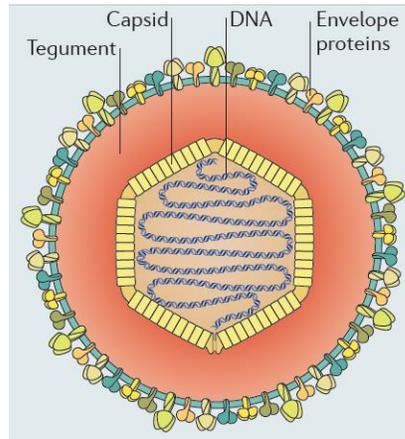
la replicación del ADN y los genes tardíos codifican proteínas estructurales que son cruciales para la formación y salida de viriones (Depledge, Sadaoka, & Ouwendijk, 2018).

De los 70 ORFs conocidos, 11 codifican para glicoproteínas. Estas proteínas están unidas a la membrana y se encuentran glucosiladas a través de azúcares unidos a N- u O- y se sabe que muchos son incorporados a la envoltura de los viriones del VVZ (Oliver, Yang, & Arvin, 2016).

La glicoproteína gB se une a proteoglicanos de heparán sulfato en la superficie celular (Jacquet y col., 1998) y participa en la entrada del VVZ a la célula huésped. La gC no es necesaria para el crecimiento del virus *in vitro* (Cohen y Seidel, 1994). La gH facilita la propagación del virus de célula a célula (Rodríguez y col., 1993). La gL actúa como chaperona para el transporte de gH a la superficie celular (Duus y col., 1995). La gl forma un complejo con gE y aunque no se requiere gl para la replicación del VVZ en algunas células, se requiere gl para la replicación de VVZ en células Vero, células T y células de piel de humano (Cohen y Nguyen, 1997; Moffat y col., 2002).

La gK es necesaria para la replicación del VVZ y puede tener un papel en la formación de sincitios (Mo y col., 1999), mientras que gM es importante para la propagación de célula a célula (Yamagishi y col., 2008).

Las partículas de VVZ tienen 80-120 nm de diámetro (figura 2). El genoma se empaqueta en la nucleocápside icosaédrica formada a partir de proteínas codificadas por orf20, orf21, orf23, orf33, orf40 y orf41 (Zerboni y col., 2014). Los componentes externos del virión se localizan en una envoltura de membrana lipídica, que deriva de la membrana celular, con glicoproteínas víricas incorporadas.



**Figura 2.** Estructura y ciclo de vida del virus varicela zoster.

Las partículas envueltas del VVZ ingresan a las células por unión a receptores de la membrana plasmática, se fusionan y liberan las proteínas del tegumento. Las cápsides ya sin envoltura se unen a los poros nucleares, donde el DNA es inyectado dentro del núcleo. Los genes inmediatos tempranos son expresados, seguidos de los genes inmediatos y por último los tardíos. Se ensambla la nucleocápside y el DNA genómico empaquetado se dirige hacia la membrana nuclear interna y surge a través de la membrana nuclear. Las cápsides entran al

citoplasma, las glicoproteínas virales son sintetizadas en el retículo endoplásmico, la maduración se lleva a cabo en la región trans del Golgi y las proteínas del tegumento se ensamblan en vesículas; las cápsides experimentan una envoltura secundaria y son transportadas a la superficie celular donde las partículas virales son liberadas.

## **2. Justificación**

Diversos grupos de investigación, incluyendo el grupo Cinvestav/INNN han sugerido la asociación del VVZ con la EM. En los pacientes mexicanos con EM en brote este último grupo ha identificado el VVZ en el LCR y en las células mononucleares de los pacientes. Se desconoce, sin embargo, si los VVZ identificados en el LCR de pacientes con EM en los primeros días de brote son infectivos. La determinación de la infectividad del VVZ sería la base para analizar su papel en el desarrollo de la enfermedad.

## **3. Hipótesis**

El LCR de pacientes con EM en fase de brote contiene VVZ infectivos.

## **4. Objetivo general**

Determinar si las partículas virales presentes en el LCR de pacientes con EM durante los primeros días de brote son infectivas.

### **4.1 Objetivos específicos**

1. Confirmar la presencia del VVZ en LCR de pacientes con EM.
2. Determinar la infectividad de estos virus en cultivos celulares permisivos

## **5. Material y Métodos**

### **5.1 Población de estudio**

Se colectaron muestras de LCR de cinco pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) con diagnóstico clínico de EM tipo brote-remisión en los primeros días de brote. Asimismo, se colectaron muestras de LCR de cinco pacientes con enfermedades neurológicas no desmielinizantes, que fueron utilizadas como control. El LCR se extrajo en condiciones de asepsia por punción lumbar por un médico capacitado. Se explicó al paciente el procedimiento y se le mantuvo en decúbito por 90 minutos para evitar cefalea post-punción. Se anotaron los parámetros clínicos de los pacientes (antecedentes médicos, personales, patológicos, infecciosos, nutricionales).

Todos los pacientes fueron notificados del objetivo del proyecto y firmaron el consentimiento informado de su participación en el estudio. El estudio se considera de riesgo mínimo y fue aprobado por el Comité de Ética del INNN y del Cinvestav.

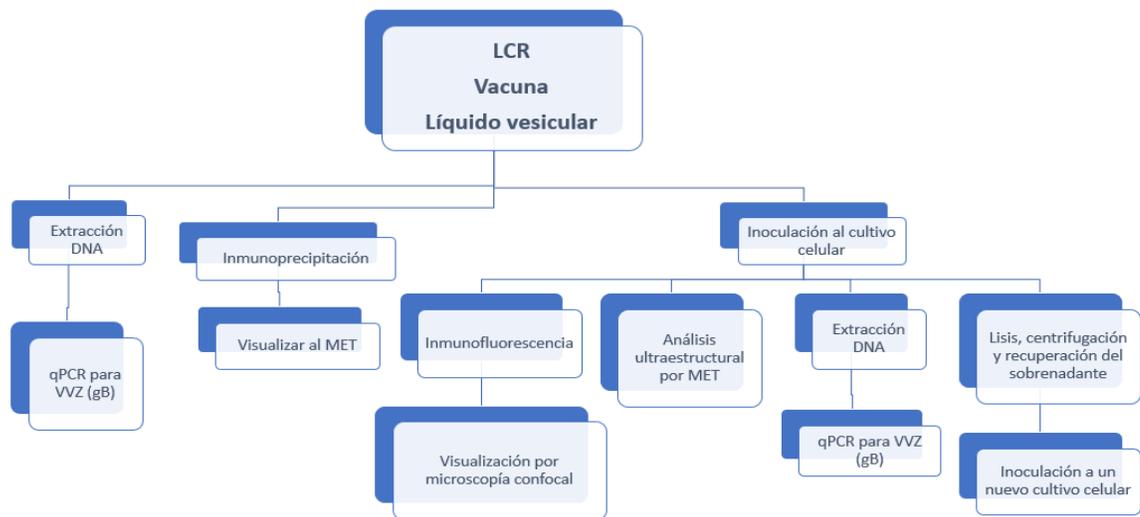
### **5.2 Criterios de inclusión**

1. Confirmación de diagnóstico de EM tipo brote-remisión de acuerdo a los criterios de McDonald.
2. Pacientes en los primeros ocho días de brote, definido como la presencia o empeoramiento de síntomas de disfunción neurológica con más de 24 h de duración (Confavreux y col., 2000).
3. Pacientes que autorizaron participar en el estudio una vez que les fue explicado el proyecto y otorgaron consentimiento informado.

### 5.3 Criterios de exclusión

1. Pacientes con más de 8 días de evolución del brote.
2. Pacientes con tratamiento inmunosupresor o antiviral.
3. Antecedentes de enfermedades autoinmunes.
4. Pacientes que no aceptaron participar en el estudio.

Se siguió el siguiente esquema general de trabajo (Figura 3):



**Figura 3.** Esquema general de trabajo.

### 5.4 Extracción y cuantificación del ADN del VVZ en la vacuna cepa OKA y en el LCR de pacientes con EM

La presencia de ADN de VZV se buscó y cuantificó (cuantificación absoluta) en la vacuna cepa OKA y en el LCR de los pacientes mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR, ver Apéndice Protocolos). El LCR se obtuvo mediante punción lumbar.

## **5.5 Identificación del VVZ por microscopía electrónica**

Los VVZ presentes en la vacuna OKA y en los LCRs de pacientes con EM en brote fueron inmunoprecipitados con tres anticuerpos comerciales dirigidos contra las proteínas gB, gI y gE del VVZ. La pastilla obtenida después de la inmunoprecipitación fue sometida a tinción negativa para su observación por microscopía electrónica de transmisión y los VVZ presentes en el líquido vesicular de un paciente con herpes zoster se procesó para su observación por microscopía electrónica de barrido (ver Apéndice Protocolos).

## **5.6 Cultivos celulares**

Dada la especificidad del VVZ por células humanas, se ensayó la infectividad del VVZ presente en la vacuna OKA y en el LCR de pacientes con EM en brote en diversos cultivos celulares. Los detalles del método de cultivo se encuentran en el Apéndice Protocolos.

### **5.6.1 Fibroblastos**

Origen: Instituto Nacional de Rehabilitación de la Secretaría de Salud

Organismo: Homo sapiens, humano

Tejido: piel

Morfología: epitelial

Propiedades de crecimiento: adherente

### **5.6.2 Células VERO C1008 [Vero 76, clone E6, Vero E6] (ATCC® CRL-1586™)**

Organismo: *Cercopithecus aethiops*

Tejido: riñón

Edad: adulto

Morfología: epitelial

Propiedades del crecimiento: adherente

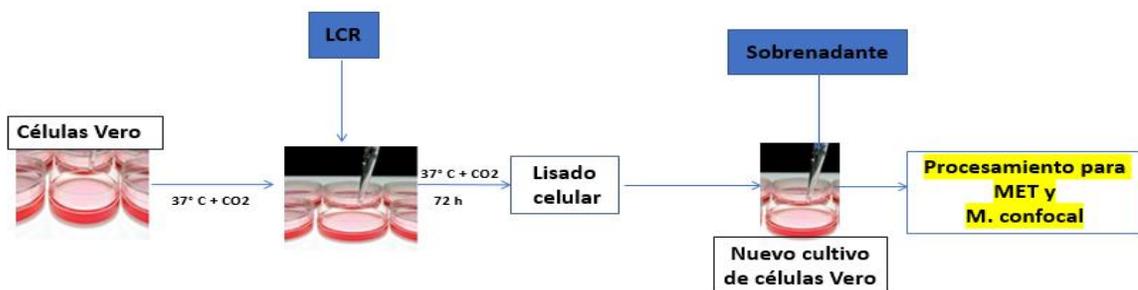
Las células Vero E6 son células epitelioideas derivadas del riñón de mono verde africano. Son preferidas para el aislamiento y/o propagación de varias familias de virus debido a 3 características principales (Prescott y col., 2010):

- Son susceptibles de infección por diversos virus debido a un repertorio abundante de receptores
- Han mantenido una deleción genética que elimina el locus del IFN tipo I (Emeny & Morgan, 1979)
- Codifican un factor regulador de interferón 3 (IRF3, por sus siglas en inglés), factor de transcripción necesario para generar respuestas a la infección del virus (Chew y col., 2009).

Esta línea es una clona de las células VERO (ATCC CRL-1587), que fue clonada mediante el método de dilución en placas de microtitulación en 1979 por P.J. Price.

### 5.7 Propagación del VVZ presente en el LCR

Dada la escasa cantidad de VVZ encontrada en algunas muestras de LCR de pacientes con EM en brote, se decidió propagar al VVZ para inocular cultivos frescos con los virus propagados de estas muestras. La estrategia experimental se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Esquema de propagación e infectividad

### **5.8 Análisis de las interacciones de los cultivos celulares con la vacuna OKA, con los LCRs de pacientes con EM en brote y con los LCR de pacientes controles por microscopía electrónica de transmisión**

Las interacciones de los distintos cultivos celulares con la vacuna OKA, el LCR de pacientes con EM en brote y el LCR de pacientes con otras enfermedades no inflamatorias fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión, de acuerdo con el protocolo presentado en el Apéndice Protocolos.

### **5.9 Análisis de las interacciones de los cultivos celulares con la vacuna OKA, con los LCRs de pacientes con EM en brote y con los LCR de pacientes controles por microscopía confocal**

Dada la cinética de transcripción genómica del VVZ, para probar la capacidad de infección y de replicación de los VVZ en el LCR de pacientes con EM en brote, identificamos dos importantes proteínas virales en los cultivos inoculados con virus propagados e incubados durante 72 h, con la metodología descrita en el Apéndice de Protocolos.

En primer lugar, buscamos a la IE62, una proteína no estructural de transcripción temprana, cuya presencia indicaría la transcripción de proteínas virales en la célula huésped, y con ello, revelaría la capacidad de infección de los virus presentes en el LCR de los pacientes con EM en brote.

En segundo lugar, analizamos la presencia de gB, una proteína estructural del VVZ, cuya presencia en los cultivos infectados con virus propagados sugieren fuertemente que el virus presente en el LCR de pacientes con EM en brote se ha integrado al genoma de la célula huésped, que es capaz de producir esta proteína de transcripción tardía en la infección del VVZ.

## **6. Resultados**

### **6.1 Identificación del ADN del virus varicela-zoster en el LCR de pacientes con esclerosis múltiple**

Se llevó a cabo la extracción del ADN del LCR de diez pacientes: cinco pacientes con diagnóstico de EM remitente-recurrente en los primeros ocho días de exacerbación, y cinco pacientes con una enfermedad neurológica diferente a la EM (controles). El ADN obtenido por el método de Qiagen se analizó en el espectrofotómetro Nanodrop ND-2000 (Thermo) para confirmar la pureza (entre 1.6 y 2 en la relación de absorbancia A 260/280) y determinar su concentración. Las muestras fueron visualizadas en geles de agarosa al 1% para observar su integridad (datos no mostrados). Debido al tipo de muestra las concentraciones del ADN obtenido fueron pequeñas por lo que no pudieron observarse en el electroferograma. Las muestras de ADN se distribuyeron en alícuotas de 100 ng y se almacenaron a -20°C. Se utilizó la PCR en tiempo real, previamente estandarizada, para la identificación y cuantificación del número de copias del VVZ, en donde se amplificó un producto de 66 pb que corresponde a un fragmento del gen gB que codifica a una glicoproteína estructural del VVZ.

En el grupo de pacientes con EM en brote, tres fueron hombres y dos mujeres, con media de edad de 27 años. De acuerdo al grado de discapacidad (Expanded Disability Status Scale, EDSS), cuatro pacientes presentaron discapacidad mínima de tallo cerebral y de fuerza, mientras que el paciente 2 tuvo tan sólo alteración en los movimientos oculares. Todos ellos se encontraban en los primeros ocho días de brote. El análisis por qPCR reveló gran cantidad de copias del VVZ en el LCR de tres pacientes (LCR 1, LCR 2 y LCR 5) y menor cantidad en los otros dos (LCR 3 y LCR 4) (Tabla 1).

El grupo “control” de pacientes con padecimientos neurológicos diferentes a la EM estuvo constituido por cuatro mujeres y un hombre. Al analizar por qPCR la

amplificación del gen gB, tal como se esperaba, no se encontraron copias del VVZ en ninguna de las cinco muestras de LCR de este grupo (tabla 2).

**Tabla 1.** Características clínicas y detección por qPCR del VVZ en el LCR de pacientes con EM en brote

No. de Paciente	Sexo	Edad (años)	Varicela /edad de infección	EDSS	Inicio de brote (días)	VVZ (copias/ml)
1	F	29	+ / 2	2	6	37,637
2	F	16	+ / 6	1	3	74,985
3	M	25	+ / 15	2.5	8	701
4	F	37	+ / 10	2.5	5	1,221
5	M	30	+ / 6	2	3	10,845

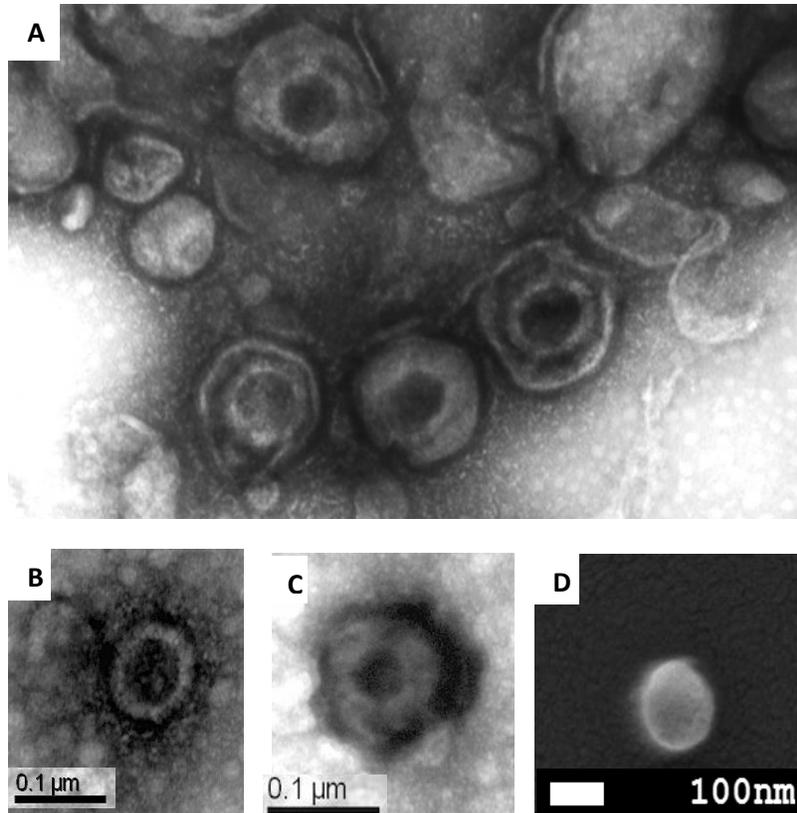
**Tabla 2.** Características clínicas y detección por qPCR del VVZ en LCR de pacientes con otros padecimientos neurológicos

No. de Paciente	Sexo	Edad (años)	Diagnóstico	VVZ (copias/ml)
1	F	72	Estenosis cervical espinal	0
2	F	39	Hidrocefalia	0
3	F	39	Cefalea persistente	0
4	M	61	Parálisis facial	0
5	F	30	Parálisis facial	0

## 6.2 Caracterización ultraestructural del virus varicela-zoster

Se realizó el análisis por microscopía electrónica de dos fuentes de VVZ: 1) virus presentes en la vacuna OKA y 2) virus obtenidos del líquido vesicular de lesiones

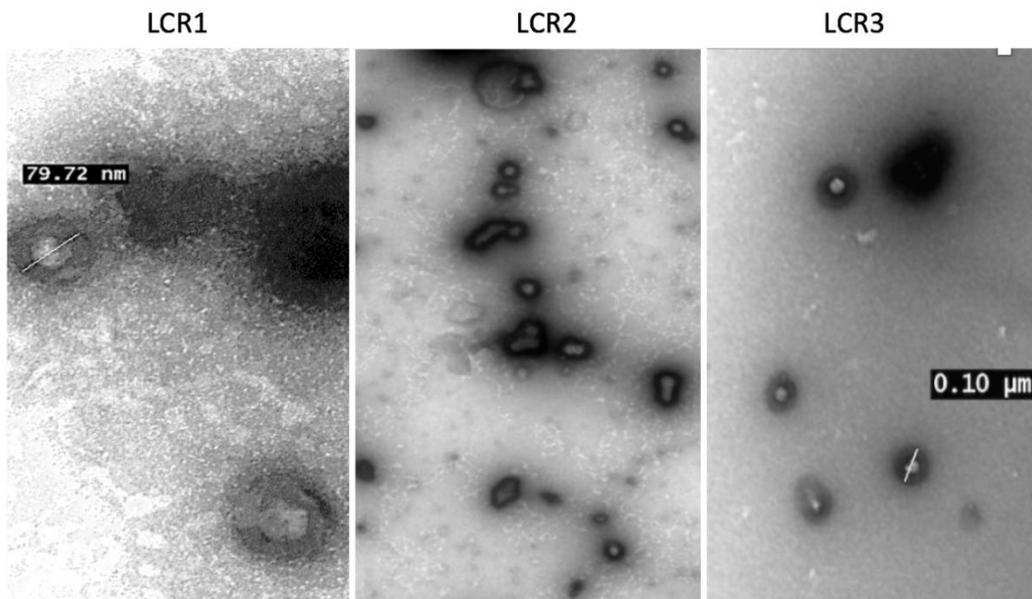
de piel de un paciente con herpes zoster. Las muestras se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-gB, anti-gE y anti-gI del VVZ y se realizó tinción negativa para su observación en el microscopio electrónico de transmisión (MET). Además, el VVZ contenido en el líquido vesicular de un caso de herpes zoster se observó por microscopía electrónica de barrido (MEB).



**Figura 5.** Microfotografías electrónicas del VVZ. MET (A, B, C), MEB (D). VVZ de la vacuna OKA (A, B). VVZ el líquido vesicular de un paciente con herpes zoster (C, D).

### 6.3 Visualización del virus varicela-zóster en el LCR de pacientes con esclerosis múltiple por microscopía electrónica de transmisión

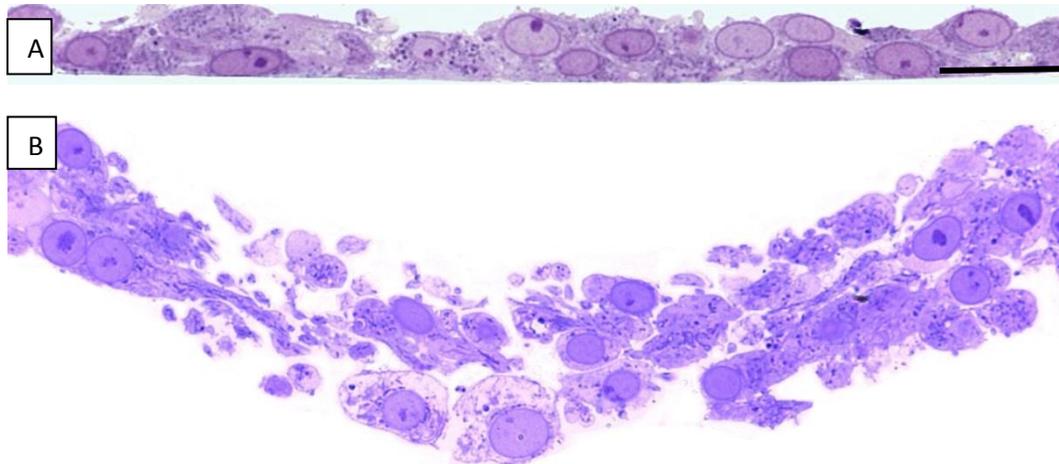
En las cinco muestras de LCR de pacientes con EM en los primeros días de la fase de brote se visualizaron cantidades variables de virus con forma y tamaño característicos de los virus herpes (Figura 6). En vista que estas partículas fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos anti VVZ, se considera que las imágenes representan el virus herpes zoster.



**Figura 6.** Microscopía electrónica de transmisión de LCRs inmunoprecipitados con anticuerpos anti-gB, anti-gE y anti-gI del VVZ y procesados por tinción negativa.

#### 6.4 Efecto citopático del LCR de pacientes con esclerosis múltiple en fibroblastos humanos de piel

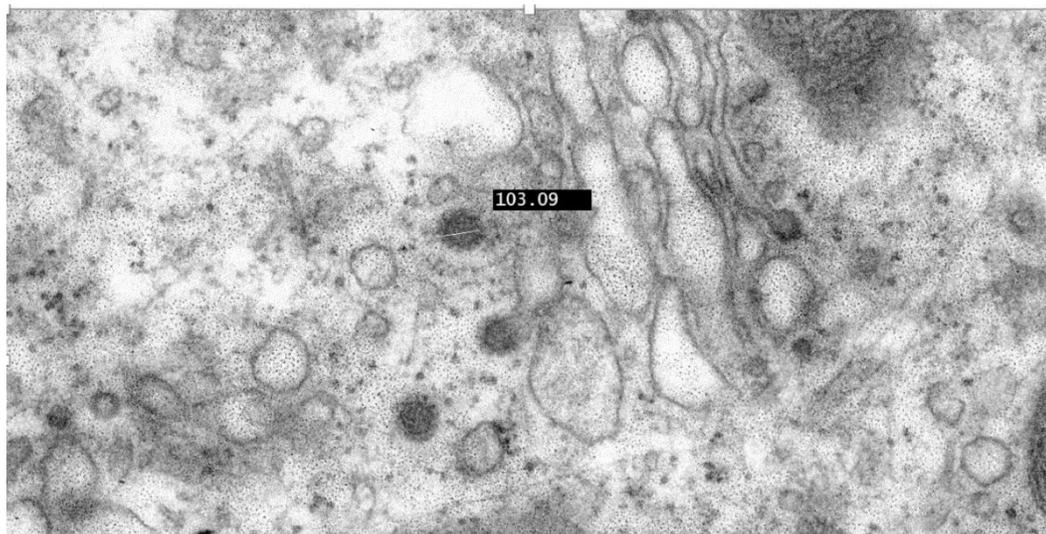
Al término de 72 h de incubación de cultivos de fibroblastos de piel humana con el LCR de pacientes con EM en fase de brote se observó un acentuado efecto citopático, manifestado por desorganización de la monocapa y aumento de tamaño o fragmentación de las células. La incubación de los cultivos de fibroblastos con el LCR de pacientes con otros padecimientos neurológicos no produjo efecto citopático. Los cambios son evidentes al analizar por microscopía óptica los cortes de los cultivos teñidos con hematoxilina y eosina se observan en la figura 7, donde se compara la apariencia de un cultivo incubado con el LCR de un paciente control (Fig. 7A) con un cultivo incubado 72 h con el LCR del paciente 1 con EM en los primeros 8 días de brote (Fig. 7B). Cambios similares fueron observados con los LCR 2, LCR 3 y LCR 4 de pacientes con EM.



**Figura 7.** Cortes semifinos de fibroblastos humanos de piel, microscopía óptica. (A) fibroblastos humanos de piel incubados con el LCR de un paciente con un padecimiento neurológico diferente a la EM; (B) fibroblastos inoculados con el LCR 1 de un paciente con EM. Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

### 6.5 Análisis por microscopía electrónica de fibroblastos incubados con LCR de pacientes con esclerosis múltiple

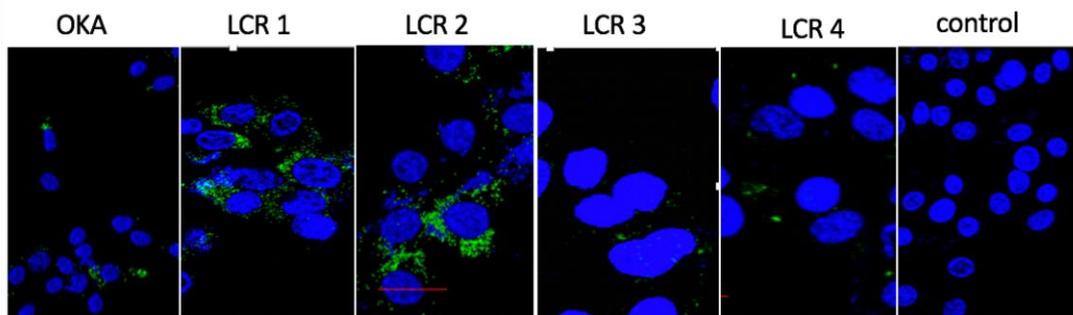
Se inocularon cultivos de fibroblastos humanos de piel con los LCRs de cuatro pacientes con EM en fase de brote y se incubaron 72 h para su procesamiento y observación por MET. Una vez delimitadas las zonas de interés de los cortes semifinos vistos en el microscopio óptico, se procedió a realizar los cortes finos los cuales se colocaron en rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo en etanol y plomo para su observación en el MET. En la figura 8 se muestra la presencia de partículas, con tamaño y morfología semejantes a los virus herpes, en las células inoculadas con el LCR 1 de un paciente con EM.



**Figura 8.** Microfotografía electrónica de transmisión de fibroblastos humanos de piel incubados 72h con el LCR 1 de un paciente con EM.

## 6.6 Identificación de la glicoproteína gB en fibroblastos humanos incubados con LCR de pacientes con esclerosis múltiple por microscopía confocal

El análisis con el microscopio confocal de cultivos de fibroblastos humanos tratados con el anticuerpo contra la glicoproteína gB del VVZ e identificado con un segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína mostró positividad en la región perinuclear en cultivos que habían sido incubados con la vacuna OKA (Fig. 9 A) y con los LCRs de cuatro pacientes con EM (Fig. 9 B-E). Los LCRs de los pacientes 1 y 2, que tenían mucho mayor número de copias del VVZ en nuestro análisis por qPCR, mostraron clara positividad, mientras que ésta fue más discreta con fibroblastos incubados con los LCR 3 y LCR 4, que mostraron un menor número de copias de VVZ por qPCR.

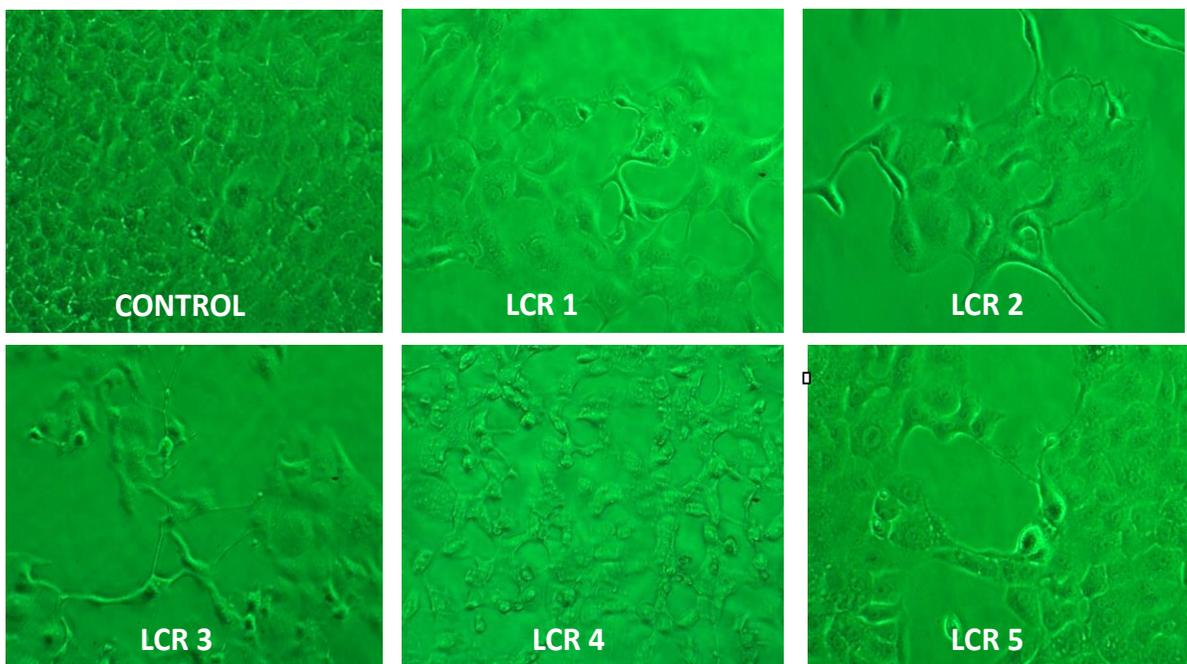


Fibroblastos humanos

**Figura 9.** Microscopía confocal de los fibroblastos humanos de piel incubados 72 hpi. A) fibroblastos inoculados con la vacuna OKA, fibroblastos inoculados con el LCR 1 (B), LCR 2 (C), LCR 3 (D) y LCR 4 (E) de pacientes con EM en brote, y con el LCR 1 (F), de un paciente con otro padecimiento neurológico como control.

### 6.7 Microscopía óptica del efecto citopático en células Vero E6 incubados con sobrenadantes de cultivos previamente inoculados con LCR de pacientes

Al propagar el VVZ presente en el LCR de los pacientes con EM en fase de brote e inocular a un nuevo cultivo celular encontramos un efecto citopático bien definido en todas las muestras (Figura 10). En contraste con los cultivos inoculados con el LCR de los controles (Fig. 10 A), no se observaron cambios en la morfología de la monocapa celular, mientras que en los cultivos inoculados con virus propagados del LCR de pacientes en brote se observaron células aumentadas de tamaño, células fusionadas formando agrupaciones de células multinucleadas lo que se conoce como sincitios, la cual es una característica de la infección por VVZ y células desprendidas de la caja de cultivo (Fig. 10 B-F).



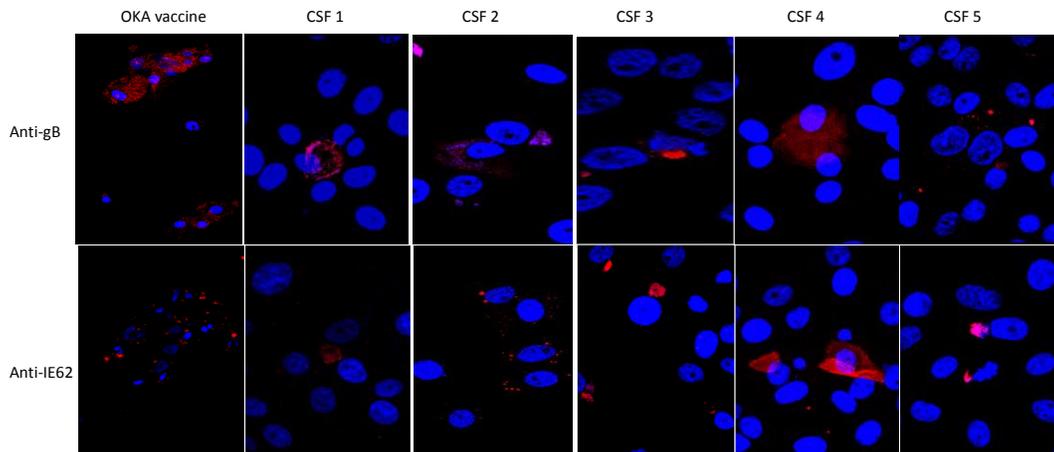
**Figura 10.** Microscopía óptica de las células Vero E6 incubas 72 hpi. Los cultivos celulares incubados con el VVZ propagado con el LCR de los cinco pacientes con EM muestran un efecto citopático bien definido, mientras que el cultivo incubado

con el del paciente con otro padecimiento neurológico (control) no mostró ningún efecto sobre la integridad celular.

### **6.8 Identificación de las glicoproteínas gB e IE62 en células Vero E6 incubadas con virus varicela-zoster propagado del LCR de pacientes con esclerosis múltiple por microscopía confocal**

La microscopia confocal de los cultivos de células Vero E6 incubados con anticuerpos anti-gB del VVZ, que fueron detectados con un segundo anticuerpo acoplado a un fluorocromo, mostro positividad en la región perinuclear después de incubados con vacuna OKA (Fig. 11 A) y con los 5 propagados del VVZ presente en el LCR de pacientes con EM (Fig. 11 B-E)

Por su parte, los cultivos de células Vero E6 incubadas con el anticuerpo primario anti-IE62 (una proteína no estructural cuya presencia nos indicaría si se lleva a cabo síntesis de novo) mostraron con microscopia confocal positividad en la región perinuclear después de incubación con vacuna OKA (Fig.11 B), así como en los cinco propagados de los VVZ presentes en LCR de pacientes con EM (Fig. 11 B-E).

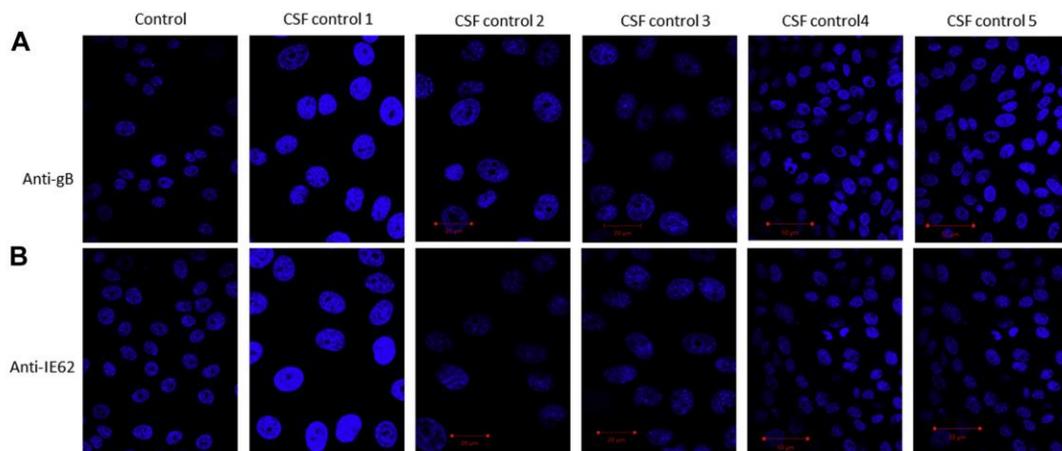


**Figura 11.** Microfotografías de microscopía confocal de las células Vero E6 incubadas 72 hpi: células inoculadas con la vacuna OKA incubadas con

anticuerpos anti-gB (A) y anti-IE62 (B). Los cultivos propagados con los LCRs de los cinco pacientes con EM en brote fueron incubados con anti-gB (A) y anti-IE62 (B) y teñidos con un segundo anticuerpo acoplado a TRITC. Los núcleos de las células Vero E6 se contrastaron con Hoescht (azul). La gB se localiza en el citoplasma y en la región perinuclear, mientras que la IE62 se encuentra principalmente en el citoplasma de la célula.

### 6.9 Análisis por microscopía confocal de células Vero E6 incubadas con el LCR de pacientes con otros padecimientos neurológicos

Las células Vero E6 incubadas durante 72 h con el LCR de cinco pacientes con otros padecimientos neurológicos se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-gB (A) o anti-IE62 (B) y fueron teñidos con un anticuerpo secundario acoplado a TRITC. Los núcleos de células Vero E6 se contrastaron con Hoescht (azul) (Fig. 12). Los controles no contenían anticuerpo primario (Fig. 12 A, B). En ninguna de las muestras analizadas por microscopía confocal se identificaron las proteínas IE62 y gB.



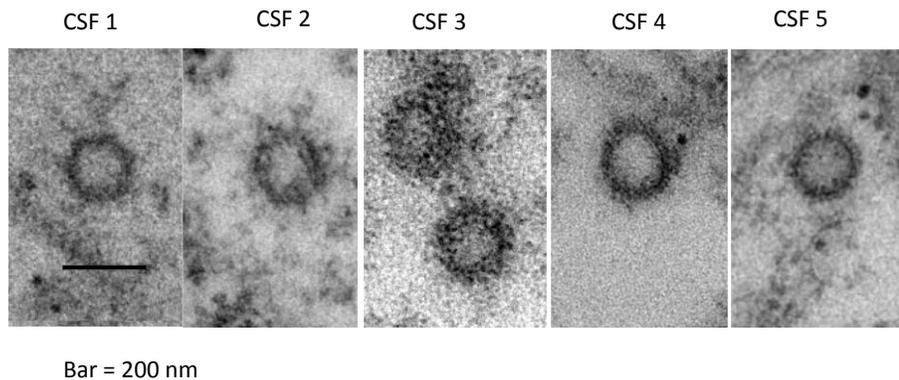
**Figura 12.** Microfotografías de microscopía confocal de las células Vero E6 incubadas 72 hpi: Como control se incluyeron células sin inocular incubadas con

anti-gB (A) e anti-IE62 (B), las células incubadas con los LCRs de los cinco pacientes con otros padecimientos neurológicos con sus respectivos anticuerpos anti-gB e anti-IE62 del VVZ.

### **6.10 Visualización por microscopía electrónica de transmisión de partículas semejantes al VVZ en células Vero E6 incubadas con virus propagados del LCR de pacientes con esclerosis múltiple**

En las muestras a nivel ultraestructural por MET donde se observa la presencia de partículas correspondientes en la forma y tamaño del VVZ en los cinco cultivos de células Vero E6 inoculados con los VVZ propagados presentes en los LCRs de pacientes con EM en fase de brote (figura 13).

En los controles de las células Vero E6 sin inocular y células inoculadas con el LCR 1 de un paciente con otro padecimiento neurológico no se observaron cambios morfológicos y presencia de partículas (resultados no mostrados).



**Figura 13.** Microfotografías de MET de las células Vero E6 incubadas durante 72 hpi con el VVZ propagado del LCR de los cinco pacientes con EM en brote. Se observan partículas con el tamaño y la forma de los virus herpes en todos los cultivos celulares.

## 7. Discusión

En la etiología de la esclerosis múltiple intervienen factores genéticos y factores ambientales. En la actualidad se acepta que los factores ambientales que establecen un mayor riesgo de desarrollar esclerosis múltiple son: latitud elevada, sexo femenino, tabaquismo, niveles bajos de vitamina D, e infecciones previas con virus herpes. Recientemente se ha añadido a estos factores la influencia de la obesidad en la adolescencia (Olsson, Barcellos, & Alfredsson, 2017).

En los periodos de exacerbación de la enfermedad participa una respuesta inmune, sobre todo contra la mielina. Sin embargo, no puede considerarse un padecimiento autoinmune clásico por la falta de un modelo experimental inducido por la administración del antígeno autólogo; por la imposibilidad de transferir la enfermedad de una persona afectada a un individuo sano, así como por el hecho que las lesiones están focalizadas en la materia blanca en las fases iniciales, rodeadas por zonas indemnes en las que están presentes los mismos componentes de la mielina (Sotelo & Corona, 2011).

La infección previa con virus de la familia herpes es uno de los factores ambientales más sólidamente asociados al desarrollo de la esclerosis múltiple. Dos estudios multicéntricos recientes mostraron que la esclerosis múltiple está fuertemente asociada a seropositividad al virus Epstein-Bar, mientras no parece haber asociación importante con el citomegalovirus o los virus herpes simplex 1 y 2 (Langer-Gould y col., 2017; Nourbakhsh y col., 2018).

Otro candidato que se ha asociado a la esclerosis múltiple es el virus varicela-zoster y aunque su posible participación ha sido objeto de estudio a lo largo de varias décadas, aún no se cuenta con resultados concluyentes. Una revisión de cuarenta estudios sobre el tema, que incluyó 13 análisis epidemiológicos, 23 de casos-control y dos de cohortes históricas concluyó: “en la actualidad la evidencia que soporta un papel etiológico importante de la infección con VZV en el desarrollo de la esclerosis múltiple es insuficiente” (Marrie & Wolfson, 2001). Sin embargo, estudios realizados por otros grupos, entre ellos el

grupo de Sotelo en el Instituto de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” sugieren la conclusión contraria.

En México, la esclerosis múltiple ha aumentado en forma significativa en las últimas décadas como causa de invalidez de origen neurológico (González y Sotelo, 1995; Corona y Román, 2006). Al examinar variables ambientales que pudieran relacionarse con ese incremento del padecimiento en el país, se encontró que las personas con antecedente de haber padecido varicela en la infancia tienen entre tres a cuatro veces más probabilidades de desarrollar esclerosis múltiple (Rodríguez-Violante y col., 2009). El mismo grupo encontró la presencia del ADN del virus varicela-zoster en células mononucleares periféricas de pacientes con esclerosis múltiple en fase de brote (Ordoñez y col., 2004); hallazgo reforzado por la presencia de partículas virales en el LCR de esos pacientes, demostrada por microscopía electrónica de transmisión (Sotelo y col., 2008). El hallazgo negativo por otro grupo de investigación al tratar de identificar al virus varicela-zoster en casos de esclerosis múltiple (Burgoon y col., 2009) se debe probablemente a que en ese estudio las muestras no fueron tomadas en los días iniciales de la exacerbación de la enfermedad.

El virus varicela-zoster tiene varias peculiaridades: (1) infecta específicamente al ser humano, lo que dificulta la transmisión experimental a otros huéspedes; (2) se asocia fuertemente a las células, por lo que es difícil su aislamiento y (3) aunque el virus está ampliamente distribuido en seres humanos, el momento para su aislamiento en el huésped se restringe sólo a períodos breves al comienzo de la infección.

El presente trabajo permitió, en primer lugar, corroborar la presencia del virus varicela-zoster en LCR de pacientes con esclerosis múltiple en fase de brote, tanto por PCR como por tinción negativa, empleando microscopía electrónica de transmisión. Dado que el virus está altamente asociado a células fue interesante observar que los virus se encuentran en el LCR libres de células, en los pacientes con esclerosis múltiple estudiados durante períodos de recaída de la enfermedad,

lo que sugiere una infección citolítica activa en el sistema nervioso central, coincidente con la exacerbación de los síntomas.

Una vez confirmada la presencia del virus por microscopía electrónica y por qPCR se analizó la posible infectividad del virus, tema que no ha sido analizado en investigaciones previas.

El hallazgo original del presente trabajo fue demostrar que el virus varicela-zoster presente en el LCR de pacientes con esclerosis múltiple produjeron en cultivos de células Vero 6 un efecto citopático evidente a las 72 h, mientras que los líquidos cefalorraquídeos de pacientes con otros padecimientos neurológicos no inflamatorios no presentaron efecto alguno en esos cultivos.

La estrategia inicial de esta tesis fue probar la infectividad del virus en un cultivo primario de fibroblastos humanos de piel, ya que la infección del virus varicela-zoster se restringe a humanos y la patogénesis es mediada por tropismo a células T, piel y neuronas (Oliver, Yang, & Arvin, 2017). Los resultados con fibroblastos humanos, y posteriormente con las líneas celulares U87 y Mewo no fueron concluyentes, por lo que se procedió a emplear cultivos de células Vero como blanco para la inoculación del virus.

La línea celular Vero obtenida de riñón de mono verde africano ha sido empleada para ensayos de virus SV-40, SV-5, rubeola, arbovirus, reovirus, varicela, adenovirus y poliovirus (Osada y col., 2014). La línea Vero C1008 [Vero 76, clone E6, Vero E6] (ATCC® CRL-1586™) se clonó mediante dilución en placas de microtitulación (Price, 1979); son células polarizadas, a diferencia de las células Vero originales, que no son polarizadas. Las células Vero E6 presentan alta permisividad para la productividad viral, por lo que son empleadas para el aislamiento y/o propagación de varias familias de virus (Prescott y col., 2010): son infectables por diversos virus, debido a un repertorio abundante de receptores, han mantenido una delección genética que elimina el locus del IFN tipo I (Emeny y Morgan, 1979) y codifican un factor regulador de interferón 3, necesario para generar respuestas a la infección del virus (Chew y col., 2009).

Al ser polarizadas, el virus de la influenza brota en la membrana apical de las células Vero E6, mientras que el virus de la estomatitis vesicular se libera en la región baso-lateral (Rodríguez-Boulan y col., 1983). El hecho de poseer una membrana apical diferenciada, abundante en receptores, favorece la entrada de virus a estas células, ya que una de las características esenciales de las células susceptibles a las infecciones virales es la presencia de proteínas de unión (receptores) en la superficie celular, que permiten la interacción inicial de las glicoproteínas virales a las células blanco.

El virus varicela-zoster se reproduce dentro de la célula huésped y el virión maduro infecta a la célula vecina, propagándose lateralmente y creando sincitios de células infectadas (Reichelt y col., 2009). Para incrementar el número de partículas virales presentes en el LCR de los pacientes con esclerosis múltiple en brote se permitió la propagación del virus en los cultivos de células Vero E6 durante 72 h; se colectaron las células infectadas y se lisaron con varios ciclos de choque térmico para liberar las partículas virales contenidas en ellas. Los detritos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante conteniendo los virus se utilizó para infectar un nuevo cultivo de células Vero E6.

Al término de las primeras 72 horas de interacción de las monocapas de células Vero E6, con los virus propagados del LCRs de pacientes con esclerosis múltiple en fase de brote, se observó en todos los casos un efecto citopático notable, visualizado en microscopía óptica como aumento de volumen celular, formación de células multinucleadas, lisis y desprendimiento del sustrato. Con el microscopio electrónico de transmisión las células de esos cultivos mostraron aumento notable del número de cisternas del aparato de Golgi y partículas citoplásmicas con tamaño y apariencia semejante a los virus herpes. En cambio, no se observaron cambios morfológicos en los cultivos inoculados con LCR obtenido de pacientes con padecimientos neurológicos no inflamatorios.

A continuación, los cultivos que mostraron efecto citopático fueron analizados por inmunofluorescencia con microscopía confocal, utilizando el anticuerpo anti-gB del virus varicela-zoster. La glicoproteína gB se encuentra en la

membrana plasmática de células infectadas; es una glicoproteína estructural con secuencias específicas que median el transporte de componentes virales del retículo endoplásmico al aparato de Golgi (Heineman y col., 1994), se transcribe tardíamente y media la internalización desde la membrana plasmática, el transporte del aparato del Golgi y el egreso viral. Es la segunda glicoproteína más abundante del virus herpes-zoster y la más conservada de las glicoproteínas de los virus herpes (Maresova y col., 2005).

En todos los cultivos que mostraron efecto citopático se detectó marca con el anticuerpo anti-gB en la región perinuclear; al realizar los cortes en Z se observó que la marca es supranuclear, en la región del aparato del Golgi, donde se lleva a cabo la envoltura y maduración de las glicoproteínas estructurales de los virus herpes (Whealy y col., 1991).

Posteriormente se analizó por inmunofluorescencia la posible presencia de la proteína IE62 del virus herpes-zoster, un componente del tegumento sintetizado en la fase inmediatamente temprana y redistribuido del núcleo al citoplasma (Yang y col., 2008) que aparece una hora después de la infección y a las 12 horas puede identificarse en el citoplasma (Reichelt y col., 2009) . La identificación de la IE62 en el cultivo de células Vero E6 inoculadas con el clarificado celular obtenido del cultivo inoculado con el LCR de pacientes con esclerosis múltiple en los primeros días de recaída fue crucial para demostrar que la proteína inmediatamente temprana estaba siendo transcrita y con esto confirmar la hipótesis de que las partículas presentes en el LCR son infectivas.

Este hallazgo refuerza la posibilidad de que el virus herpes-zoster participe en la génesis de la esclerosis múltiple, aunque dista mucho de resolver el problema fundamental: ¿la presencia del virus refleja meramente una infección oportunista pasajera, consecuencia de la reactivación de la enfermedad, o realmente el virus contribuye a los cambios neurodegenerativos responsables del carácter progresivo del padecimiento?

La participación del virus herpes-zoster en la patogénesis de la esclerosis múltiple sigue siendo motivo de controversia (Burgoon y col., 2009), si bien un

número creciente de publicaciones recientes de grupos de investigación en diversas partes del mundo apuntan a su participación en el desarrollo de la enfermedad. Se ha afirmado que el antecedente de infección por zoster es más común en las personas con EM que en la población general (Manouchehrinia y col., 2017). Asimismo, se ha encontrado ADN del VZV en células sanguíneas mononucleares de 80 pacientes con EM (Najafi y col., 2016), y se reportaron títulos significativamente más altos de IgG anti-VZV en el suero de 800 pacientes con EM en comparación con 1,000 individuos sanos (Karampoor y col., 2017). Además, un estudio a nivel nacional de la población en Taiwán mostró que la incidencia de la EM se correlaciona con la activación del herpes zoster (Kang y col., 2011). Es posible que el tiempo para el aislamiento del virus en el huésped se restrinja solo a períodos breves al comienzo de la infección o durante la reactivación viral, de forma muy similar a los casos aquí reportados.

La compleja tarea de definir el papel de un virus en particular en la producción de un padecimiento neurodegenerativo crónico se ejemplifica en el caso de los virus como causa de la enfermedad de Alzheimer, asunto que ha sido analizado durante décadas. Una colaboración reciente entre quince grupos norteamericanos de investigación analizó el viroma de los virus herpes humanos 6A (HHV6A) y 7 (HHV7) en sujetos con enfermedad de Alzheimer, comparando datos clínicos, genómicos, transcriptómicos, proteómicos e histopatológicos, en varias cohortes independientes y geográficamente dispersas. La conclusión es consistente con definir el papel causal de esos virus en el desarrollo y la progresión de la enfermedad (Readhead y col., 2018).

Un estudio similar al anterior para el caso de la esclerosis múltiple y el virus varicela-zoster permitiría afirmar o descartar la relación entre el agente infeccioso y el padecimiento neurológico. Otra alternativa es el análisis del efecto del tratamiento antiviral en el curso de la enfermedad. Un resultado inicial parecía prometedor al reducir el antiviral aciclovir las exacerbaciones sintomáticas de la esclerosis múltiple (Lycke y col., 1966). En un estudio posterior el aciclovir no modificó la progresión de las lesiones cerebrales en uno de dos grupos de

pacientes con el padecimiento (Bech y col., 2002); a pesar de lo cual se sigue considerando importante analizar los efectos de los antivirales en grupos mayores de pacientes con esclerosis múltiple (Lycke, 2017).

En conclusión, nuestros resultados demuestran por vez primera que el virus varicela-zoster presente en el LCR de pacientes con esclerosis múltiple en los primeros ocho días de recaída son infectivos al ser analizados en un sistema *in vitro*, como lo demuestra el efecto citopático producido en las células Vero E6 y por la transcripción en esas células del gen temprano (IE62) y del gen tardío (gB) del virus.

## 8. Referencias

- Abdolvahab, M. H., Mofrad, M., & Schellekens, H. (2016). Interferon beta: from molecular level to therapeutic effects *International Review of Cell and Molecular Biology* 326, 343-372
- Ascherio, A., Munger, K. L., & Simon, K. C. (2010). Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurology* 9 (6), 599-612.
- Bar-Or, A y col. (2014). Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. *Drugs* 74(6), 659-674.
- Bech, E y col. (2002) A randomized, double-blind, placebo-controlled MRI study of anti-herpes virus therapy in MS. *Neurology* 58 (1):31-36.
- Chun, J., & Hartung, H.-P. (2010). Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clinical Neuropharmacology* 33(2), 91.
- Browne, P y col. (2014). Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* 83 (11), 1022-1024.
- Burgoon, M. P y col. (2009). Varicella zoster virus is not a disease-relevant antigen in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 65 (4), 474-479.
- Cermelli, C. y Jacobson, S. (2000). Viruses and multiple sclerosis. *Viral Immunology* 13 (3), 255-267.
- Chew y col. (2009). Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. *Molecular Immunology* 46 (3), 393-399.
- Cohen, J. I. y Nguyen, H. (1997). Varicella-zoster virus glycoprotein I is essential for growth of virus in Vero cells. *Journal of Virology* 71 (9), 6913-6920.
- Cohen, J. I. y Seidel, K. (1994). Varicella-zoster virus (VZV) open reading frame 10 protein, the homolog of the essential herpes simplex virus protein VP16, is dispensable for VZV replication in vitro. *Journal of Virology* 68 (12), 7850-7858.
- Confavreux, C y col. (2000). Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* 343 (20), 1430-1438.

- Corona, T. y Román, G. C. (2006). Multiple sclerosis in Latin America. *Neuroepidemiology* 26 (1), 1-3.
- Dendrou, C. A., Fugger, L., Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology* 15 (9), 545.
- Depledge, D., Sadaoka, T., Ouwendijk, W. (2018). Molecular aspects of varicella-zoster virus latency. *Viruses* 10 (7), 349.
- Duus, K. M., Hatfield, C., Grose, C. (1995). Cell surface expression and fusion by the varicella-zoster virus gH: gL glycoprotein complex: analysis by laser scanning confocal microscopy. *Virology* 210 (2), 429-440.
- Emeny, J. M. y Morgan, M. J. (1979). Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *Journal of General Virology* 43 (1), 247-252.
- García, F. Z., & Lorente, M. I. (2002). Interferón beta (IFN $\beta$ ) como tratamiento de la esclerosis múltiple. *Farmacia Hospitalaria* (26/05), 294.
- Gonzalez, O. Sotelo, J. (1995) Is the frequency of multiple sclerosis increasing in Mexico? *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 59, 528-530
- Heineman, T. C y col. (2004). Conserved cytoplasmic domain sequences mediate the ER export of VZV, HSV-1, and HCMV gB. *Virology* 328 (1), 131-141.
- Jacquet, A y col. (1998). The varicella zoster virus glycoprotein B (gB) plays a role in virus binding to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Virus Research* 53 (2), 197-207.
- Jakimovski, D., Weinstock-Guttman, B., Ramanathan, M., Kolb, C., Hojnacki, D., Minagar, A., & Zivadinov, R. (2017). Ocrelizumab: a B-cell depleting therapy for multiple sclerosis. *Expert Opinion on Biological Therapy* 17 (9), 1163-1172.
- Jörg, S y col. (2016). Environmental factors in autoimmune disease and their role in multiple sclerosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (24), 4611-4622.

- Kanal, E., Maravilla, K., Rowley, H. (2014). Gadolinium contrast agents for CNS imaging: current concepts and clinical evidence. *American Journal of Neuroradiology* 35 (12), 2215-2226.
- Kang, J.-H y col. (2011). Increased risk of multiple sclerosis following herpes zoster: a nationwide, population-based study. *Journal of Infectious Diseases* 204 (2), 188-192.
- Kasarello, K y col. (2017). Mechanism of action of three newly registered drugs for multiple sclerosis treatment. *Pharmacological Reports* 69 (4), 702-708.
- Karampoor, S y col. (2017). Cytomegalovirus and varicella zoster virus seropositivity of Iranian patients with multiple sclerosis: A population-based study. *Journal of Neuroimmunology* 309, 4-6.
- Karussis, D. (2014). The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review. *Journal of Autoimmunity* 48, 134-142.
- Kieseier, B. C. (2011). The mechanism of action of interferon- $\beta$  in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs* 25 (6), 491-502.
- Kurtzke, J., Hyllested, K. y Heltberg, A. (1995). Multiple sclerosis in the Faroe Islands: transmission across four epidemics. *Acta Neurologica Scandinavica* 91 (5), 321-325.
- Langer-Gould, A. y col. (2017). Epstein-barr virus, cytomegalovirus, and multiple sclerosis susceptibility: A multiethnic study. *Neurology* 89 (13), 1330-1337.
- Lycke, J. y col. (1966) Acyclovir treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Journal of Neurology* 243 (3):214-24.
- Lycke J. (2017) Trials of antivirals in the treatment of multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica* 136 Suppl 201:45-48. doi: 10.1111/ane.12839.
- Mancuso, R. Y col. (2007). Increased prevalence of varicella zoster virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *Journal of Medical Virology* 79 (2), 192-199.

- Manouchehrinia, A. y col. (2017) Prevalence of a history of prior varicella/herpes zoster infection in multiple sclerosis. *Journal of Neurovirology* 2: 839–844.
- Maresova, L. (2005). Incorporation of three endocytosed varicella-zoster virus glycoproteins, gE, gH, and gB, into the virion envelope. *Journal of Virology* 79 (2), 997-1007.
- Marrie, R. y Wolfson, C. (2001). Multiple sclerosis and varicella zoster virus infection: a review. *Epidemiology & Infection* 127 (2), 315-325.
- Milo, R. y Miller, A. (2014). Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmunity Reviews* 13 (4-5), 518-524.
- Mo, C., Suen, J., Sommer, M. y Arvin, A. (1999). Characterization of varicella-zoster virus glycoprotein K (open reading frame 5) and its role in virus growth. *Journal of Virology* 73 (5), 4197-4207.
- Moffat, J. y col. (2002). Glycoprotein I of varicella-zoster virus is required for viral replication in skin and T cells. *Journal of Virology* 76 (16), 8468-8471.
- Munger, K. L. y col. (2004). Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 62 (1), 60-65.
- Najafi S, G.M., Yousefzadeh-Chabok S, 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* 2016; 9: e3415.
- Nourbakhsh, B. y col. (2018). Heterogeneity in association of remote herpesvirus infections and pediatric MS. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 5 (10), 1222-1228.
- Oliver, S. L., Yang, E., Arvin, A. M. (2016). Varicella-zoster virus glycoproteins: entry, replication, and pathogenesis. *Current Clinical Microbiology Reports* 3 (4), 204-215.
- Oliver, S. L., Yang, E., Arvin, A. M. (2017). Dysregulated glycoprotein B-mediated cell-cell fusion disrupts varicella-zoster virus and host gene transcription during infection. *Journal of Virology*, 91 (1), e01613-01616.

- Olsson, T., Barcellos, L. F., Alfredsson, L. (2017). Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology* 13 (1), 25.
- Ontaneda, D., Cohen, J. A. (2013). The benefits and risks of alemtuzumab in multiple sclerosis. *Expert Review of Clinical Immunology* 9 (3), 189-191.
- Ordoñez, G. y col. (2004). Brief presence of varicella-zoster viral DNA in mononuclear cells during relapses of multiple sclerosis. *Archives of Neurology* 61 (4), 529-532.
- Osada, N. y col. (2014). The genome landscape of the african green monkey kidney-derived vero cell line. *DNA Research* 21 (6), 673-683.
- Perez-Cesari, C., Saniger, M., Sotelo, J. (2005). Frequent association of multiple sclerosis with varicella and zoster. *Acta Neurologica Scandinavica* 112 (6), 417-419.
- Polman, C. H. y col. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology* 69 (2), 292-302.
- Prescott, J y col. (2010). New World hantaviruses activate IFN $\lambda$  production in type I IFN-deficient vero E6 cells. *PLoS One* 5 (6), e11159.
- Prod'homme, T., & Zamvil, S. S. (2018). The evolving mechanisms of action of glatiramer acetate. *Cold Spring Harb Perspect Med*.  
doi:10.1101/cshperspect.a029249
- Readhead, B., Haure-Mirande, J., Funk, C. Multiscale analysis of independent Alzheimer's cohorts finds disruption of molecular, genetic, and clinical networks by human herpesvirus *Neuron* 99, 64-82.
- Reichelt, M., Brady, J., 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.
- Rodriguez-Boulan, E., Paskiet, K. T., Sabatini, D. D. (1983). Assembly of enveloped viruses in Madin-Darby canine kidney cells: polarized budding

- from single attached cells and from clusters of cells in suspension. *Journal of Cell Biology* 96 (3), 866-874.
- Rodriguez, J. E., Moninger, T., Grose, C. (1993). Entry and egress of varicella virus blocked by same anti-gH monoclonal antibody. *Virology* 196 (2), 840-844. doi:10.1006/viro.1993.1543
- Rodríguez-Violante, M y col. (2009). Association of a history of varicella virus infection with multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 111 (1), 54-56.
- Rommer, P. S., & Zettl, U. K. (2018). Managing the side effects of multiple sclerosis therapy: pharmacotherapy options for patients. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 19 (5), 483-498.
- Sawcer, S y col. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476 (7359), 214.
- Sotelo, J y col. (2007). Varicella-zoster virus at relapses of multiple sclerosis. *Journal of Neurology* 254 (4), 493-500.
- Sotelo, J y col. (2008). Varicella-zoster virus in cerebrospinal fluid at relapses of multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 63 (3), 303-311.
- Sotelo, J., Corona, T. (2011). Varicella zoster virus and relapsing remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis International*. doi:10.1155/2011/214763.
- Swanton, J. K y col. (2007). MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study. *Lancet Neurology* 6 (8), 677-686.
- Whealy, M y col. (1991). Effect of brefeldin A on alphaherpesvirus membrane protein glycosylation and virus egress. *Journal of Virology* 65 (3), 1066-1081.
- Winger, R. C., Zamvil, S. S. (2016). Antibodies in multiple sclerosis oligoclonal bands target debris. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (28), 7696-7698.

- Yamagishi, Y y col. (2008). Varicella-zoster virus glycoprotein M homolog is glycosylated, is expressed on the viral envelope, and functions in virus cell-to-cell spread. *Journal of Virology* 82 (2), 795-804.
- Yang, M., Hay, J., Ruyechan, W. T. (2008). Varicella-zoster virus IE62 protein utilizes the human mediator complex in promoter activation. *Journal of Virology* 82 (24), 12154-12163.
- Zamvil, S. S., & Steinman, L. (1990). The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annual Review of Immunology* 8 (1), 579-621.
- Zerboni, L., Sen, N., Oliver, S. L., & Arvin, A. M. (2014). Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 12 (3), 197.
- Zulet, M. I y col. (2017). Epigenetic changes in neurology: DNA methylation in multiple sclerosis. *Neurología (Edición en inglés)* 32 (7), 463-468.

## Apéndice 1: Lista de Abreviaturas

<b>BDNF</b>	Brain-derived neurotrophic factor
<b>BOC</b>	Bandas oligoclonales
<b>CPA</b>	Células presentadoras de antígeno
<b>Ct</b>	Threshold cycle
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMF</b>	Dimetil fumarato
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleótido
<b>EAE</b>	Encefalitis autoinmune experimental
<b>EM</b>	Esclerosis múltiple
<b>EMPP</b>	Esclerosis múltiple primaria progresiva
<b>EMPR</b>	Esclerosis múltiple progresiva-recurrente
<b>EMRR</b>	Esclerosis múltiple recurrente-remitente
<b>EMSP</b>	Esclerosis múltiple secundaria-progresiva
<b>FDA</b>	Administración de Drogas y Alimentos (Food and Drug Administration)
<b>FITC</b>	Isotiocianato de Fluoresceína
<b>gB</b>	Glicoproteína B
<b>GBCA</b>	Contraste basados en gadolinio
<b>Gd</b>	Gadolinio
<b>IE62</b>	Immediate early
<b>IFN</b>	Interferón
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INNN</b>	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
<b>LCR</b>	LCR
<b>MadCAM-1</b>	Mucosal addressin cell adhesion molecule-1
<b>MBP</b>	Proteína básica de mielina

<b>MEB</b>	Microscopia electrónica de barrido
<b>MET</b>	Microscopia electrónica de transmisión
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>MMF</b>	Fumarato de monometilo
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>NK</b>	Natural killer
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ORF</b>	Open reading frames
<b>PB</b>	Pares de bases
<b>PBMCs</b>	Células mononucleares de sangre periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
<b>PBS</b>	Tampón salino-fosfato (Phosphate Buffer Saline)
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
<b>RM</b>	Resonancia magnética
<b>S1P</b>	Esfingosina 1 fosfato
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>UI</b>	Unidades internacionales
<b>VCAM-1</b>	Vascular cell adhesion molecule-1
<b>VEB</b>	Virus Epstein Bar
<b>VHH</b>	Virus herpes humano
<b>VHS</b>	Virus herpes simple
<b>VVZ</b>	Virus varicela zoster

## Apéndice 2: Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Características clínicas y detección por qPCR del VVZ en el LCR de pacientes con EM en brote	26
<b>Tabla 2.</b> Características clínicas y detección por qPCR del VVZ en el LCR de pacientes con otros padecimientos neurológicos	26
<b>Tabla 3.</b> Secuencia del ORF 31 del VVZ y sondas de amplificación	57
<b>Tabla 4.</b> Programa del perfil térmico para la amplificación de la gB del VVZ por PCR en tiempo real	60

### Apéndice 3: Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Prevalencia por país de la esclerosis múltiple	8
<b>Figura 2.</b>	Ciclo de vida del virus varicela zoster	18
<b>Figura 3.</b>	Esquema general de trabajo	21
<b>Figura 4.</b>	Esquema de propagación e infectividad	23
<b>Figura 5.</b>	Microfotografías electrónicas del VVZ. MET (A, B, C), MEB (D). VVZ de la vacuna OKA (A, B). VVZ en el líquido vesicular de un paciente con herpes zoster (C, D)	27
<b>Figura 6.</b>	Microscopia electrónica de transmisión de LCRs inmunoprecipitados con anticuerpos anti-gB, anti-gE y anti-gI del VVZ y procesados por tinción negativa	28
<b>Figura 7.</b>	Cortes semifinos de fibroblastos humanos de piel, microscopía óptica. (A) fibroblastos humanos de piel incubados con el LCR de un paciente con un padecimiento nerológico diferente a la EM; (B) fibroblastos inoculados con el LCR 1 de un paciente con EM. Barra = 20 $\mu\text{m}$	29
<b>Figura 8.</b>	Microfotografía electrónica de transmisión de fibroblastos humanos de piel incubados 72h con el LCR 1 de un paciente con EM	30
<b>Figura 9.</b>	Microscopía confocal de los fibroblastos humanos de piel incubados 72 hpi. A) fibroblastos inoculados con la vacuna OKA, fibroblastos inoculados con el LCR 1 (B), LCR 2 (C), LCR 3 (D) y LCR 4 (E) de pacientes con EM en brote, y con el LCR 1 (F), de un paciente con otro padecimiento nerológico como control	31
<b>Figura 10.</b>	Microscopia óptica de las células Vero E6 incubas 72 hpi. Los cultivos celulares incubados con el VVZ propagado con el LCR de los cinco pacientes con EM, todas muestran un efecto citopático bien definido,	

- mientras que el cultivo incubado con el LCR 1 del paciente con otro padecimiento neurológico (control) no mostró ningún efecto sobre la integridad celular 32
- Figura 11.** Microfotografías de microscopía confocal de las células Vero E6 incubadas 72 hpi: células inoculadas con la vacuna OKA incubadas con anticuerpos anti-gB (A) y anti-IE62 (B). Los cultivos propagados con los LCRs de los cinco pacientes con EM en brote fueron incubados con anti-gB (A) y anti-IE62 (B) y teñidos con un segundo anticuerpo acoplado a TRITC 33
- Figura 12.** Microfotografías de microscopía confocal de las células Vero E6 incubadas 72 hpi: Como control se incluyeron células sin inocular incubadas con anti-gB (A) e anti-IE62 (B), las células incubadas con los LCRs de los cinco pacientes con otros padecimientos neurológicos con sus respectivos anticuerpos anti-gB e anti-IE62 del VVZ 34
- Figura 13.** Microfotografías de MET de las células Vero E6 incubadas durante 72 hpi con el VVZ propagado del LCR de los cinco pacientes con EM en brote 35

#### Apéndice 4: Protocolos

1. Extracción del DNA del LCR y de la vacuna OKA	56
2. PCR en tiempo real para el VVZ	57
3. Inmunoprecipitación del VVZ	62
4. Tinción negativa	62
5. Observación de virus por MEB	63
6. Cultivo de fibroblastos humanos de piel	64
7. Cultivo de la línea celular VERO C1008 [Vero 76, clone E6, Vero E6] (ATCC® CRL-1586™) e inoculación con vacuna OKA o LCR de pacientes con EM en brote	64
8. Propagación del VVZ presente en el LCR	65
9. Procesamiento para la observación por MET	66
10. Microscopía confocal de cultivos incubados con la vacuna OKA, con LCR de pacientes o con virus propagados del LCR de pacientes con EM en brote	68

## 1. Extracción del DNA del LCR y de la vacuna OKA

La extracción del DNA genómico de 250  $\mu\text{l}$  de LCR se realizó con un kit de Qiagen. La pureza y concentración se determinó por absorbancia a 260/280 en un espectrofotómetro (NanoDrop) utilizando 1  $\mu\text{l}$  del DNA y el resto se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### Materiales:

- Buffer de lisis (Qiagen no. Catálogo 158908)
- Proteinasa K (Invitrogen no. Catálogo25530-049)
- Solución de precipitación de proteínas (Qiagen, no. Catálogo 158912)
- Isopropanol
- Etanol al 70%
- Agua estéril

### Método:

- En un tubo Eppendorf mezclar 495  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis con 5  $\mu\text{l}$  de proteinasa K y añadir al tubo con la muestra de vacuna OKA o LCR de paciente. Mezclar en el vórtex por 2 minutos e incubar a  $56^{\circ}\text{C}$  toda la noche
- Añadir 100  $\mu\text{l}$  de solución de precipitación de proteínas y mezclar en el vórtex durante 1 min
- Incubar en hielo durante 5 min
- Centrifugar 3 min a 16, 000 x  $g$  a  $4^{\circ}\text{C}$
- Transferir el sobrenadante a un vial nuevo que contenga 300  $\mu\text{l}$  de isopropanol, mezclar por inversión e incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche.
- Centrifugar 5 min a 16, 000 x  $g$  a  $4^{\circ}\text{C}$

- Eliminar el sobrenadante y agregar 300  $\mu$ l de etanol al 70% a la pastilla.  
Invertir el tubo varias veces
- Centrifugar 2 min a 16, 000 x *g* a 4°C
- Descartar sobrenadante y dejar secar 5 min aproximadamente.
- Disolver el DNA en 20  $\mu$ l de agua inyectable.
- Determinar la pureza y concentración de DNA por absorbancia a 260/280 en un espectrofotómetro (NanoDrop) utilizando 1  $\mu$ l del DNA.
- Almacenar los viales a -70°C.

## 2. PCR en tiempo real para el VVZ

Las sondas (Tabla 3) se derivaron de: VVZ del ORF 31 (gen gB); diseñado con Primer Express Software (Ver. 2.0) y sintetizado por Applied Biosystems (México). No se observó reactividad cruzada entre ninguno de los ensayos in silico de ADN viral realizados. Todas las determinaciones de PCR se realizaron con sondas TaqMan.

**Tabla 3.** Secuencia del ORF 31 del VVZ y sondas de amplificación

Forward	Reverse	Tamaño producto
5'- CACAAAAACACCCGACTCGAA- 3'	5'- TATTGGCACGCAACTCAACT -3'	66 pb

TGCTTTTTATGCATATTTTCTATGTTTGTACGGCGGTTGTGTCGGTCTCTCCA  
AGCTCGTTTTATGAGAGTTTACAAGTAGAGCCCACACAATCAGAAGATATAAC  
CCGGTCTGCTCATCTGGGCGATGGTGATGAAATCAGAGAAGCTATACACAAG  
TCCCAGGACGCCGAAACAAAACCCACGTTTTACGTCTGCCACCGCCAACAG  
GCTCCACAATCGTACGATTAGAACCAACTCGGACATGTCCGGATTATCACCTT  
GGTAAAAACTTTACAGAGGGTATTGCTGTTGTTTATAAAGAAAACATTGCAGC

GTACAAGTTTAAGGCGACGGTATATTACAAAGATGTTATCGTTAGCACGGCGT  
GGGCCGGAAGTTCTTATACGCAAATTAATAAGATATGCGGATAGGGTACCA  
ATTCCCGTTTCAGAGATCACGGACACCATTGATAAGTTTGGCAAGTGTTCTTC  
TAAAGCAACGTACGTACGAAATAACCACAAAGTTGAAGCCTTTAATGAGGATA  
AAAATCCACAGGATATGCCTCTAATCGCATCAAATATAATTCTGTGGGATCCA  
AAGCATGGCATACTACCAATGACACGTACATGGTTGCCGGAACCCCCGGAAC  
ATATAGGACGGGCACGTCCGGTGAATTGCATCATTGAGGAAGTTGAAGCCAGA  
TCAATATCCCTTATGATAGTTTTGGACTTTCCACGGGAGATATAATATACATG  
TCCCCGTTTTTTGGCCTACGGGATGGTGCATACAGAGAACATTCCAATTATGC  
AATGGATCGTTTTACCCAGTTTGAGGGTTATAGACAAAGGGATCTTGACACTA  
GAGCATTACTGGAACCTGCAGCGCGGAACTTTTAGTCACGCCTCATTTAACG  
GTTGGTTGGAACCTGGAAGCCAAAACGAACGGAAGTTTGTTCGCTTGTCAAGT  
GGCGTGAGGTTGAAGACGTAGTTCGCGATGAGTATGCACACAATTTTCGCTTT  
ACAATGAAAACACTTTCTACCACGTTTATAAGTGAAACAAACGAGTTTAATCTT  
AACCAAATCCATCTCAGTCAATGTGTAAAGGAGGAAGCCCCGGGCTATTATTAA  
CCGGATCTATACAACCAGATACAACCTCATCTCATGTTAGAACCGGGGATATCC  
AGACCTACCTTGCCAGAGGGGGGTTTTGTTGTGGTGTTC AACCCCTGCTGAG  
CAATTCCTCGCCCGTCTCTATCTCCAAGAATTGGTCCGTGAAAACACTAATC  
ATTCAC CACAAAAACACCCGACTCGA AATACCAGATCCCGACGAAGCGTGCC  
AGTTGAGTTGCGTGCCAATA GAACAATAACAACCACCTCATCGGTGGAATTTG  
CTATGCTCCAGTTTACATATGACCACATTCAAGAGCATGTTAATGAAATGTTGG  
CACGTATCTCCTCGTCGTGGTGCCAGCTACAAAATCGCGAACGCGCCCTTTG  
GAGCGGACTATTTCCAATTAACCAAGTGCTTTAGCGAGCACCATTTTGGATC  
AACGTGTTAAAGCTCGTATTCTCGGCGACGTTATCTCCGTTTCTAATTGTCCA  
GAACTGGGATCAGATACACGCATTATACTTCAAACCTCTATGAGGGTATCTGG  
TAGTACTACGCGTTGTTATAGCCGTCCTTTAATTTCAATAGTTAGTTTAAATGG  
GTCCGGGACGGTGGAGGGCCAGCTTGGAACAGATAACGAGTTAATTATGTCC  
AGAGATCTGTTAGAACCATGCGTGGCTAATCACAAGCGATATTTTCTATTTGG  
GCATCACTACGTATATTATGAGGATTATCGTTACGTCCGTGAAATCGCAGTCC  
ATGATGTGGGAATGATTAGCACTTACGTAGATTTAACTTAACACTTCTTAAAG

ATAGAGAGTTTATGCCGCTGCAAGTATATACAAGAGACGAGCTGCGGGATAC  
AGGATTACTAGACTACAGTGAAATTCAACGCCGAAATCAAATGCATTTCGCTGC  
GTTTTTATGACATAGACAAGGTTGTGCAATATGATAGCGGAACGGCCATTATG  
CAGGGCATGGCTCAGTTTTTCCAGGGACTTGGGACCGCGGGCCAGGCCGTT  
GGACATGTGGTTCTTGGGGCCACGGGAGCGCTGCTTCCACCGTACACGGAT  
TTACCACGTTTTTATCTAACCCATTTGGGGCATTGGCCGTGGGATTATTGGTTT  
TGCGGGACTGGTAGCGGCCTTTTTTGC GTACCGGTACGTGCTTAAACTTAA  
AACAAGCCCGATGAAGGCATTATATCCACTCACAACCAAGGGGTAAAACAGT  
TACCGGAAGGAATGGATCCCTTTGCCGAGAAACCCAACGCTACTGATACCCC  
AATAGAAGAAATTGGCGACTCACAAAACACTGAACCGTCGGTAAATAGCGGG  
TTTGATCCCGATAAATTTTCGAGAAGCCCAGGAAATGATTAAATATATGACGTTA  
GTATCTGCGGCTGAGCGCCAAGAATCTAAAGCCCGCAAAAAAATAAGACTA  
GCGCCCTTTTAACTTCACGTCTTACCGGCCTTGCTTTACGAAATCGCCGAGGA  
TACTCCCGTGTTTCGCACCGAGAATGTAACGGGGGTGTAA

#### Materiales:

- Taqman PCR master mix (Applied Biosystems, No. Catálogo 4304437)
- Sondas de VVZ para PCR del ORF 31 (gen gB) (Applied Biosystems No. Catalogo 4332078) utilizando una concentración de DNA de 0.9  $\mu$ M y 0.25  $\mu$ M de sonda
- Taqman RNase P (Applied Biosystems, No. Catalogo 4316831)
- Agua estéril
- Placas de microtitulación de 96 pozos (Applied Biosystems, No. Catalogo N801-0560)
- 100 ng/ $\mu$ l de DNA de las muestras
- Película con adhesivo óptico (Applied Biosystems, No. Catalogo 4311971)
- Sistema de PCR tiempo real ABI PRISM 7500 Applied Biosystems

Preparación de dos mezclas de reacción con un volumen total de 25  $\mu$ l cada una:

#### Método

1. En un tubo Eppendorf estéril preparar la mezcla con:

- 12.5  $\mu$ l de Taqman PCR master mix
- 6.25  $\mu$ l de agua estéril
- $\mu$ l de sonda para VVZ

2. En un tubo Eppendorf estéril preparar la mezcla con:

- 12.5  $\mu$ l de Taqman PCR master mix
- 6.25  $\mu$ l de agua estéril
- 1.25  $\mu$ l de Taqman RNase P

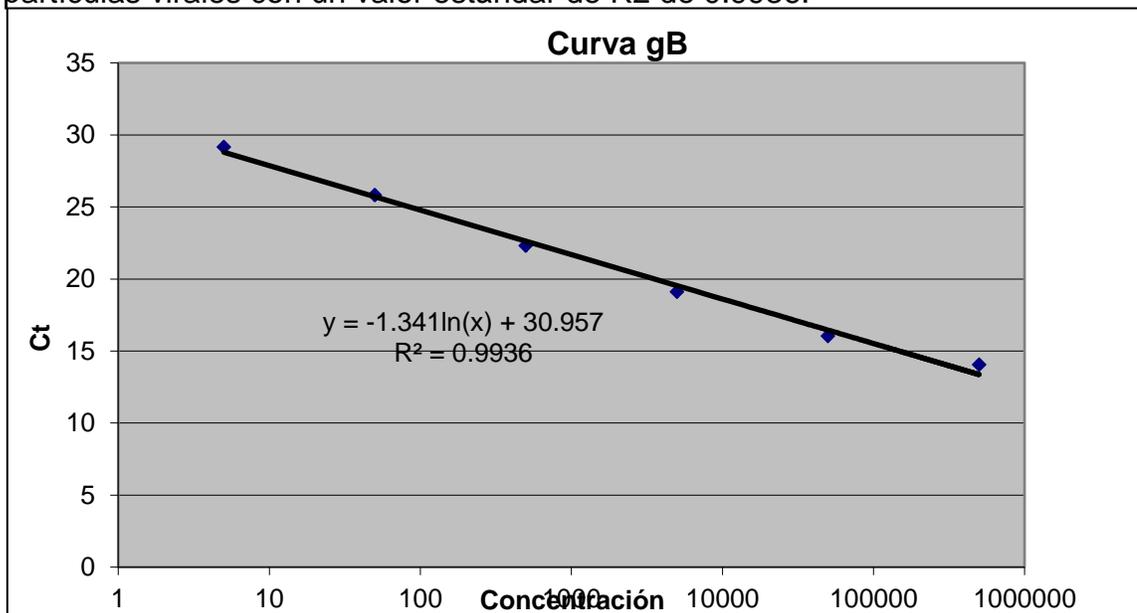
La curva estándar se realizó por diluciones seriadas 1:10 del plásmido que lleva el gen gB; el gen contenido en el vector pET. El inserto del estándar (pET) se secuenció con el Sistema CEQ (Ver. 9.0.25). Además, las mezclas de reacción que contienen la sonda adecuada y el sistema de primers pero sin el DNA fueron corridos en todas las placas por triplicado y fueron usadas como controles negativos. Las mezclas de PCR en placas de micro-titulación de 96 pozos fueron incubadas siguiendo el perfil térmico de la tabla 4, usando un sistema de PCR en tiempo real ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Cada muestra fue corrida por triplicado.

**Tabla 4.** Programa del perfil térmico para la amplificación de la gB del VVZ por PCR en tiempo real.

Etapa	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. de ciclos
1	1	50	02:00	1
2	1	95	10:00	1
3	1	95	00:15	40
	2	60	01:00	
4	1	4	$\infty$	

Por cada reacción, los valores de fluorescencia fueron medidos en función de la cantidad del reportero (6-carboxy-fluoresceína [FAM]) liberado durante la amplificación. El valor del ciclo umbral (threshold cycle, Ct) fue determinado como el número del primer ciclo al cual la medida de fluorescencia excedió el límite (10 veces la desviación estándar de la base). Los valores de Ct observados para las muestras de DNA fueron usados para calcular la concentración del VZV basado en la curva estándar para el plásmido analizado que contiene la secuencia de la gB.

La sensibilidad de la PCR en tiempo real para el gen gB del VZV es de 5 partículas virales con un valor estándar de R2 de 0.9936.



	cT	No. Copias
LCR 1	26.311	37,637
LCR 2	25.387	74,985
LCR 3	31.65	701
LCR 4	30.902	1,221
LCR 5	27.979	10,845

### **3. Inmunoprecipitación del VVZ**

Para concentrar el VVZ presente en en la vacuna OKA y el LCR de los pacientes con EM en brote se utilizaron 3 anticuerpos comerciales anti-VVZ: gI, gB (No. Catálogo: Sc 58076 y Sc 58074, Santa Cruz Biotechnology) y gE (No. Catálogo: GTX40374, GeneTex).

Método:

- Centrifugar 0.6 ml de LCR a 2,800 x g durante 40 min para concentrar detritos celulares en la pastilla.
- Mezclar 0.1 ml de sobrenadante con 0.1 ml de anticuerpos IgG contra las 3 glicoproteínas del VVZ diluidos 1:50 con PBS.
- Incubar la mezcla a 37°C durante 2 horas y centrifugar a 2,000 x g durante 30 min a 4°C.

### **4. Tinción negativa**

Materiales:

- Rejillas de cobre cubiertas con formvar
- Acetato de uranilo al 5 % en agua
- Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011 (Jeol Ltd. Tokio, Japón) a 80 KV.

Método:

- Cubrir las rejillas de cobre utilizadas para observación en el MET con una solución de formvar al 1%.
- Dejar secar las rejillas al menos durante 5 min

- Colocar la pastilla (4  $\mu$ L) obtenida de la inmunoprecipitación de la vacuna OKA y del LCR de pacientes con EM en brote sobre las rejillas de cobre cubiertas con formvar
- Teñir negativamente con acetato de uranilo al 5% en agua.
- Observar en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011 (Jeol Ltd. Tokio, Japón) a 80 KV.

## 5. Observación de virus por MEB

Materiales:

- Cinta de cobre
- Rejillas de cobre cubiertas con formvar
- Microscopio electrónico de barrido (Jeol Ltd., Tokio, Japón).

Método:

- Las rejillas de cobre cubiertas con formvar al 1% se colocó 4 microlitros de virus y se dejó secar 30 min
- Desecado al punto crítico. Se utilizó el hexametildisilazano (Polysciences, Inc; No. Catálogo: 00692) hasta cubrir la muestra y se dejó secar.
- Colocar las rejillas sobre soportes de microscopio electrónico de barrido utilizando cinta de cobre como conductor.
- Recubrimiento metálico con oro en el aparato Fine Coat ion sputter JFC 1100.
- Visualizar y fotografiar en un microscopio electrónico de barrido (Jeol Ltd., Tokio, Japón).

## 6. Cultivo de fibroblastos humanos de piel

Materiales:

- DMEM (Marca: Gibco, No. Catálogo: 12100-046)
- Suero fetal bovino (Marca: Gibco, No. Catálogo: 16 000-044)
- Solución de penicilina-estreptomina al 1% (Biowest, No. Catálogo: L0022-100)

Método:

- Sembrar  $1.2 \times 10^6$  fibroblastos en botellas de cultivo de  $25 \text{ cm}^2$  a  $37^\circ\text{C}$  con medio enriquecido DMEM más suero fetal bovino al 10 % hasta observar confluencia del 90% (aproximadamente 5 días).
- Cosechar los fibroblastos: se lavan las células con PBS y se adiciona tripsina dejando incubar 5 min a  $37^\circ\text{C}$  y se adiciona medio DMEM más SFB al 10 %
- Sembrar  $2 \times 10^5$  fibroblastos en cajas Petri de 35 mm de diámetro (Corning) a  $37^\circ\text{C}$  hasta obtener una confluencia del 60% (2 días)

## 7. Cultivo de la línea celular VERO C1008 [Vero 76, clone E6, Vero E6] (ATCC® CRL-1586™) e inoculación con vacuna OKA o LCR de pacientes con EM en brote

Materiales:

- Medio enriquecido DMEM (Marca Gibco, No. Catálogo: 12100-046)
- Suero fetal bovino (Marca: Gibco, No. Catálogo: 16 000-044)
- Solución de penicilina-estreptomina al 1% (Biowest, No. Catálogo: L0022-100)

Método:

- Sembrar  $1 \times 10^6$  células en botellas de cultivo Corning de  $25 \text{ cm}^2$  con medio enriquecido DMEM más SFB al 10% adicionado con penicilina-estreptomomicina al 1%
- Incubar a  $37^\circ\text{C}$  por 24h.
- Cosechar las células mediante un lavado de PBS y adicionar tripsina e incubar 5 min a  $37^\circ\text{C}$ , adicionar medio DMEM más SFB al 10% adicionado con antibiótico
- Sembrar  $2 \times 10^5$  en cajas Petri de 35 mm de diámetro (Corning)
- Incubar a  $37^\circ\text{C}$  por 48h
- Inocular con 200  $\mu\text{l}$  de vacuna (OKA-MERCK) o con 100  $\mu\text{l}$  del LCR de pacientes en fase de brote-remisión
- Incubar 72 h a  $37^\circ\text{C}$  en ambiente de  $\text{CO}_2$ .
- Procesar para microscopía confocal o MET

## **8. Propagación del VVZ presente en el LCR**

Materiales:

- Medio enriquecido DMEM (Marca Gibco, No. Catálogo:12100-046)
- Suero fetal bovino (Marca: Gibco, No. Catálogo: 16 000-044)
- Solución de penicilina-estreptomomicina al 1% (Biowest, No. Catálogo: L0022-100)

Método:

- Sembrar  $2 \times 10^5$  células en cajas Corning de 35 mm de diámetro con medio enriquecido DMEM, suero fetal bovino al 10% (Gibco) adicionado con penicilina-estreptomomicina al 1% (Biowest) e incubar 24h a  $37^\circ\text{C}$ .

- Inocular 100 microlitros de LCR de pacientes en fase de brote o de pacientes control e incubar 72 h a 37°C en ambiente de CO<sub>2</sub>.
- Colectar las interacciones y someter a 3 ciclos de choque térmico (de -70° C a 37° C).
- Centrifugar las muestras para eliminar detritos, colectar el sobrenadante, hacer alícuotas y almacenar a -70°C para inocular nuevos cultivos celulares
- Incubar estos cultivos a 37°C por 72 h y procesar para su observación por microscopía electrónica de transmisión o por microscopía confocal.

## **9. Procesamiento para la observación por MET**

Materiales:

- Glutaraldehído al 2.5% en cacodilato de sodio 0.1M
- PBS
- Solución de tetróxido de osmio al 1%, cloruro de calcio 5mM, ferrocianuro 0.8% en cacodilato de sodio
- Etanol al 25%, 50%, 70%, 90% y 100%
- Acetato de uranilo en metanol al 50%
- Citrato de plomo
- Resina Polybed
- Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011 (Jeol Ltd. Tokio, Japón)

Método:

- Inocular los cultivos con 60% de confluencia con la vacuna del VVZ (Okavax) o con los LCRs de los pacientes e incubar a 37° C por 72 h

- Fijar las interacciones de células con la vacuna OKA o con LCR de pacientes con EM o control con 2.5% glutaraldehído, 0.1M cacodilato de sodio, 5mM de cloruro de calcio durante 30 min a temperatura ambiente.
- Lavar 3 veces con cacodilato de sodio al 0.1 M.
- Postfijar con tetróxido de osmio  $\text{OsO}_4$  al 1%, cacodilato de sodio al 0.2M en proporción 1:1 durante 1 hora y lavar 3 veces con cacodilato de sodio al 0.1M
- Lavar con etanol al 25%.
- Deshidratar con etanol al 50%, 70%, 90% y 100% (2 veces) durante 10 minutos.
- Preincluir con etanol al 100% y Polybed 1:1 en la caja Petri e incubar toda la noche a temperatura ambiente. Sellar con papel parafilm para asegurar que la muestra no se seque.
- Cambiar la resina a una proporción 2:1, incubar por 1 hora, realizar 3 cambios de resina pura y polimerizar a 60°C toda la noche.
- Despegar el plástico de la caja Petri, realizar cortes semifinos y teñirlos con azul de toluidina.
- Obtener cortes finos, colocarlos en las rejillas de cobre y contrastarlas con acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo (Reynold's).
- Observar las muestras con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011 (Jeol Ltd. Tokio, Japón) a 80 KV.

## **10. Microscopía confocal de cultivos incubados con la vacuna OKA, con LCR de pacientes o con virus propagados del LCR de pacientes con EM en brote**

### Materiales:

- Anticuerpos anti-VVZ: gB (No. Catálogo: Sc 58074, Santa Cruz Biotechnology) y IE62 (No. Catálogo: SC 58211, Santa Cruz Biotechnology)
- Anticuerpo secundario acoplado a TRITC (1:100) para células Vero E6 y FITC (1:100) para fibroblastos humanos de piel
- Tritón X-100 al 0.1%
- PBS filtrado
- Hoescht (Thermo Fisher Scientific, No. Catalogo: 62249, dilución 1:1000)
- Medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Inc.)
- Microscopio confocal LSM700 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Alemania)

### Método:

- Inocular los cultivos de células Vero E6 con 200  $\mu$ l de vacuna OKA o 100  $\mu$ l de LCR de pacientes o sobrenadantes de virus propagados e incubarlos a 37° C por 72 h
- Fijar las interacciones de células con paraformaldehído al 4% durante 15 min y lavar con PBS
- Permeabilizar con Tritón X-100 al 0.1% en PBS por 15 min a 37°C y lavar con PBS
- Bloquear con SFB al 10% en PBS por 1 h a 37°C y lavar con PBS
- Incubar con una dilución de 1:100 del anticuerpo primario anti-gB o anti-IE62 durante 1 h y lavar con PBS.

- Incubar con anticuerpo secundario acoplado a FITC (1:100) (Sigma, No. Catálogo F9137) durante 1 h a 37°C y lavar con PBS para el cultivo con fibroblastos humanos de piel y para las células Vero E6 se incubo con un anticuerpo secundario acoplado a TRITC (1:100)
- Incubar con Hoescht (Thermo Fisher Scientific, No. Catálogo: 62249, dilución 1:1000) por 5 min a 37°C y lavar con PBS
- Montar con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Inc.)
- Observar en un microscopio confocal LSM700 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Alemania)