

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR

**“Posible participación viral en la neuromielitis óptica de
pacientes mexicanos”**

T E S I S

QUE PRESENTA

Q.C. Adán Hernández Acosta

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Directoras de la Tesis:

Dra. Martha Espinosa Cantellano
Dra. Bibiana Chávez Munguía

Ciudad de México

Febrero, 2020

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Martha Espinosa Cantellano y la Dra. Bibiana Chávez Munguía en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

Agradezco especialmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado (No. de apoyo: 484596 y No. de CVU: 854570) para la realización de la Maestría en Ciencias en la especialidad de Infectómica y Patogénesis Molecular.

Agradecimientos

En este trabajo se plasma el apoyo brindado de muchas personas. Por supuesto, agradezco el apoyo brindado durante la realización de este proyecto a la **Dra. Martha Espinosa Cantellano**, mi tutora. A quien también debo agradecer el permitirme incorporarme a su gran equipo de investigación. También, a la **Dra. Bibiana Chávez Munguía**, cotutora de este trabajo y particularmente a sus enseñanzas de microscopía electrónica, así como sus consejos brindados.

Gracias a mis asesores quienes siempre tuvieron a bien escucharme y pronunciar consejos y apoyo en todo momento. La **Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano** y el **Dr. Adolfo Martínez Palomo**.

A mi equipo de laboratorio y amigos, **Hugo y Patricia**, que fueron de mucha ayuda en los momentos cumbres de este trabajo; de distracción y risas también necesarias para calmar la tensión de los experimentos. Los aprecio, y agradezco mucho sus enseñanzas. A **Karla, Daniel, Liz, Anel** (no se me puede olvidar jaja), **Judith, Ranferi, Gabi y Vale**, de quienes también he aprendido y con quienes he compartido momentos agradables.

En este trabajo conté con el apoyo de la **M.C. Graciela Ordoñez** y el **Dr. Benjamín Pineda** del INNN, gracias. También al **Dr. Juan Ludert** y a su equipo de trabajo: **Mercedes, Romel, Gerson, Juan**. Gracias. Y a la **Dra. Beatriz Xoconostle** y con ella a **Brenda y Leandro**.

Agradezco a la **Dra. Maritza** por invitarme a impartir clases en la FES Iztacala, experiencias bastantes gratas que sin duda repetiría. Claro, también agradezco sus palabras de apoyo y consejos brindados.

Muchas gracias a todos por su apoyo, consejo, discusión de ideas y sobre todo de tomarse el tiempo para hablar de **ciencia**.

Mención especial... Mi familia

Familia, los amo.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN.....	11
SUMMARY.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
• Neuromielitis óptica.....	13
• Manifestaciones clínicas.....	13
• Acuaporina 4: AQP4	15
• Patogénesis	19
• Diagnóstico	21
• Tratamiento.....	21
• Factores de riesgo	23
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPÓTESIS	27
OJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS	28
• Líquido cefalorraquídeo	28
• Obtención de virus como controles positivos.....	28
• Diseño Experimental	30
• Extracción de RNA.....	30
• Síntesis de cDNA (Transcripción Reversa).....	31
• Identificación del producto de PCR (Electroforesis).....	32
• Extracción de DNA	32
• Amplificación y cuantificación del genoma de EBV y HSV-1 (qPCR).....	32
• Análisis de datos.....	33
• Inmunoprecipitación de partículas virales.....	¡Error! Marcador no definido.
• Tinción negativa y microscopía electrónica de transmisión.....	34
RESULTADOS	35

• Diagnóstico de NMO.....	35
• Identificación de DENV en el LCR de pacientes con NMO.....	36
• Identificación de EBV en el LCR de pacientes con NMO.....	38
• Identificación de HSV-1 en el LCR de pacientes con NMO.....	43
• Microscopía electrónica de transmisión.....	47
DISCUSIÓN.....	52
PERSPECTIVAS.....	56
REFERENCIAS.....	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación del volumen de muestra de LCR por cada paciente diagnosticado con NMO	28
Tabla 2. Anticuerpos utilizados contra proteínas expuestas en la envoltura de cada virus ..	34
Tabla 3. Pacientes mexicanos diagnosticados con NMO	35
Tabla 4. Relación de la concentración de RNA extraído del LCR de pacientes mexicanos diagnosticados con NMO	37
Tabla 5. Concentración de partículas virales de EBV en diluciones seriadas 1:10	40
Tabla 6. Concentración de DNA obtenido de muestras de LCR de pacientes mexicanos diagnosticados con NMO	42
Tabla 7. Concentración de partículas virales de HSV-1 en diluciones seriadas 1:10	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tres regiones principales afectadas del sistema nervioso central	14
Figura 2. Biomarcador específico de NMO.....	14
Figura 3. NMO-IgG inmunoprecipita GFP-AQP4 pero no a las proteínas relacionadas del complejo distroglicano	15
Figura 4. Familia de acuaporinas.....	16
Figura 5. Acuaporina 4, proteína transmembranal	17
Figura 6. Expresión de acuaporina 4 en el sistema nervioso central	18
Figura 7. Traducción de señales neuronales y el rol de AQP4.....	18
Figura 8. Patogénesis de NMO.....	20
Figura 9. Algoritmo de tratamiento de la neuromielitis óptica.....	22
Figura 10. Línea del tiempo del diagnóstico de dengue y curso de la enfermedad.....	25
Figura 11. Títulos de anticuerpos contra antígenos específicos de EBV en pacientes con NMO.....	26
Figura 12. Reactividad de anticuerpo IgG contra el HSV-1 en el suero de pacientes con anticuerpos contra AQP4 positivo en enfermedad autoinmune de SNC.....	26
Figura 13. Sobrenadantes de cultivos celulares infectados utilizados.....	29
Figura 14. Esquema del diseño experimental realizado	30
Figura 15. Genoma del DENV	36
Figura 16. Gradiente de temperatura de alineamiento de los iniciadores mD1 y D2.....	37
Figura 17. Ausencia del segmento C-prM de DENV en el LCR de pacientes con NMO....	38
Figura 18. Secuencia genómica del virus Epstein-Barr.....	39
Figura 19. Amplificación del fragmento de la secuencia gp85 del virus Epstein-Barr en controles positivos	40
Figura 20. Curva estándar de detección del virus Epstein-Barr	41
Figura 21. Control negativo de la detección del fragmento gp85 del EBV.....	42
Figura 22. Fragmento de la secuencia gp85 de EBV ausente en LCR de pacientes mexicanos diagnosticados con NMO	43
Figura 23. Secuencia genómica del virus herpes simple tipo 1	43
Figura 24. Amplificación del fragmento de la secuencia gD del virus herpes simple tipo 1 en controles positivos	43
Figura 25. Curva estándar de detección del virus herpes simple tipo 1	45
Figura 26. Control negativo de la detección del fragmento gD del HSV-1	45

Figura 27. Fragmento de la secuencia gD de HSV-1 ausente en LCR de pacientes mexicanos diagnosticados con NMO	46
Figura 28. Virus dengue maduros. Microscopía electrónica de transmisión de referencia..	47
Figura 29. Microscopía electrónica de transmisión del sobrenadante de cultivo de células C6/36 infectadas con el virus dengue-2.....	48
Figura 30. Virus Epstein-Barr. Microscopía electrónica de transmisión de referencia.....	48
Figura 31. Microscopía electrónica de transmisión del sobrenadante de cultivo de células B95.....	49
Figura 32. Virus herpes simple tipo 1. Microscopía electrónica de transmisión de referencia	50
Figura 33. Microscopía electrónica de transmisión del sobrenadante de cultivo de células Vero infectadas.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AQP4	Proteína acuaporina 4
BHE	Barrera hematoencefálica
DENV	Virus dengue
EBV	Epstein-Barr Virus
EM	Esclerosis múltiple
FLAIR	Fluid attenuated inversion recovery
gE	glicoproteína E
gp85	glicoproteína 85
HLA	Antígeno leucocitario humano
HSV-1	Virus herpes simple tipo 1
INNN	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MAC	Complejo de ataque a la membrana
MRI	Imagen de resonancia magnética
MTA	Mielitis transversa aguda
NMO	Neuromielitis óptica
NMO-IgG	Auto-anticuerpo específico en la NMO
NO	Neuritis óptica
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
qPCR	PCR tiempo real (quantitative)
SNC	Sistema nervioso central

RESUMEN

La neuromielitis óptica (NMO) es una enfermedad autoinmune desmielinizante del sistema nervioso central (SNC). Esta enfermedad, de etiología desconocida, afecta a personas en edad productiva y su cronicidad ocasiona discapacidad clínica. Sin embargo, se sugiere que se presenta en individuos genéticamente susceptibles expuestos a factores ambientales, posiblemente infecciosos. Recientemente, se han reportado distintos agentes virales como el virus dengue (DENV), el virus Epstein- Barr (EBV) y el virus herpes simple tipo 1 (HSV-1) asociados a las etapas de brote de NMO. Debido a que estos virus (DENV, EBV, HSV-1) son de relevancia clínica en nuestro país, en este proyecto investigamos su presencia en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con NMO a través de la amplificación de secuencias específicas de los virus por qPCR y PCR y de la visualización por microscopía electrónica de transmisión. Nuestros resultados muestran que los DENV, EBV y HSV-1 no se encuentran presentes en el LCR de los pacientes analizados.

SUMMARY

Neuromyelitis optica (NMO) is an autoimmune demyelinating disorder of the central nervous system (CNS). This disease affects young adults and its chronicity causes clinical disability. The etiology of NMO is unknown. Nevertheless, genetic susceptibility and environmental factors, possibly of infectious nature, have been suggested to play a role in its development. Viruses such as dengue (DENV), Epstein-Barr (EBV) and herpes simplex type 1 (HSV-1) have been associated to outbreak stages of NMO. These viruses are clinically relevant in our country. In this project we investigate the presence of DENV, EBV and HSV-1 in the cerebrospinal fluid of patients with NMO through the amplification of specific sequences by PCR and qPCR and visualization in transmission electron microscopy. Our results show that DENV, EBV and HSV-1 viruses are not present in the CSF of the patients analyzed.

INTRODUCCIÓN

- Neuromielitis óptica.

La neuromielitis óptica (NMO) es una enfermedad autoinmune desmielinizante del sistema nervioso central (SNC). Esta enfermedad afecta a adultos jóvenes y su cronicidad ocasiona discapacidad clínica (Jasiak-Zatonska et al. 2016).

- Manifestaciones clínicas.

La NMO pueden afectar seis regiones del SNC:

1. Nervio óptico
2. Médula espinal
3. Área postrema de la médula dorsal
4. Tronco cerebral
5. Diencefalo
6. Cerebro

Los pacientes presentan signos combinados de neuritis óptica (NO) y mielitis transversa aguda (MTA), por lo cual el padecimiento se describe como neuromielitis óptica. La NO se refiere a la inflamación del nervio óptico. Regularmente se presenta como afectación unilateral. Sin embargo, existen casos de complicación bilateral. La MTA es la inflamación de al menos 3 segmentos contiguos de la médula espinal. Los pacientes con NMO frecuentemente muestran signos de inflamación del segmento que produce el síndrome de área postrema. Esta área se encarga de sensar el tracto gastrointestinal. La inflamación del área postrema produce hipo intratable, vómito, náusea y mareo (Wingerchuk et al. 2015; Shosha et al. 2018) (Figura 1).

La asociación de NO y MTA fue reconocida en 1870 por Thomas C. Allbutt como una entidad particular, pero fue hasta el año 1894 que el neurólogo francés Eugene Devic utilizó el término “neuromielitis óptica” (NMO) por primera vez para describir el

síndrome clínico que asocia a la NO con la MTA y fue catalogado como un subtipo de la esclerosis múltiple (EM) (Wingerchuk et al. 2015).

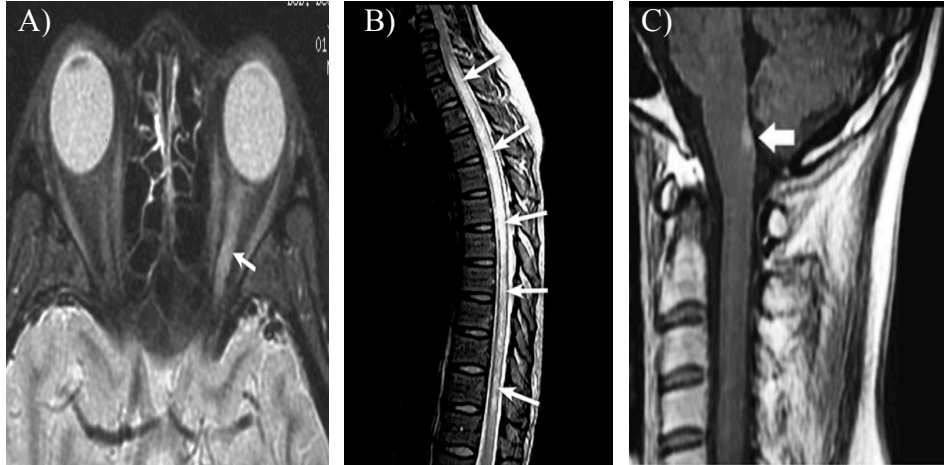


Figura 1. Imágenes de resonancia magnética que muestran las tres regiones principalmente afectadas del sistema nervioso central. A) Neuritis óptica. Inflamación del nervio óptico, causando pérdida de la vista y dolor al movimiento ocular. B) Mielitis transversa. Inflamación de al menos 3 segmentos contiguos de la médula espinal, lo cual provoca la discapacidad clínica observada en estos pacientes. C) Síndrome de área postrema. Inflamación del área postrema que provoca hipo intratable, vómito, náuseas, mareo, entre otros síntomas (Wingerchuk et al. 2015).

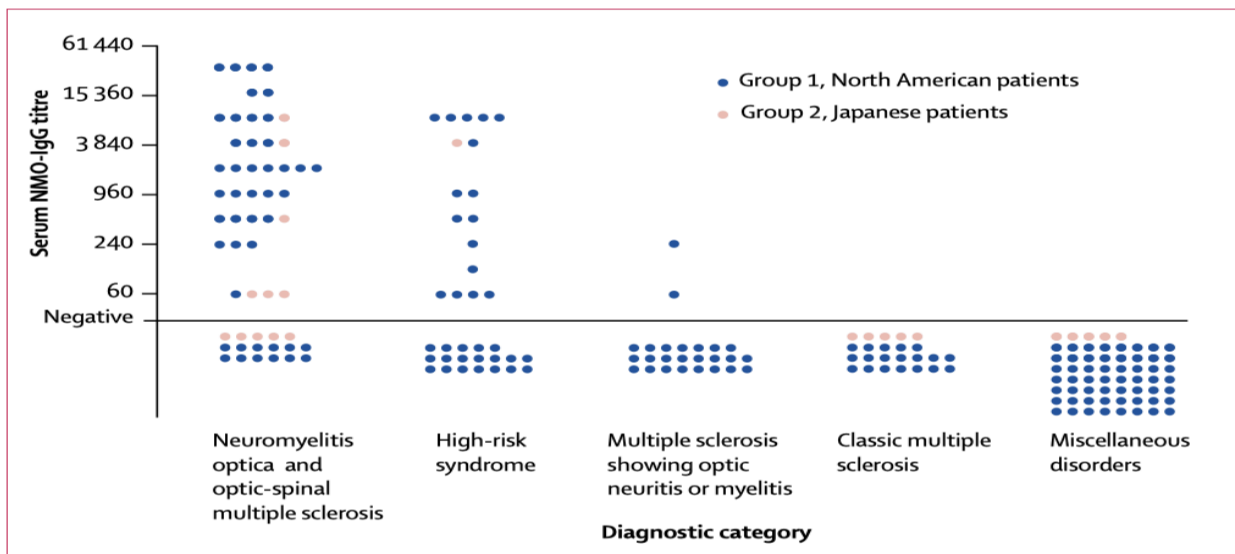


Figura 2. NMO-IgG: Biomarcador específico de NMO. La presencia del auto-anticuerpo NMO-IgG es utilizada para confirmar el diagnóstico de NMO. Esta característica es particular de NMO, puesto que la proteína NMO-IgG no se encuentra en pacientes con EM, ni tampoco con otros desórdenes neurológicos (Lennon et al. 2004).

En 2004, el grupo de la Dra. Lennon en la Clínica Mayo demostró que los pacientes con NMO presentan grandes concentraciones de un auto-anticuerpo, que desde

entonces sirve para realizar el diagnóstico preciso, ya que no se presenta en los pacientes con esclerosis múltiple (Figura 2). El diagnóstico preciso permite ofrecer un tratamiento óptimo, ya que estos pacientes comúnmente sucumben a una falla respiratoria por la mielitis cervical (Lennon et al. 2004).

- Acuaporina 4: AQP4

Después de describir el auto-anticuerpo, el grupo de la Dra. Lennon identificó su proteína blanco: la acuaporina 4 (AQP4). En ese estudio pionero demostró que el autoanticuerpo NMO-IgG reconoce al antígeno en el SNC, pero no en los tejidos periféricos. Asimismo, reportaron que no se une a ninguna de las proteínas que, con la AQP4, forman un complejo en la membrana (Lennon et al. 2005) (Figura 3).

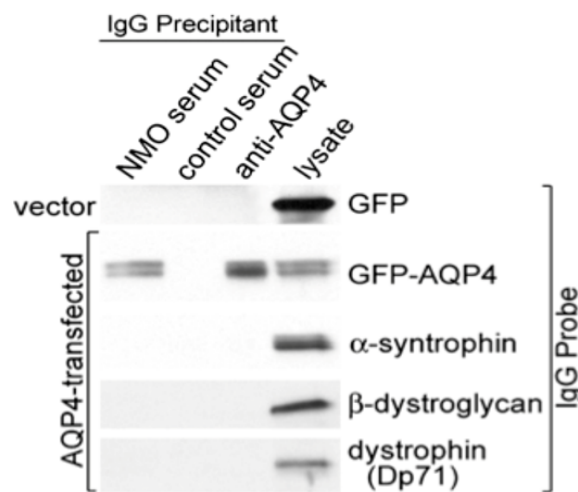


Figura 3. NMO-IgG inmunoprecipita GFP-AQP4 pero no a las proteínas relacionadas del complejo distroglicano. El lisado de células HEK-293 transfectadas fue dividido en 3 alícuotas. Cada una de las alícuotas se utilizó de la siguiente manera: Alícuota 1 + pool de sueros de pacientes NMO, alícuota 2 + pool de sueros de pacientes control y alícuota 3 + anti AQP4-IgG de conejo. Cada alícuota fue incubada con proteína G-agarosa. El complejo fue analizado por Western blot para GFP-AQP4 y para las proteínas del complejo distroglicano. NMO-IgG y AQP4-IgG fueron capturadas por GFP-AQP4. La IgG de pacientes control no capturo GFP-AQP4. IgG no capturó α - sintrofina, β -distroglicano y distrofina(Dp71) (Modificada de Lennon et al. 2005).

La AQP4 pertenece a una familia de proteínas transmembranales. AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 y AQP8 realizan el transporte selectivo de moléculas de agua, mientras que AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10 participan en el transporte de pequeños solutos (Agre and Kozono 2003; Mangiatordi et al. 2016) (Figura 4). La AQP4 presenta dos isoformas que pueden formar homotetrámeros o heterotetrámeros, mejor

conocidos como partículas de arreglos ortogonales. La isoforma M1 consta de 323 aminoácidos y contiene la estructura completa de la proteína, mientras M23 carece de los primeros 22 aminoácidos del extremo amino terminal (Papadopoulos and Verkman 2012) (Figura 5).

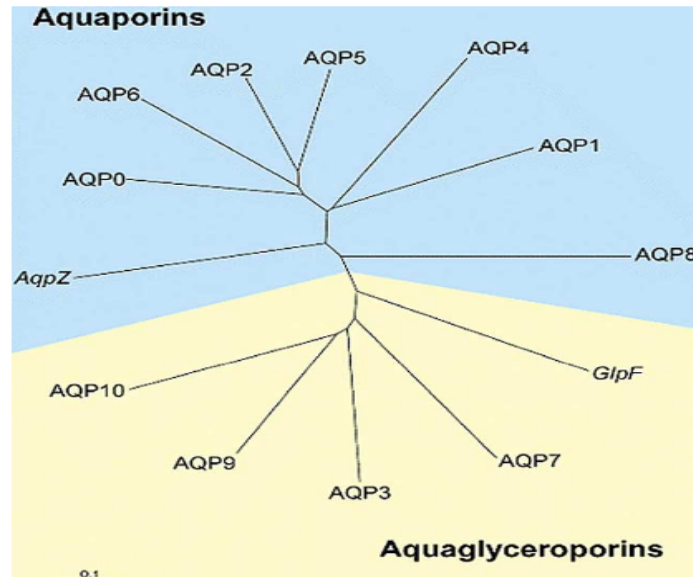


Figura 4. Familia de acuaporinas. En la imagen se presentan las dos subfamilias de las proteínas acuaporinas. En azul, las proteínas transportadoras selectivamente de moléculas de agua. En amarillo, las acuaporinas transportadoras de pequeños solutos, como el glicerol (Agre and Kozono 2003).

NMO-IgG identifica ambas isoformas de AQP4 debido a que el sitio de reconocimiento se encuentra en los loops A, C y D, que se encuentran expuestos en la cara externa de la membrana celular (Figura 5).

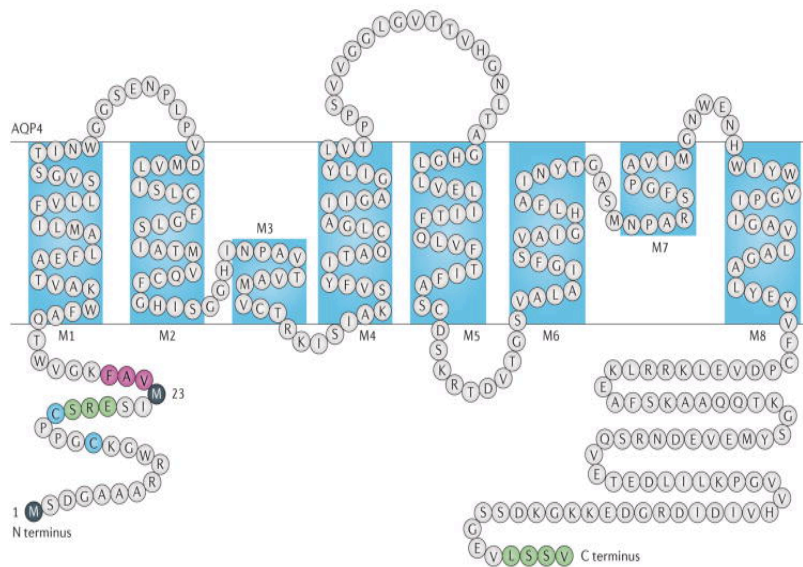


Figura 5. Acuaporina 4, proteína transmembranal. Es una proteína de 8 segmentos heliciciales transmembranales que recorren la membrana celular 6 veces. Los aminoácidos marcados en negro representan las dos isoformas de AQP4: M1 y M23. Los OAPs se forman a través de asociaciones intermoleculares del extremo N-terminal de la isoforma M23 que involucra a los residuos marcados en color morado. Los residuos en color verde evitan las asociaciones de N-terminales entre las isoformas M1. Los residuos de cisteína, en color azul, son sitios de palmitoilación y están involucrados en la regulación del ensamblaje de OAPs. El dominio PDZ en el extremo C-terminal (color verde) puede estar involucrado en la interacción proteína-proteína (Papadopoulos and Verkman 2012).

La AQP4 se expresa en diversos sitios del cuerpo humano, entre ellos el SNC, donde se ha descrito su presencia en el pie perivascular de células astrales o astrocitos, los cuales se encuentran en contacto directo con las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (BHE). La AQP4 también está presente en estructuras sensoriales como las células epiteliales olfatorias y del oído interno, así como en células de Müller del nervio óptico. En estas últimas, hay una distribución de AQP4 semejante a la observada en astrocitos (Papadopoulos and Verkman 2012, 2013; Gleiser et al. 2016) (Figura 6).

AQP4 es reconocido por realizar dos funciones esenciales: el acoplamiento neurovascular y el flujo glimfático. Estudios demuestran que AQP4 es encargado de mantener la dinámica de agua en el espacio pericapilar de los astrocitos y el espacio Virchow-Robin aumentando así el flujo intersticial, puesto que acuaporina 4 interconecta ambos espacios. También, se sabe que el flujo de agua conducido por

AQP4 es necesario para el mantenimiento de la homeostasis de potasio durante la actividad eléctrica, indispensable para la activación neuronal (Nakada et al. 2017) (Figura 7).

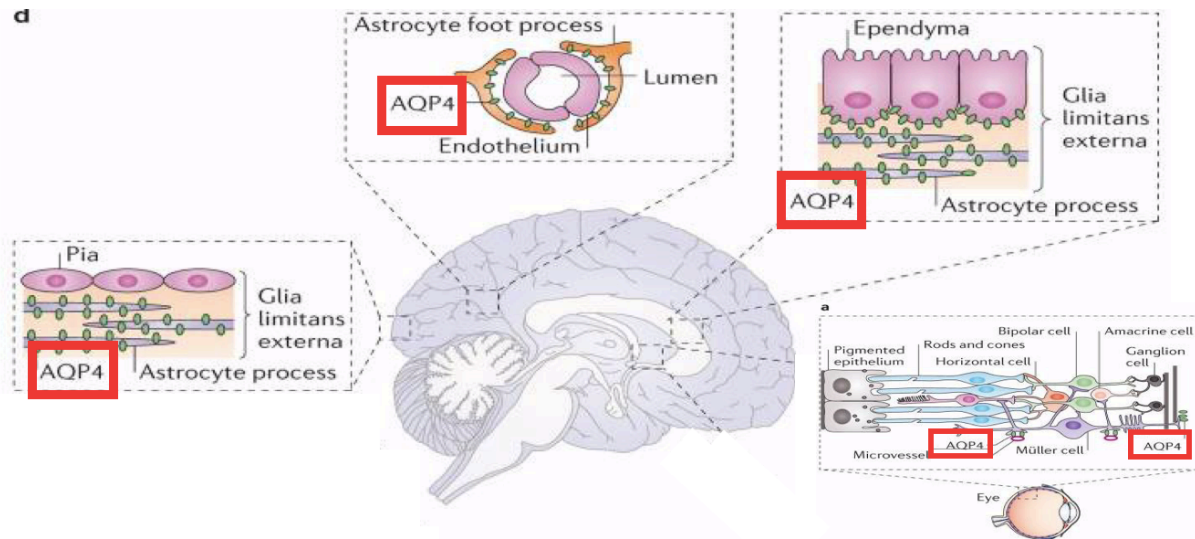


Figura 6. Expresión de acuaporina 4 en el sistema nervioso central. La expresión de acuaporina es altamente polarizada sobre el pie de los astrocitos. Estas células delimitan la glía. AQP4 también es expresado en la membrana basolateral de las células plasmáticas, células endoteliales y astrocitos subependimales. En el nervio óptico AQP4 es expresada en el epitelio ciliar de cara vítrea y sobre las células de Müller (Modificada de Papadopoulos y Verkman 2013).

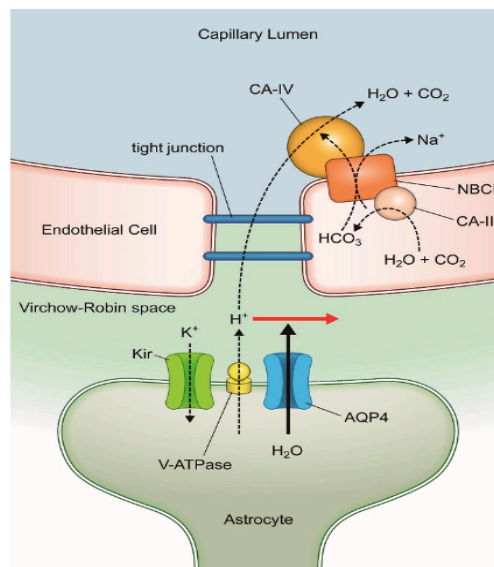


Figura 7. Traducción de señales neuronales y el rol de AQP4. La proteína Kir4.1 es un canal de iones potasio que necesita del rápido flujo de agua conducido por AQP4 para mantener la homeostasis durante la actividad eléctrica y la actividad de V-ATP. La función en conjunto de estos tres canales permite la activación neuronal (Nakada et al. 2017).

- Patogénesis

La interacción de los linfocitos T con los linfocitos B, provoca la diferenciación de estos últimos en células plasmáticas productoras del auto-anticuerpo NMO-IgG, detectado en el SNC de estos pacientes. Sin embargo, la concentración del auto-anticuerpo en el SNC es hasta 500 veces menor que en el sistema periférico (Papadopoulos and Verkman 2013), sugiriendo el transporte del auto-anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica por transcitosis de las células endoteliales (Gleiser et al. 2016; Ratelade and Verkman 2012). La unión de NMO-IgG a su epítipo provoca la internalización del complejo y la consecuente degradación de ambas proteínas. Esto posiblemente desencadene una cascada de señalización en los astrocitos que se traduzca en la secreción de citocinas proinflamatorias, como el TNF, IL-6, IL-1 o IFN- γ (Ratelade and Verkman 2012). Asimismo, el reclutamiento de C1b, proteína iniciadora del complejo de complemento podría provocar lisis celular por activación del complejo de ataque a la membrana (MAC). Estos escenarios provocan el reclutamiento de células del sistema inmunológico que se filtran al SNC. El infiltrado inmunológico al SNC es mayoritariamente compuesto por células granulocíticas. Estas células inician una respuesta citotóxica provocando la muerte de células como neuronas, oligodendrocitos y astrocitos. Al mismo tiempo, la mielina es reconocida y fagocitada por los macrófagos provocando una interrupción en la transmisión de señales de las neuronas. La muerte de oligodendrocitos impide la regeneración de mielina. En conjunto, estas acciones provocan la liberación de PAMPS y DAMPS que mantienen la activación del sistema inmunológico (Hertwig 2016) (Figura 8).

Las características histopatológicas muestran desmielinización perivascular, pérdida de astrocitos y axones, necrosis tanto de la materia blanca como de la materia gris. También se observan vacuolas que contienen mielina, astrocitos reactivos e inflamación granulocítica (Bukhari et al. 2012) (Figura 8).

Aunque se han tratado de desarrollar modelos animales de NMO, aún no se ha logrado reproducir la enfermedad tal como se presenta en humanos. La concentración de astrocitos y células gliales es muy distinta entre el ratón y el humano (Ratelade and

Verkman 2012). La administración sanguínea de IgG anti-AQP4 en ratones no desarrolla la enfermedad, debido a que el anticuerpo se une a AQP4 de órganos periféricos, sin penetrar la barrera hematoencefálica. Los modelos murinos de encefalomiелitis autoinmune experimental muestran que la administración intracerebral del anticuerpo contra la AQP-4 exacerba las lesiones en el SNC y pueden provocar la destrucción de astrocitos perivasculares (Jasiak-Zatonska et al. 2016; Ratelade and Verkman 2012).

Es importante resaltar que el factor inicial de este proceso continúa siendo desconocido.

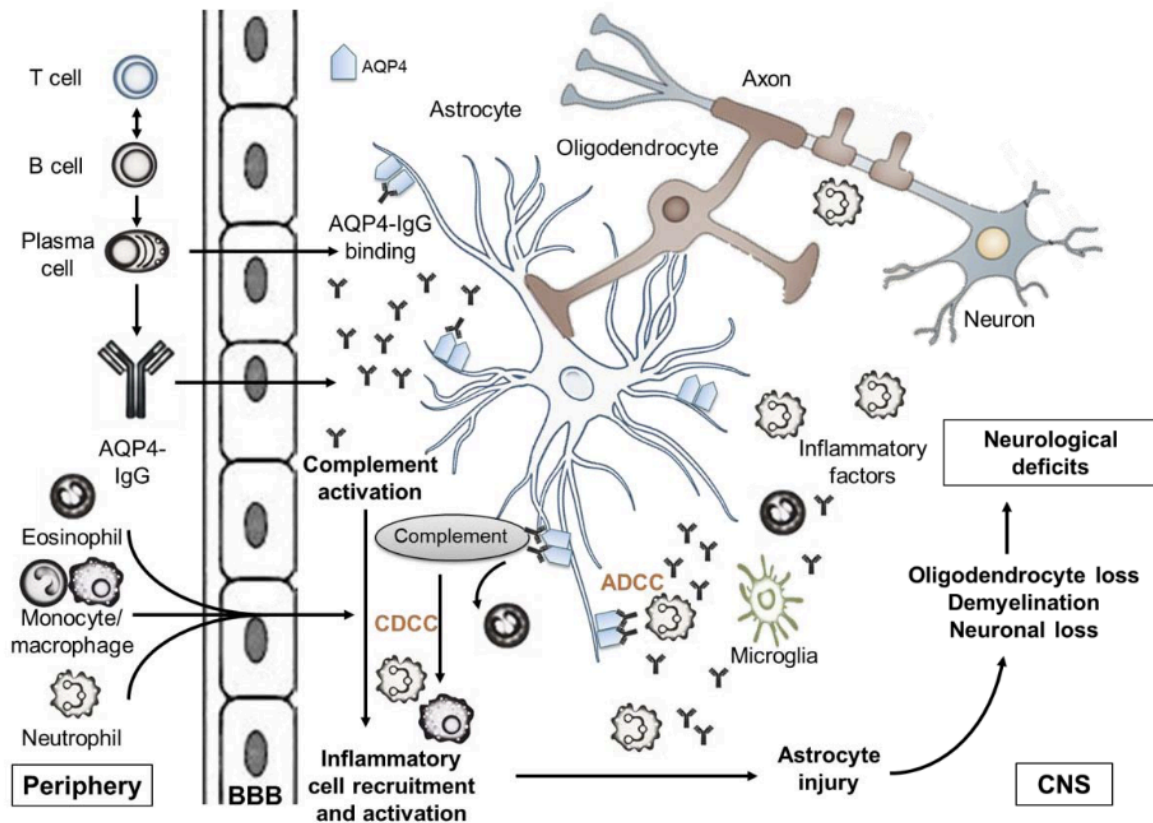


Figura 8. Patogénesis de NMO. La NMO-IgG sintetizada por las células plasmáticas se unen al epítipo AQP4 en el pie de los astrocitos. Esta unión induce la activación del complemento y el reclutamiento de las células inmunes periféricas, principalmente granulocitos y macrófagos. La infiltración resulta en inflamación local con, daño a oligodendrocitos, desmielinización y pérdida neuronal. Lo anterior es mediado por los mecanismos de CDCC y ADCC (Hertwig 2016).

- Diagnóstico

A partir del hallazgo de NMO-IgG, en el documento “*International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders*” se describen los datos clínicos y de laboratorio que permiten confirmar el diagnóstico (Wingerchuk et al. 2015). La neuritis óptica, la mielitis transversa aguda y el síndrome de área postrema representan las características clínicas más importantes en el diagnóstico de NMO. Así mismo, se observan lesiones características en imágenes de resonancia magnética (MRI) en el cerebro, los nervios ópticos o en médula espinal. A estos resultados se suma la detección de NMO-IgG en el suero de los pacientes a través de ensayos de citometría de flujo o ELISA, que ayudan a distinguir la neuromielitis óptica de la esclerosis múltiple y de otras afecciones neurológicas. El líquido cefalorraquídeo obtenido por punción lumbar puede mostrar un nivel considerablemente elevado de leucocitos durante los episodios de NMO, más altos que los que suelen observarse en la EM (Wingerchuk et al. 2015).

- Tratamiento

Se han desarrollado diversas terapias para el tratamiento de NMO (Palace et al. 2012) (Figura 9), las cuales incluyen:

1. Corticoesteroides

En la etapa aguda lo más importante es revertir los síntomas, por lo que los pacientes son tratados con metilprednisolona intravenosa. Este corticoesteroide sintético suprime la reacción inflamatoria al inhibir la activación de linfocitos T. También disminuye la extravasación de células inmunes al SNC y modera la síntesis de citocinas que participan en el proceso inflamatorio, entre otras actividades (Sloka and Stefanelli 2005).

2. Plasmaféresis

El intercambio de plasma es indicado en conjunto con los tratamientos iniciales para los pacientes con NMO o como un segundo tratamiento. En este proceso se separan las células del plasma, se devuelven las células al paciente y se retienen las proteínas contenidas en el plasma, entre las cuales

se encuentran los auto-anticuerpos que desencadenan la reacción inflamatoria (Huang et al. 2018; Borisow et al. 2018). El organismo sustituye rápidamente el plasma retenido.

3. Drogas inmunosupresoras

Para prevenir futuros ataques de neuromielitis óptica se recomienda tomar medicamentos que inhiben el sistema inmunitario. Algunos de estos pueden ser azatioprina (causa efectos antiproliferativos de células del sistema inmune), rituximab (induce la depleción de los linfocitos B CD20+, precursores de células plasmáticas) y micofenolato mofetil (inhibidor de la proliferación de linfocitos B y T) (Huang et al. 2018; Borisow et al. 2018).

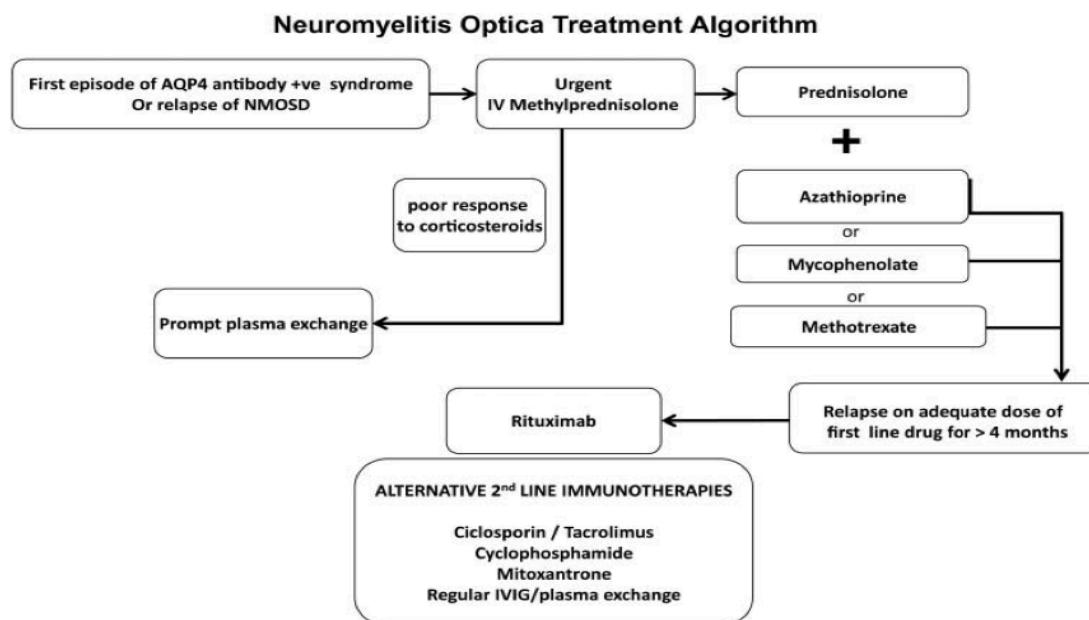


Figura 9. Algoritmo de tratamiento de la neuromielitis óptica (Palace et al. 2012).

4. Administración de anticuerpo AQP4-IgG

Aquapuromab es un anticuerpo que reconoce a la NMO-IgG en el suero de pacientes. Al ser eliminado el anticuerpo, se impide la activación del complemento y la citotoxicidad mediada por células (Jasiak-Zatonska et al. 2016; Ratelade and Verkman 2012).

5. Inhibidores de proteasas

El sivelestat es un inhibidor de proteasas de neutrófilos, que impide la entrada de estas células a las lesiones y tejidos dañados (Huang et al. 2018; Borisow et al. 2018).

- Factores de riesgo

La NMO es más frecuente en el sexo femenino, con incidencias que van desde 2:1 a 10:1 en relación con la población masculina (Jasiak-Zatonska et al. 2016). Así mismo, hay mayor propensión en el último trimestre del embarazo o después del parto (Delgado-García et al. 2018). La edad media de presentación de la enfermedad es de 39 años (Wingerchuk et al. 2015; Jasiak-Zatonska et al. 2016), aunque también existe la NMO infantil, que afecta a niños de alrededor de 12 años, con mayor prevalencia en niñas que niños en una proporción de 7:1. La NMO infantil representa del 3%-5% de los casos totales de NMO (Ghezzi et al. 2016; Tenenbaum et al. 2016). La prevalencia de NMO es de 1-3 por cada 100,000 habitantes en el mundo (Jasiak-Zatonska et al. 2016). La prevalencia es mayor (20% - 40%) en poblaciones del oeste de India y Asia, mientras que se presenta en sólo el 1% a 2% de personas caucásicas del norte de América o Australia (Rivas Alonso et al. 2017). La enfermedad se ha asociado con el haplotipo HLA DPBI*0501 en población asiática y HLA DRB1*0301 en la población blanca (Yamasaki et al. 1999). En México se estima una prevalencia de NMO de 1/100,000 habitantes en la población mestiza, con una frecuencia relativa del 8% a 11.5% en relación a los casos de EM (Alonso et al. 2018) (Rivera et al. 2008). Como se ha descrito en otras poblaciones, en México las mujeres son más afectadas que los hombres, la media de edad de diagnóstico es de 43 años y el comportamiento de la enfermedad es progresivo. Lamentablemente, al momento de diagnóstico los pacientes usualmente presentan discapacidad relativa o severa (Alonso et al. 2018), lo que implica que necesitan ayuda para realizar sus actividades cotidianas (Kurtzke 2015; Şen 2018). Como se ha descrito la NMO se presenta en individuos genéticamente susceptibles, expuestos a factores ambientales o infecciosos como las bacterias (Koga et al. 2011; Feng et al. 2010) o virus (Marin Collazo et al. 2018; Koga et al. 2011; Mori et al. 2011; Nakamura et al. 2011; Olindo et al. 2010; Sellner et al. 2010).

Investigaciones recientes han asociado a los virus con algunos padecimientos neurológicos, como el Alzheimer (Harris and Harris 2018), Parkinson (Abushouk et al. 2017) y la esclerosis múltiple (Sotelo et al. 2008). Nuestro grupo de investigación ha identificado al VVZ en el LCR de pacientes con EM en brote a través de la detección de ADN viral y ha demostrado la infectividad de estos virus en células Vero E6 (Hernández-González et al. 2018). Sin embargo, es difícil determinar si la reactivación del virus provoca la recaída clínica de estos pacientes o la recaída provoca la reactivación del virus.

Recientemente también se han asociado agentes virales a las etapas de brote de NMO: virus dengue (DENV) (Lana-Peixoto et al. 2018; Miranda de Sousa et al. 2006; Puccioni-Sohler et al. 2017), Epstein- Barr (EBV) (Levinson et al. 2018; Masuda et al. 2015) y herpes simple (HSV-1) (Sellner et al. 2010).

El grupo de Lana-Peixoto (2018) presenta dos casos que inician con síndrome febril, son diagnosticados con dengue, confirmado por ensayos de ELISA, y tratados para este padecimiento. Sin embargo, meses después presentan paraparesis, diplopía, vértigo y vómito. Se les indica tratamiento de metilprednisolona intravenosa y plasmaféresis. Los estudios neurológicos con FLAIR y MRI muestran lesiones cerebrales y de médula espinal. Utilizando un ensayo basado en células de HEK293 transfectadas con la isoforma M23 de AQP4 se determinó la presencia en suero de anticuerpos contra este canal de agua.

El Dr. Miranda de Sousa (2006) presentó el caso de una joven brasileña de 11 años de edad, de ascendencia japonesa, quien desarrollo NMO después de presentar infección por dengue. La infección por dengue fue confirmada por la presencia de anticuerpos IgM en suero y LCR. La NMO fue diagnosticada por IRM, observándose lesiones en nervio óptico y médula espinal.

El grupo del Dr. Renato Santana reporta el caso de una joven brasileña con un desorden del espectro de neuromielitis óptica. La investigación retrospectiva de enfermedades infecciosas detectó RNA del virus dengue en suero pero no en líquido cefalorraquídeo a través de PCR-transcripción reversa. El virus DENV-1 fue caracterizado a través del análisis filogenético de la secuencia de la cápside viral. Complementario a este resultado, se observó la presencia de inmunoglobulina G (IgG) contra el DENV-1 en el LCR de la paciente en etapas avanzadas del padecimiento (Figura 10) (Puccioni-Sohler et al. 2017).

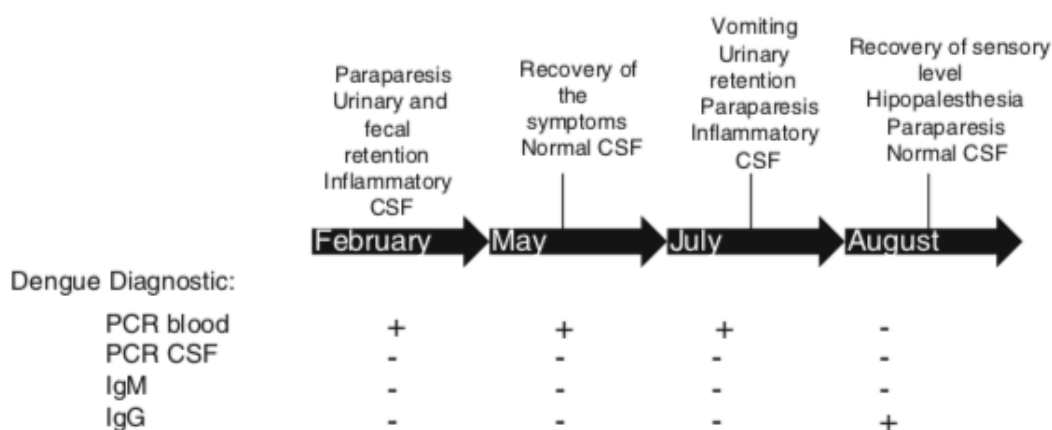


Figura 10. Línea de tiempo del diagnóstico de dengue y curso de la enfermedad. Se observó la presencia del genoma vírico en sangre y la presencia de anticuerpo de memoria (Puccioni-Sholer et al. 2017).

Levinson y colaboradores reportaron el caso de una paciente femenina que presentaba debilidad intermitente de extremidades inferiores. Al realizar la técnica “Fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR)” se observaron lesiones intramedulares en la región torácica, por lo que se procedió con la búsqueda de autoinmunidad y agentes infecciosos. Se encontraron anticuerpos contra AQP4 en suero y positividad para el virus Epstein Barr en LCR (Levinson et al. 2018). Por su parte, Masuda y colaboradores encuentran una correlación directa entre los niveles de AQP4-IgG y anticuerpos anti-EA, una proteína de expresión temprana de EBV (Figura 11) (Masuda et al. 2015).

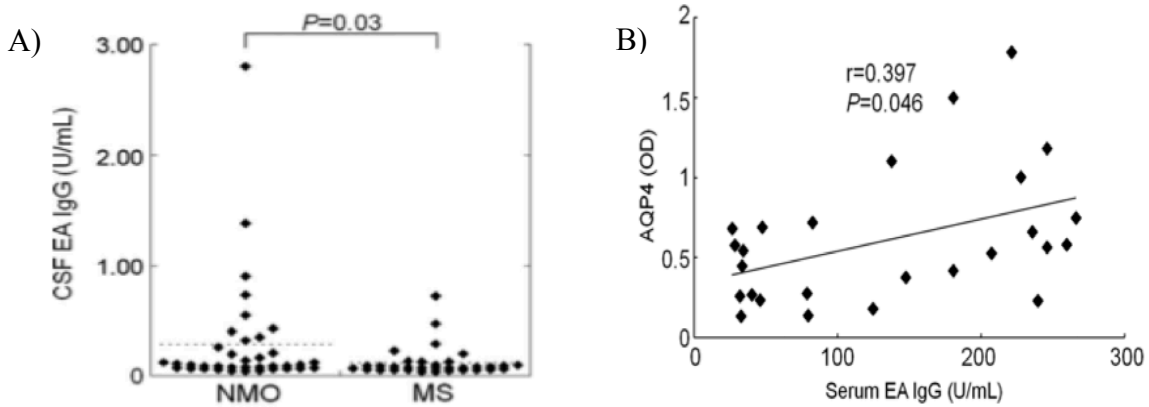


Figura 11. Títulos de anticuerpos contra antígenos específicos de EBV en pacientes con NMO. A) Los títulos de anticuerpos EA IgG fueron significativamente más altos en el LCR de pacientes con NMO en comparación con pacientes de EM. B) Correlación directa entre la presencia de NMO-IgG y los títulos de anticuerpos contra EA IgG (Modificada de Masuda et al. 2015).

Finalmente, en un estudio comparativo Sellner y colaboradores muestran una diferencia significativa de anticuerpos IgG contra el virus HSV-1 en el suero de pacientes que padecen NMO en comparación con los pacientes control. No obstante, los porcentajes del anticuerpo entre los pacientes con NMO y aquellos con EM no muestran diferencias estadísticamente significativas (Figura 12) (Sellner et al. 2010).

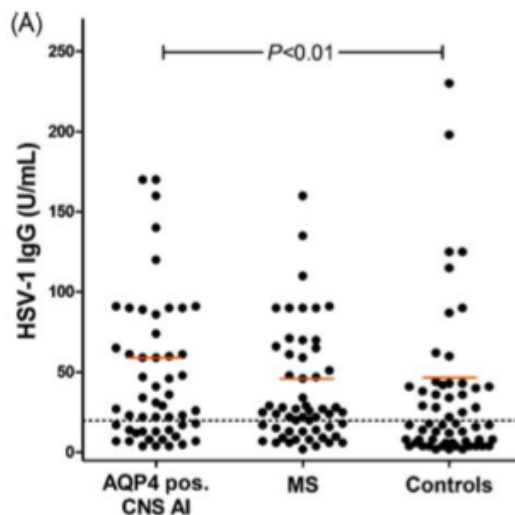


Figura 12. Reactividad de anticuerpo IgG contra el HSV-1 en el suero de pacientes con anticuerpos contra AQP4 positivo en enfermedad autoinmune de SNC.

JUSTIFICACIÓN

La relación entre la NMO y agentes infecciosos como los virus es aún incierta. En este proyecto proponemos investigar la posible presencia del virus dengue, Epstein Barr o herpes simple tipo 1 en el líquido cefalorraquídeo de estos pacientes.

HIPÓTESIS

Los virus dengue, Epstein Barr o herpes simple tipo 1 se encuentran presentes en el líquido cefalorraquídeo de pacientes mexicanos con NMO.

OJETIVO GENERAL

Analizar la presencia del virus dengue, Epstein Barr o herpes simple tipo 1 en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con NMO.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener muestras de LCR de pacientes con NMO.
- Identificar secuencias específicas del virus dengue, Epstein Barr o herpes simple tipo 1 en el LCR de pacientes diagnosticados con NMO, a través de PCR-transcripción reversa y PCR- tiempo real.
- Mostrar la presencia de los virus dengue, Epstein Barr o herpes simple tipo 1 en el LCR de pacientes con NMO, a través de microscopía electrónica de transmisión.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Líquido cefalorraquídeo

Con el apoyo del Laboratorio de Neuroinmunología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) “Manuel Velasco Suárez” se obtuvieron 9 muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes mexicanos con diagnóstico confirmado de NMO. Las muestras de líquido cefalorraquídeo fueron obtenidas por punción lumbar y almacenadas a -80 °C. En la Tabla 1 se muestra la relación de pacientes, cuyas muestras de LCR fueron utilizadas en este trabajo.

Tabla 1. Relación del volumen de muestra de LCR por cada paciente diagnosticado con NMO.

PACIENTE	DIAGNOSTICO	AÑO DE TOMA DE MUESTRA	TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO	AÑOS DE ALMACENAMIENTO	VOLUMEN DE MUESTRA
054	NMO	2008	- 80 °C	12	2200 µl
068	NMO	2009	- 80 °C	11	1600 µl
074	NMO	2009	- 80 °C	11	1300 µl
082	NMO	2009	- 80 °C	11	500 µl
176	NMO	2011	- 80 °C	9	1000 µl
207	NMO	2012	- 80 °C	8	1900 µl
275	NMO	2015	- 80 °C	5	2300 µl
343	NMO	2017	- 80 °C	3	700 µl
345	NMO	2017	- 80 °C	3	1300 µl

- Obtención de virus como controles positivos

El virus dengue fue amablemente proporcionado por el Dr. Juan E. Ludert León, del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Cinvestav. Se utilizó el serotipo DENV2 cultivado en células C6/36 (células de larva de *Aedes albopictus*), el virus se encontraba en una concentración de 1.6×10^6 unidades formadoras de focos.

Las células B95-8 fueron proporcionadas por el Dr. Ezequiel M. Fuentes Pananá de la Unidad de Investigación en Virología y Cáncer del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. Las células B95-8 (linfocitos de mono tamarindo cabeza de algodón) son

células inmortalizadas que integraron el genoma viral de EBV. A través de la inducción del cultivo celular con PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) y butirato de sodio se forman los viriones de EBV. El stock inicial fue de 500,000 células/mL.

La cepa KOS del virus HSV-1 fue cultivada en monocapas de células Vero (línea celular de riñón de mono verde africano) y se obtuvo el sobrenadante, proporcionado por el Departamento de Neuroinmunología del INNN (Figura 13).



Figura 13. Los sobrenadantes de los cultivos celulares infectados con los diferentes virus fueron utilizados como fuente de virus para los controles positivos.

- Diseño Experimental

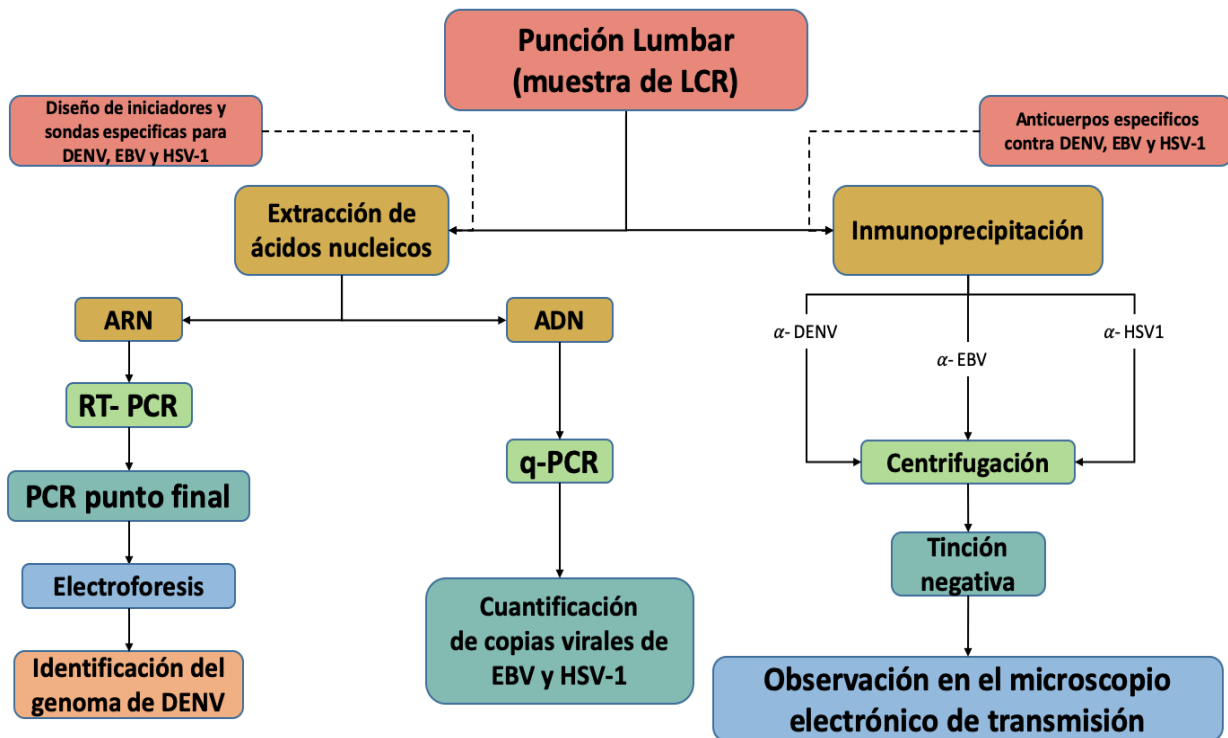


Figura 14. Esquema del diseño experimental.

- Extracción de RNA

Se realizó la extracción de RNA de acuerdo al protocolo “Direct-zol™ RNA MiniPrep” de la marca ZYMO RESEARCH, con número de catálogo R2052, siguiendo la técnica de preparación de muestra “Biological liquids” que incluye a “CSF (Cerebral Spinal Fluid)”. En el paso 5 la muestra se resuspendió en 30 µl, en lugar de los 50 µl de agua libre de DNAsas que indica el protocolo original. Éste puede ser consultado en la siguiente dirección: https://files.zymoresearch.com/protocols/_r2050_r2051_r2052_r2053_direct-zol_rna_miniprep.pdf.

- Síntesis de cDNA (Transcripción Reversa)

El RNA extraído fue empleado para la síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA). Del cDNA se amplificó un fragmento de las proteínas C (cápside) y prM (membrana) del virus dengue (DENV) y un fragmento de β – actina (control).

Los iniciadores forward (mD1^b) y reverse (D2) amplifican un fragmento de 511 pb común en los cuatro serotipos de DENV. Las secuencias de los iniciadores fueron obtenidas de la publicación de Chien (Chien et al. 2006). La amplificación del gen de β -actina se realizó con el iniciador forward (GAAGTCCAGGGCGACGTAGCAC) y reverse (AGGCCAACCGCGAGAAGATGACC), que dan un producto de 285 bases. Ambos pares de iniciadores pueden unirse a su secuencia blanco a 60°C.

Se utilizó el sistema “SuperScript[®] III One-Step RT-PCR with Platinum[®] Taq” de Invitrogen (No. catálogo 12574-026). La reacción se llevó a cabo como sigue:

- Water, nuclease-free 3 μ l
- 2X Reaction Mix 6.25 μ l
- Primer Forward 0.5 μ l
- Primer Reverse 0.5 μ l
- SuperScript[™] III RT/Platinum[™] Taq Mix 0.25 μ l
- RNA 2 μ l

Los reactivos se mezclaron en un tubo Eppendorf estéril, con un volumen final de 12.5 μ l para cada reacción. Después de una breve centrifugación los tubos se colocaron en un termociclador BioRad T100[™] con la siguiente programación:

- 50 °C / 30 minutos } 1 ciclo (Retrotranscripción)
- 94 °C / 2 minutos
- 94 °C / 15 segundos } 40 ciclos
- 60 °C / 30 segundos
- 72 °C / 35 segundos
- 72 °C / 10 minutos

- 16 °C / ∞

- Identificación del producto de PCR (Electroforesis)

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. A los 12.5 µl de producto se añadieron 2 µl de buffer de carga con tinción de DNA (# catálogo: PCR-255-gr, de Jenna Bioscience) (60 mM Tris-HCl (pH 7.5), 60 mM EDTA, 50 % (w/v) Glycerol, xylene cyanol FF, Tartrazine, SYBR®) y se cargaron 7 µl en cada pozo del gel y se incluyó un marcador de peso molecular de 100 pb. Se realizó la electroforesis a 90 V durante 35 minutos.

- Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó de acuerdo a la técnica de QIAGEN en su protocolo "DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)". Se utilizó el kit QIAamp® DNA Mini Kit con número de catálogo 51306. En el paso 11 la mezcla se resuspendió en 30 µl, en lugar de los 200 µl de agua libre de Dnasa o Buffer AE que sugiere el protocolo original. Éste puede ser consultado en QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook, pagina 26.

- Amplificación y cuantificación del genoma de EBV y HSV-1 (qPCR)

Los virus de la familia Herpesviridae son virus DNA. La detección de estos virus se realizó por la técnica de PCR tiempo real (qPCR) a través de sondas Taqman. La secuencia de los tres pares de iniciadores forward y reverse, así como de la sonda Taqman se encuentran publicados (Sotelo et al. 2014). Cada par de iniciadores amplifica un fragmento del genoma del virus EBV o HSV-1. El tercer par de iniciadores amplifica un fragmento del gen RNasa P, que se utilizó como control de extracción y amplificación de un gen endógeno.

Se realizó una curva con diluciones seriadas del DNA total extraído de cada uno de los cultivos virales para determinar el límite de detección de las muestras.

Las muestras problema fueron analizadas por triplicado utilizando el DNA extraído de los LCRs de pacientes diagnosticados con NMO. Se utilizó un termociclador ABI 7500 Fast Real Time PCR System con la siguiente programación:

- 94 °C / 2 minutos
 - 94 °C / 15 segundos
 - 60 °C / 30 segundos
 - 72 °C / 35 segundos
 - 72 °C / 10 minutos
 - 16 °C / ∞
- } 40 ciclos

- Análisis de datos

Para determinar el número de copias del genoma viral en la muestra analizada se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Moléculas}}{\mu\text{L}} = \frac{\text{Concentración } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right) \times 6.022 \times 10^{23} \left(\frac{\text{moléculas}}{\text{mol}}\right)}{\text{longitud (bp)} \times 1 \times 10^9 \left(\frac{\text{ng}}{\text{g}}\right) \times 650 \left(\frac{\text{g} \times \text{mol}}{\text{bp}}\right)}$$

- Inmunoprecipitación de partículas virales

Se centrifugaron 100 µl del sobrenadante de cada uno de los cultivos celulares a 2900 rpm durante 40 minutos. Se utilizó una centrifuga Eppendorf 5402 con un rotor de 18 plazas para tubos 1.5-2.0 ml, con un radio de 7.3 cm. Se recuperaron los sobrenadantes, y se añadió 1 µl de anticuerpo específico para cada uno de los virus por cada 20 µl de sobrenadante (Tabla 2). Los anticuerpos seleccionados para utilizarse en las muestras clínicas fueron anti-gE para el virus dengue, anti-gp350 para EBV y anti-gE para HSV-1, puesto que mostraron mejores resultados en la visualización de los virus. Las muestras se incubaron toda una noche en agitación mínima a temperatura ambiente.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para identificar proteínas expuestas en la envoltura de cada virus.

Anticuerpos Utilizados		
Virus Blanco	Proteína Blanco	# Catálogo
DENV	glicoproteína E	4G2 clone Hb 119
EBV	glicoproteína 110	sc-56980
	glicoproteína 350	sc-56981
HSV-1	glicoproteína E	sc-58153
	glicoproteína D	sc-21719

- Tinción negativa y microscopía electrónica de transmisión.

Las muestras se sometieron a centrifugación por 30 minutos a 14000 rpm en una centrifuga Eppendorf 5402. El sobrenadante se separó y se tomaron 2 µl de la pastilla, que fueron colocados sobre una rejilla de cobre de 400 cuadrículas, recubiertas previamente con formvar en una de sus caras. Se dejó secar 5 minutos a temperatura ambiente y se retiró el exceso de líquido con papel filtro antes de agregar 2 µl de solución de ácido fosfotúngstico. Se dejó secar por 1 minuto y nuevamente se retiró el exceso con un papel filtro. Se recubrió la muestra con carbono utilizando un equipo JEE-400 Vacuum Evaporator. Las rejillas fueron observadas en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011.

Resultados

- Diagnóstico de NMO

Los pacientes fueron diagnosticados de acuerdo a los criterios descritos en el “*International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders*”. Se analizaron los LCRs de 9 pacientes con diagnóstico confirmado de NMO. Todos ellos son mexicanos de nacimiento, igual que sus padres y abuelos.

Estos pacientes presentaban signos hiperinflamatorios. La resonancia magnética realizada a cada uno de ellos muestra inflamación en uno o ambos nervios ópticos e imágenes de mielitis transversa aguda (MTA). No obstante, la presencia de inflamación en el área postrema, la sintomatología correspondiente al síndrome del área postrema fue variado entre los pacientes.

De los 9 pacientes, 6 eran mujeres y 3 hombres, manteniendo una relación de 2:1, en coincidencia con lo reportado en la literatura. La edad promedio al momento del diagnóstico fue de 35.78 ± 10.18 años y el tiempo promedio de evolución de la enfermedad era de 7.06 ± 3.38 años. Ninguno de ellos reportó infecciones virales recientes. Ocho de los nueve pacientes presentaron anticuerpos NMO-IgG positivos, mientras que el resultado del noveno paciente no fue concluyente (Tabla 3).

Tabla 3. Datos generales de los pacientes con NMO incluidos en el estudio.

Paciente	Lugar de nacimiento	Género	Edad (años)	Tiempo de evolución (años)	
1	CdMx	F	23	10	
2	Edo. Mex	F	37	10	
3	CdMx	F	29	8.5	
4	Edo. México	F	43	7	
5	Hidalgo	F	48	6	
6	Oaxaca	F	32	2	
7	CdMx	M	53	12	
8	Sinaloa	M	29	5	
9	Michoacán	M	28	3	
			35.78	7.06	Promedio
			10.18	3.38	SD

- Identificación de DENV en el LCR de pacientes con NMO

El DENV es un miembro de la familia Flaviviridae. Es un virus de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb de longitud, que contiene una secuencia cap 5' (m7GpppAmN). La cadena de RNA de los flavivirus carece de la cola de poliadenilatos en el extremo 3', que se encuentra presente en otros RNAs. El genoma codifica un marco de lectura abierto (open reading frame, ORF) de aproximadamente 3400 codones, flanqueado en los extremos 5' y 3' por regiones no codificantes de aproximadamente 100 nucleótidos y 400 a 700 nucleótidos, respectivamente (Figura 15) (Liu 2014).

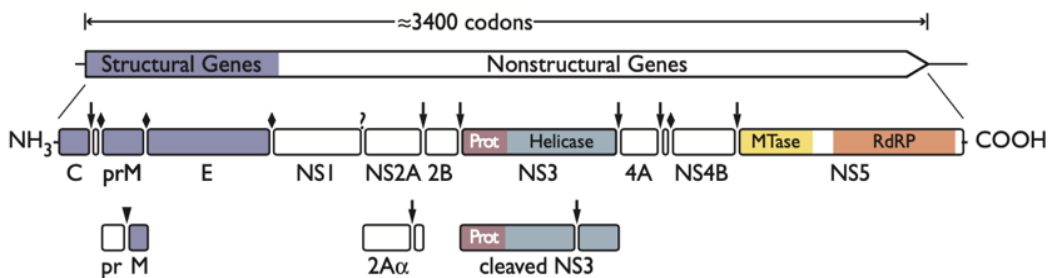


Figura 15. Genoma del DENV. El genoma se procesa como una poliproteína precursora, que es sujeta a proteólisis para generar proteínas maduras. Las proteínas marcadas de color morado son proteínas estructurales, mientras que las marcadas de color blanco corresponden a proteínas no estructurales. Las flechas indican los puntos de escisión proteica (Liu 2014).

Los iniciadores utilizados amplifican una secuencia del fragmento C y prM del genoma, generando un producto de 511 bases. Para establecer las condiciones óptimas de amplificación se utilizó el RNA extraído del sobrenadante de cultivo celular C6/36 infectado con el virus DENV-2.

La eficiencia de alineamiento de los iniciadores se probó realizando una reacción de RT-PCR en un gradiente de temperatura de alineamiento 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C y 62°C. Con todas se logra un buen alineamiento y amplificación de la secuencia específica, como se observa en el gel de agarosa al 2.5% de la Figura 16.

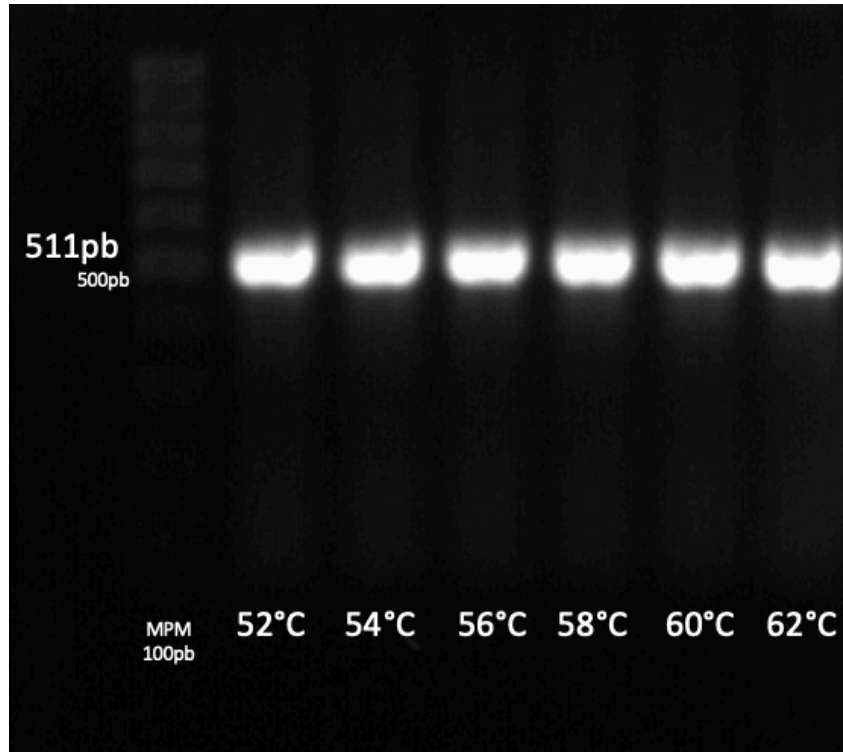


Figura 16. Gradiente de temperatura de alineamiento de los iniciadores mD1 y D2. Los iniciadores se probaron en un gradiente de temperatura para determinar la temperatura óptima de alineamiento para amplificar un producto de 511 pb. Los iniciadores fueron finalmente utilizados a 60°C permitiendo realizar la reacción de PCR en paralelo con los iniciadores de actina.

Enseguida, se realizó la extracción de RNA de 6 de las nueve muestras de LCR de los pacientes con NMO, debido a que de 3 de los pacientes se contaba con muy poco volumen. La concentración de RNA obtenida de los seis pacientes incluidos en el análisis se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Relación de la concentración de RNA extraído del LCR de los pacientes con NMO.

Paciente	Vol. Utilizado	Concentración de RNA
054	400 μ l	5.5 ng/ μ l
068	400 μ l	12.2 ng/ μ l
074	400 μ l	8.7 ng/ μ l
207	400 μ l	6.0 ng/ μ l
275	400 μ l	3.2 ng/ μ l
343	400 μ l	6.2 ng/ μ l

Con el RNA extraído del LCR de cada paciente se realizó la RT-PCR para la amplificación de la secuencia genómica C-prM del virus DENV. Como se observa en la Figura 17A, el producto de RT-PCR de 511 bases esperado de la amplificación de la secuencia genómica C-prM no se encuentra en el LCR de los pacientes. Como control positivo se amplificó un fragmento del gen de β -actina (Figura 17B). Los resultados confirman la adecuada extracción de RNA y la preservación de éste.

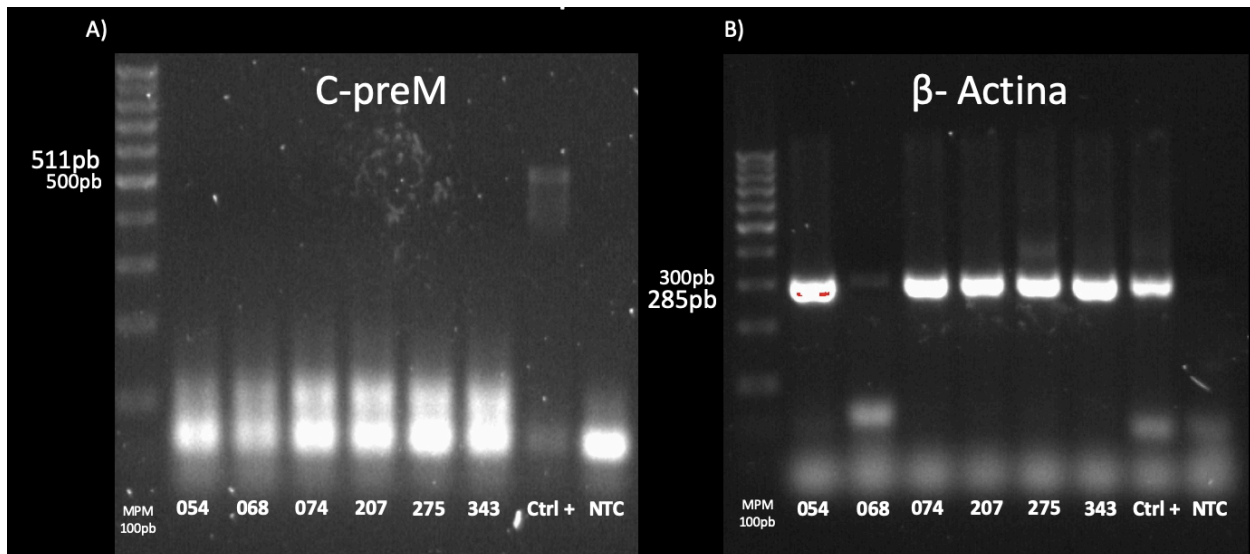


Figura 17. Ausencia del segmento C-prM de DENV en el LCR de pacientes con NMO. A) Los iniciadores amplificaron un producto de 511 pb en el cDNA del sobrenadante del cultivo celular infectado con DENV2 (Ctrl+), pero no en el cDNA de las muestras de LCR de los pacientes. B) Los iniciadores utilizados en el cDNA del LCR de los pacientes y del sobrenadante del cultivo celular infectado con DENV2 amplificaron un fragmento de 285pb del gen de β -actina, confirmando una adecuada extracción de RNA. NTC = No template control.

- Identificación de EBV en el LCR de pacientes con NMO

La detección de los virus de la familia Herpesviridae se realizó a través de la técnica de PCR-tiempo real (q-PCR).

Para la detección del virus EBV se utilizó un par de iniciadores que amplifican un fragmento de la secuencia genómica de la proteína gp85, también conocida como BZLF2) (Liu 2014). Para la identificación específica se utilizó una sonda Taqman que se une en el aminoácido 1523 (Figura 18) (Sotelo et al. 2014).

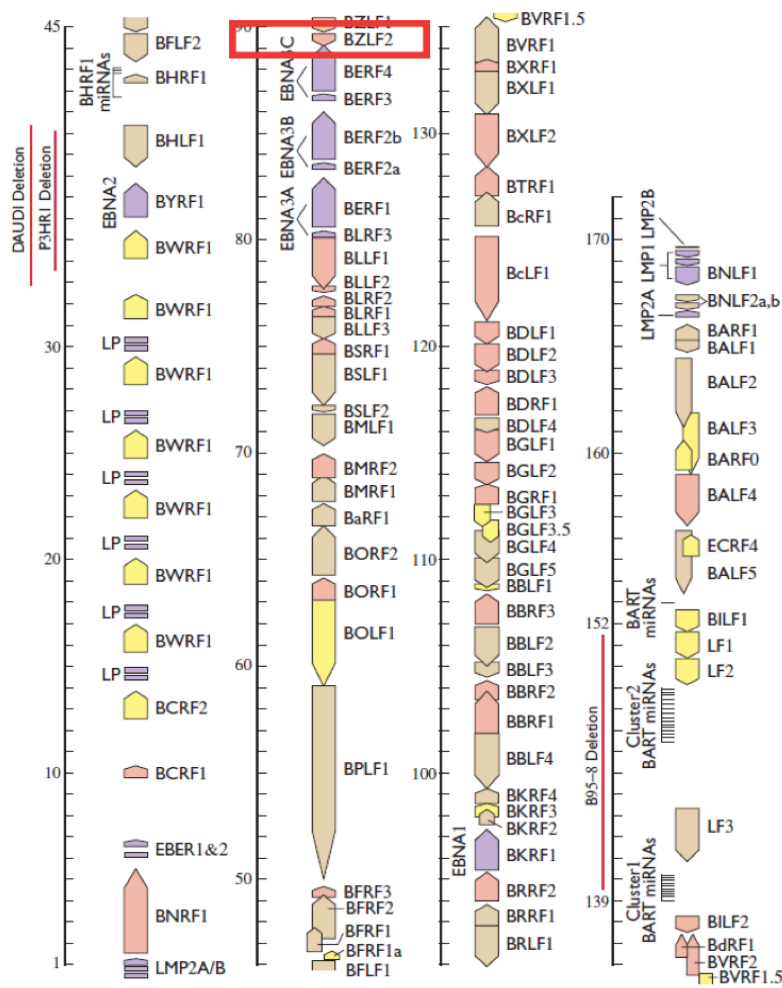


Figura 18. Secuencia genómica del virus Epstein-Barr. El genoma del EBV tiene 171,823 pb de longitud, aproximadamente (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MK540430>) (Modificada de Liu et al 2014).

Para generar una curva de concentración de partículas virales, se extrajo el DNA del sobrenadante del cultivo de células B95 inducidas a producir EBV y se determinó una concentración de 25.8 ng/μl en un equipo NanoDrop One. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 (90 μl de agua libre de DNAsas + 10 μl de DNA inicial) en 8 puntos y se sometieron a qPCR. Con los resultados obtenidos (Figura 19) se determinó el número de copias virales en cada muestra (Tabla 5) y se obtuvo una curva de concentración de

partículas virales (Figura 20). Los resultados muestran un límite de detección de hasta 1.39 copias virales por μl de DNA.

Tabla 5. Curva de concentración de partículas virales de EBV en diluciones seriadas 1:10.

EBV

Dilución	Concentración	Unidades	# copias Moléculas DNA/ μl
Conc	25.8	ng/ μl	1.39E+08
1:10 ⁻¹	2.58	ng/ μl	1.39E+07
1:10 ⁻²	0.258	ng/ μl	1.39E+06
1:10 ⁻³	0.0258	pg/ μl	1.39E+05
1:10 ⁻⁴	0.00258	pg/ μl	1.39E+04
1:10 ⁻⁵	0.000258	pg/ μl	1.39E+03
1:10 ⁻⁶	0.0000258	fg/ μl	1.39E+02
1:10 ⁻⁷	0.00000258		1.39E+01
1:10 ⁻⁸	0.000000258		1.39E+00

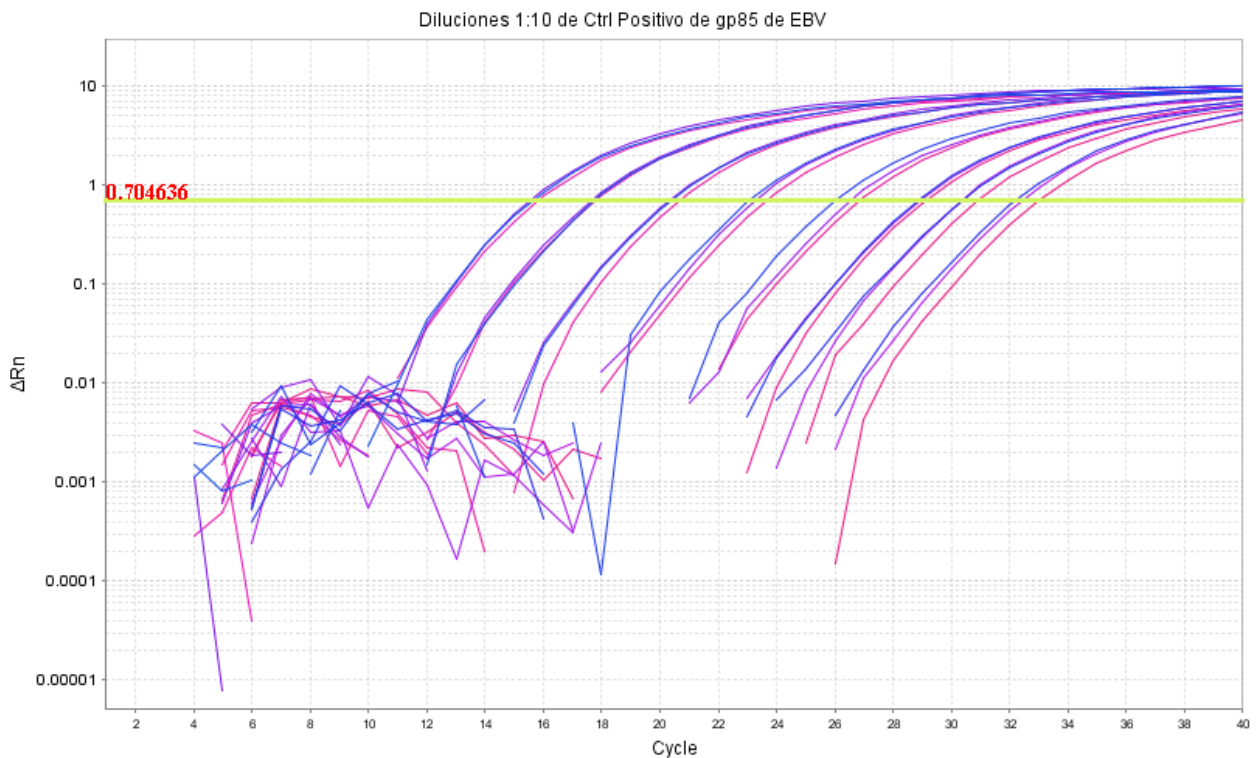
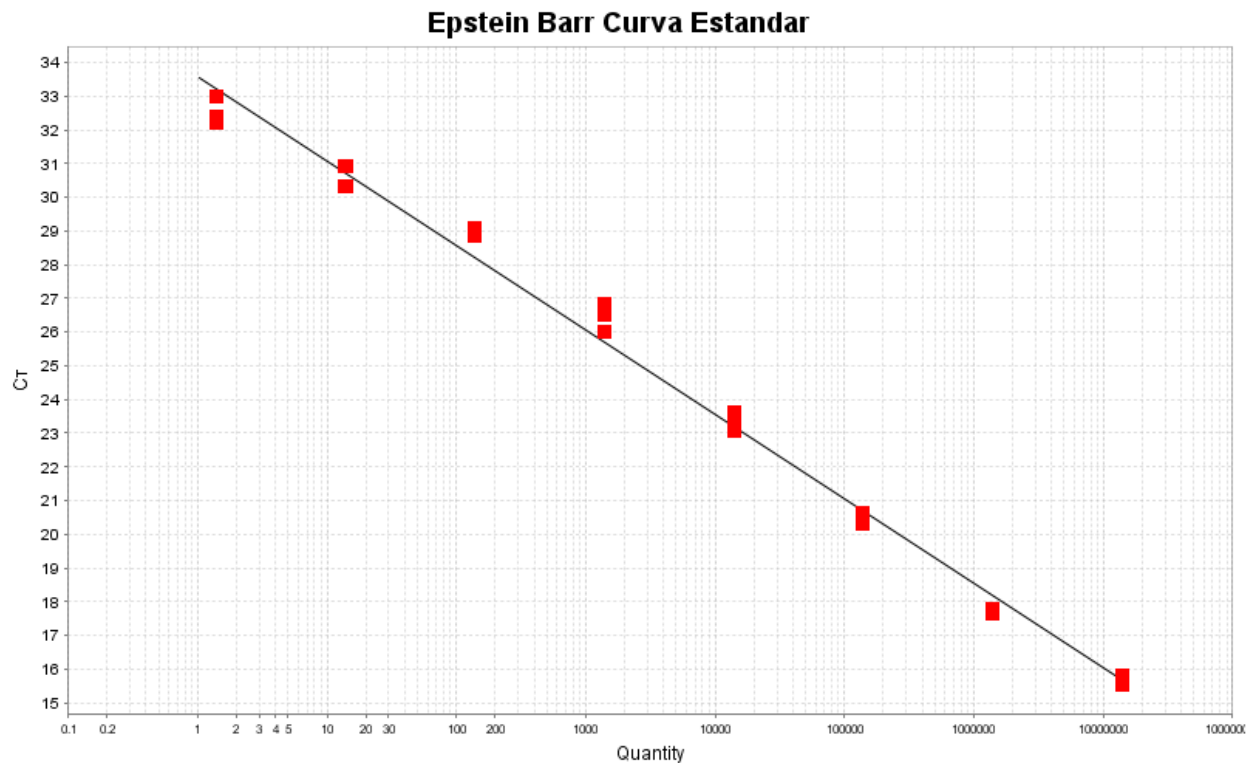


Figura 19. Amplificación del fragmento de la secuencia gp85 del virus Epstein-Barr en controles positivos. Experimento realizado por triplicado.



Target: EBV Slope: -2.509 Y-Inter: 33.59 R²: 0.991 Eff%: 150.378

Figura 20. Curva estándar de detección del virus Epstein-Barr. La curva estándar fue realizada con el ensayo de amplificación de controles positivos del EBV observado en la figura 19. La sensibilidad de detección es de hasta 2 partículas virales. La pendiente (slope) indica el promedio de ciclos existentes entre las amplificaciones detectadas. R² 0.991.

Para la obtención de suficiente DNA del LCR de pacientes con NMO fue necesario repetir la extracción varias veces. Las concentraciones finales obtenidas se presentan en la Tabla 6.

Las muestras fueron sometidas a amplificación por qPCR por triplicado. En la Figura 21 se muestra el resultado del control negativo (NTC, no template control), y en la Figura 22 el resultado obtenido utilizando el DNA extraído del LCR de los pacientes. En ningún caso hubo una señal de amplificación que rebasara la línea de detección, lo que indica ausencia del fragmento del gen gp85 del EBV.

Tabla 6. Concentración de DNA obtenido del LCR de pacientes con NMO.

Paciente	Vol. Utilizado	Concentración de DNA
054	800 μ l	3.6 ng/ μ l
068	800 μ l	5.8 ng/ μ l
074	400 μ l	7.1 ng/ μ l
082	500 μ l	2.4 ng/ μ l
176	500 μ l	3.2 ng/ μ l
207	800 μ l	2.8 ng/ μ l
275	600 μ l	7.7 ng/ μ l
343	400 μ l	2.9 ng/ μ l
345	600 μ l	3.5 ng/ μ l

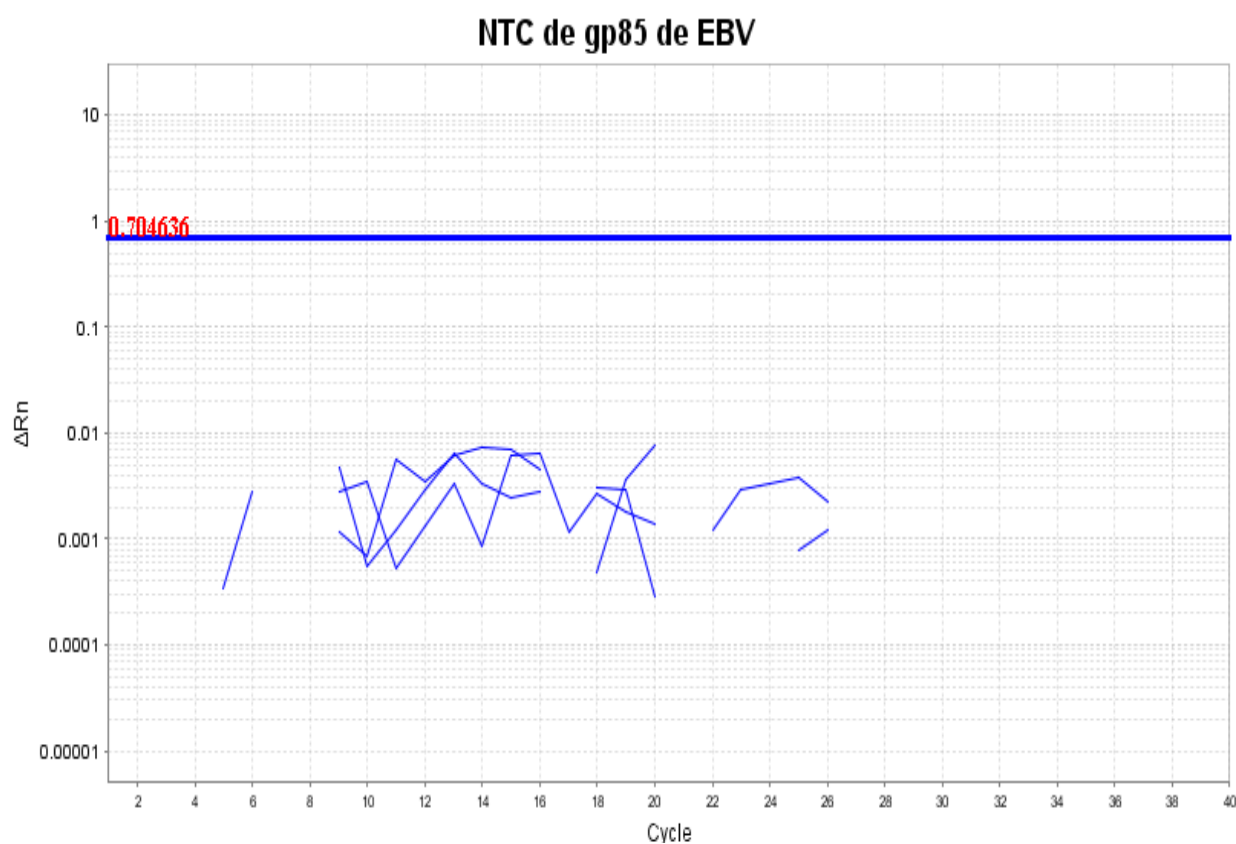


Figura 21. Control negativo de la detección del fragmento gp85 del EBV. Las reacciones de control negativo no contenían genoma viral (no template control “NTC”). Realizado por triplicado.

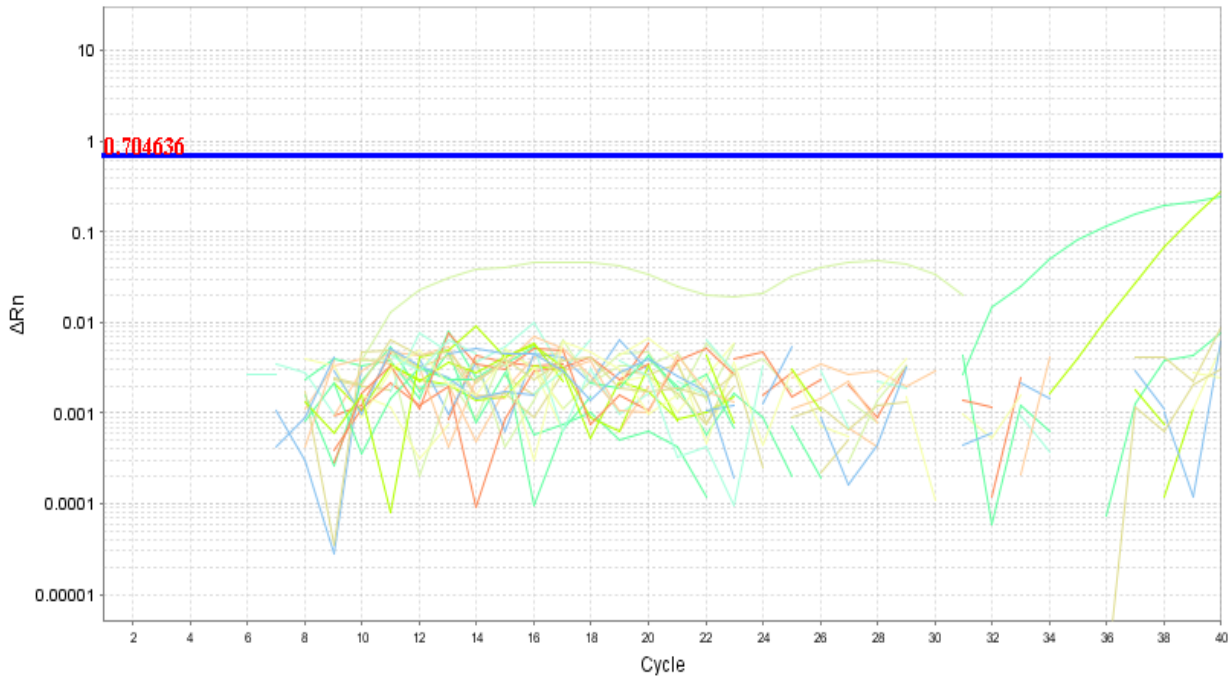


Figura 22. Amplificación del gen que codifica para gp85 de EBV en el DNA extraído del LCR de pacientes con NMO. Todas las amplificaciones resultaron negativas. Experimentos realizados por triplicado.

- Identificación de HSV-1 en el LCR de pacientes con NMO

La detección del HSV-1 se realizó utilizando un par de iniciadores que amplifican un fragmento de la secuencia genómica de la glicoproteína D (gD) y es identificado por la sonda Taqman específica que se une a la secuencia iniciando en el aminoácido 1093 (Figura 23) (Sotelo et al. 2014) (<https://viralzone.expasy.org/5756>).

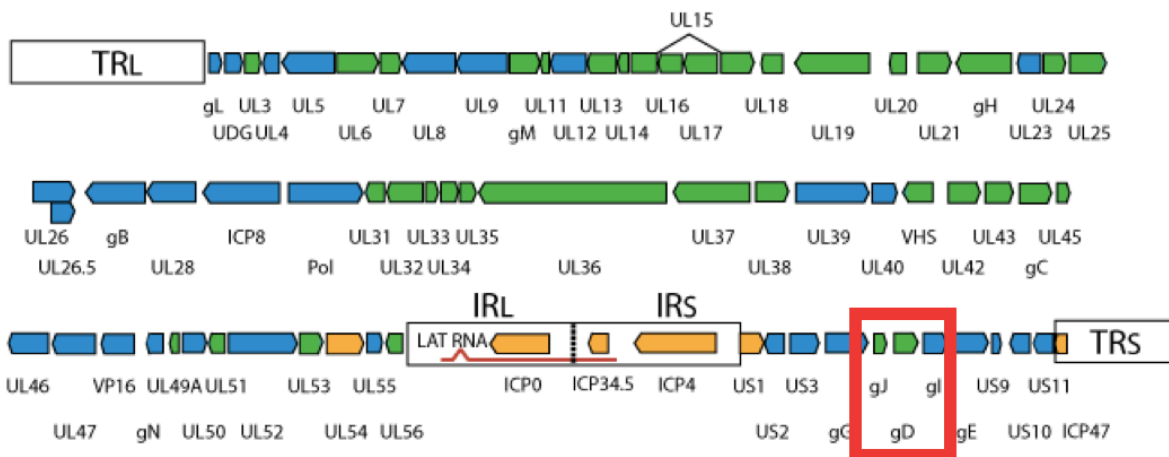


Figura 23. Secuencia genómica del virus herpes simple tipo 1. El genoma del virus herpes simple tipo 1 tiene una longitud aproximada de 151,621 pb (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN401202>) (<https://viralzones.expasy.org/5756>).

Para generar una curva de concentración de partículas virales, se extrajo el DNA del sobrenadante del cultivo de células Vero infectadas con el HSV-1 y se determinó una concentración inicial de 35.9 ng/μl en un equipo NanoDrop One. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 (90 μl de agua libre de DNAsas + 10 μl de DNA inicial) en 8 puntos y se sometieron a qPCR. Con los resultados obtenidos (Figura 24) se determinó el número de copias virales en cada muestra (Tabla 7) y se obtuvo una curva de concentración de partículas virales (Figura 25). Los resultados muestran un límite de detección de hasta 2.19 copias virales por μl de DNA.

Tabla 7. Curva de concentración de partículas virales de HSV-1 en diluciones seriadas 1:10.

HSV-1

Dilución	Concentración	Unidades	# copias Moléculas DNA/μl
conc	35.9	ng/ul	2.19E+08
1:10 ⁻¹	3.59	ng/ul	2.19E+07
1:10 ⁻²	0.359	ng/ul	2.19E+06
1:10 ⁻³	0.0359	pg/ul	2.19E+05
1:10 ⁻⁴	0.00359	pg/ul	2.19E+04
1:10 ⁻⁵	0.000359	pg/ul	2.19E+03
1:10 ⁻⁶	0.0000359	fg/ul	2.19E+02
1:10 ⁻⁷	0.00000359		2.19E+01
1:10 ⁻⁸	0.000000359		2.19E+00

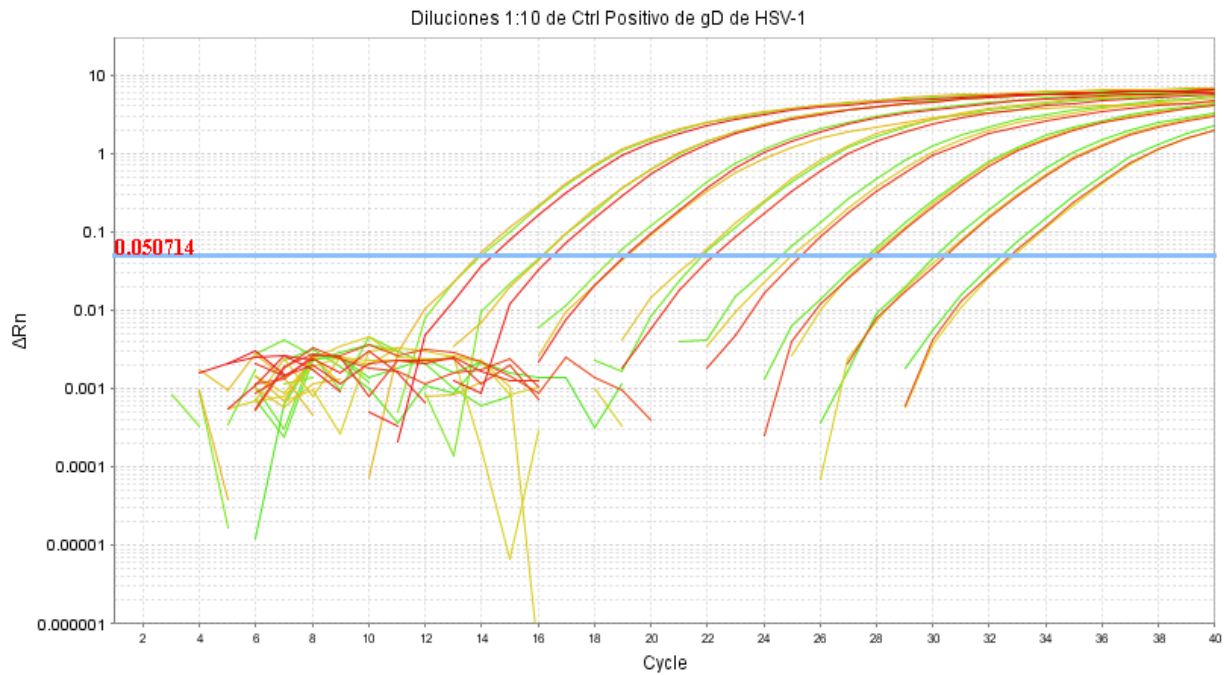


Figura 24. Amplificación del fragmento de la secuencia gD del virus herpes simple tipo 1 en controles positivos. Experimento realizado por triplicado.

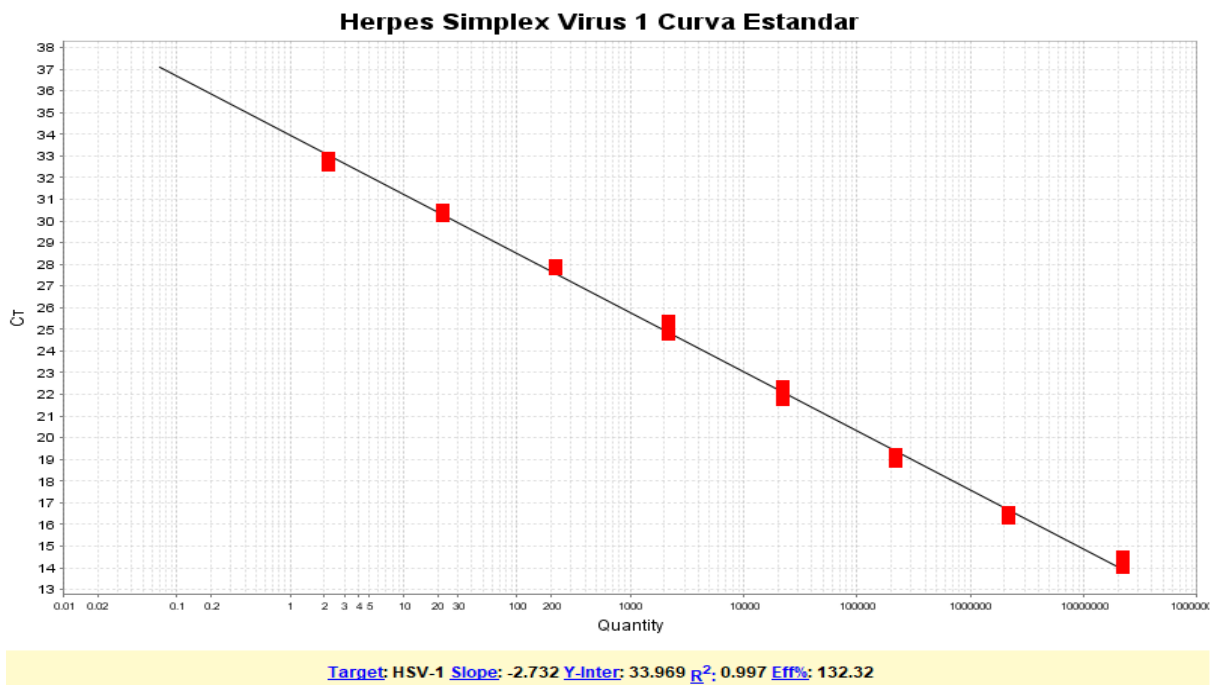


Figura 25. Curva estándar de detección del virus herpes simple tipo 1. La curva estándar fue realizada con el ensayo de amplificación de controles positivos del HSV-1 observado en la figura 24. La sensibilidad de detección es de hasta 3 partículas virales completas. La pendiente (slope) refleja el promedio de ciclos existentes entre las amplificaciones detectadas. R^2 0.997.

Las muestras fueron sometidas a amplificación por qPCR por triplicado. En la Figura 26 se muestra el resultado del control negativo (NTC, no template control), y en la Figura 27 el resultado obtenido utilizando el DNA extraído del LCR de los pacientes. En ningún caso hubo una señal de amplificación que rebasara la línea de detección, lo que indica ausencia del fragmento genómico gD del HSV-1.

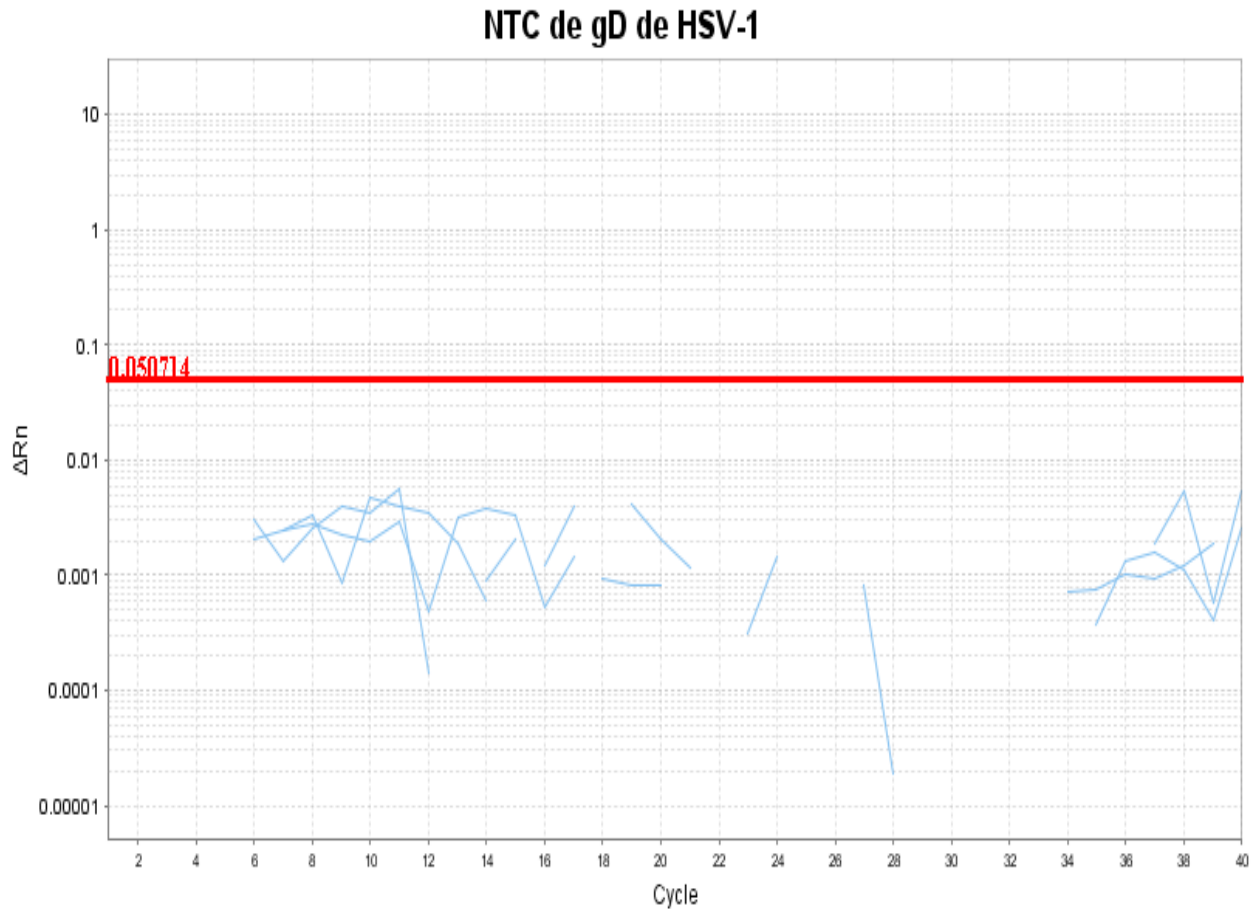


Figura 26. Control negativo por ausencia del DNA viral (No template control “NTC”). Realizado por triplicado.

Detección de gD de HSV-1 en LCRs

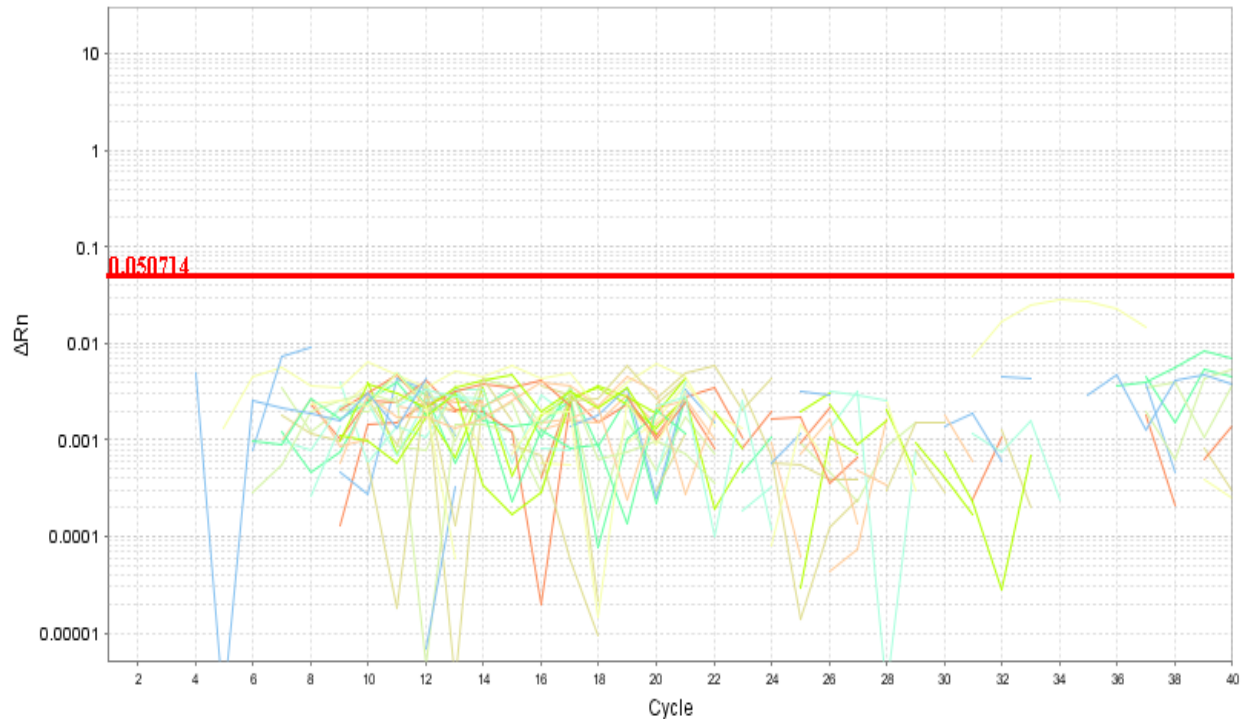


Figura 27. Amplificación del gen que codifica para gD de HSV-1 en el DNA extraído del LCR de pacientes con NMO. Todas las amplificaciones resultaron negativas. Experimentos realizados por triplicado.

- Microscopía electrónica de transmisión

Con las técnicas de biología molecular (PCR transcripción reversa y PCR tiempo real) implementadas no fue posible identificar secuencias genómicas de DENV, EBV y HSV-1 en las muestras de LCR de los pacientes con NMO. Por esta razón, decidimos no realizar la búsqueda de partículas virales a través de microscopía electrónica de transmisión. No obstante, se realizó la identificación de los virus en los cultivos celulares.

Los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron incubados con los anticuerpos específicos para cada uno de los virus e inmunoprecipitados. Al botón obtenido después de la centrifugación se le realizó la tinción negativa y se observó al microscopio electrónico de transmisión.

La literatura reporta que el DENV presenta un diámetro de 50 a 80 nm (650Å en promedio). Los virus maduros tienen una estructura redonda lisa, a diferencia de los viriones inmaduros, los cuales presentan espículas en su superficie (Barth 2000; Stiasny et al. 2007; Zhang et al. 2013) (Figura 28).

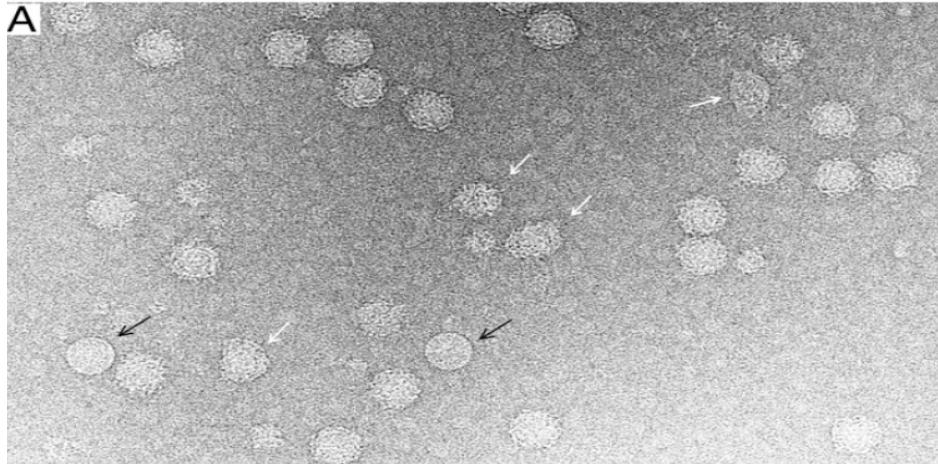


Figura 28. Virus dengue maduros. Microscopía electrónica de transmisión de referencia (Zhang et al. 2013).

Utilizando un anticuerpo contra la glicoproteína E de la envoltura viral se logró concentrar al virus DENV del sobrenadante de cultivo de células C6/36 infectadas con el serotipo 2 del virus dengue. Siguiendo el protocolo de tinción negativa obtuvimos la imagen de la Figura 29, donde se observa la estructura del virus dengue semejante a la imagen de referencia y los tamaños corresponden a los mencionados por la literatura.

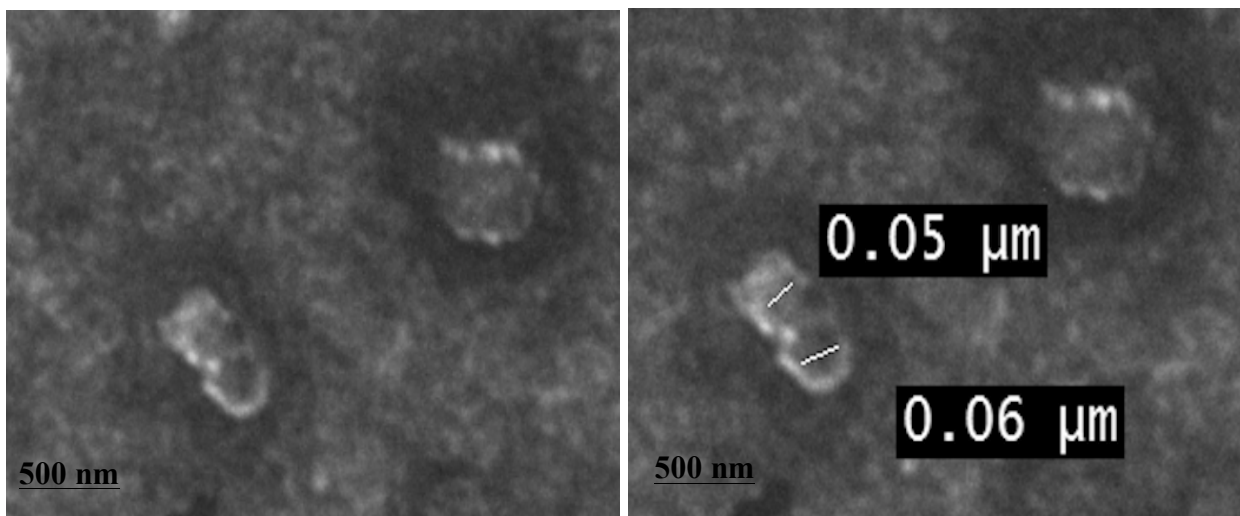


Figura 29. Microscopía electrónica de transmisión del sobrenadante de cultivo de células C6/36 infectadas con el virus dengue-2.

Los virus de la familia Herpesviridae presentan cuatro elementos comunes: 1) un núcleo electrodensito que contiene el DNA viral, 2) una cápside icosaédrica que rodea al núcleo, 3) una capa proteica desestructurada llamada tegumento que rodea a la cápside y 4) una bicapa de lípido que delimita la estructura viral en una estructura esférica con un diámetro entre los 120 y 260 nm (Figura 30).

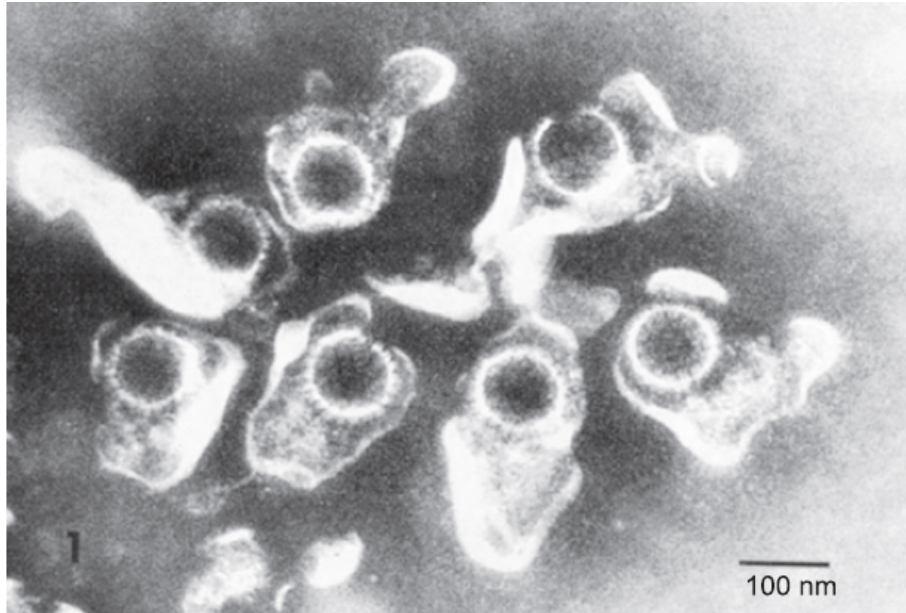


Figura 30. Virus Epstein-Barr. Microscopía electrónica de transmisión de referencia (Liu et al 2014).

La concentración del virus Epstein-Barr se realizó utilizando un anticuerpo que reconoce a la glicoproteína 350 del virus. La gp350 se encuentra expuesta en la envoltura viral y forma parte de las proteínas mayoritarias de la envoltura. La observación al microscopio electrónico de transmisión permitió identificar partículas virales correspondiente al EBV en el sobrenadante de cultivo de células B95. En la Figura 31 se muestran dos estructuras virales que muestran las características descritas para los herpesvirus. La figura muestra claramente la estructura icosaédrica y nuclear de dos virus, uno de 142.13 nm (A) y otro de 183.17 nm de diámetro.

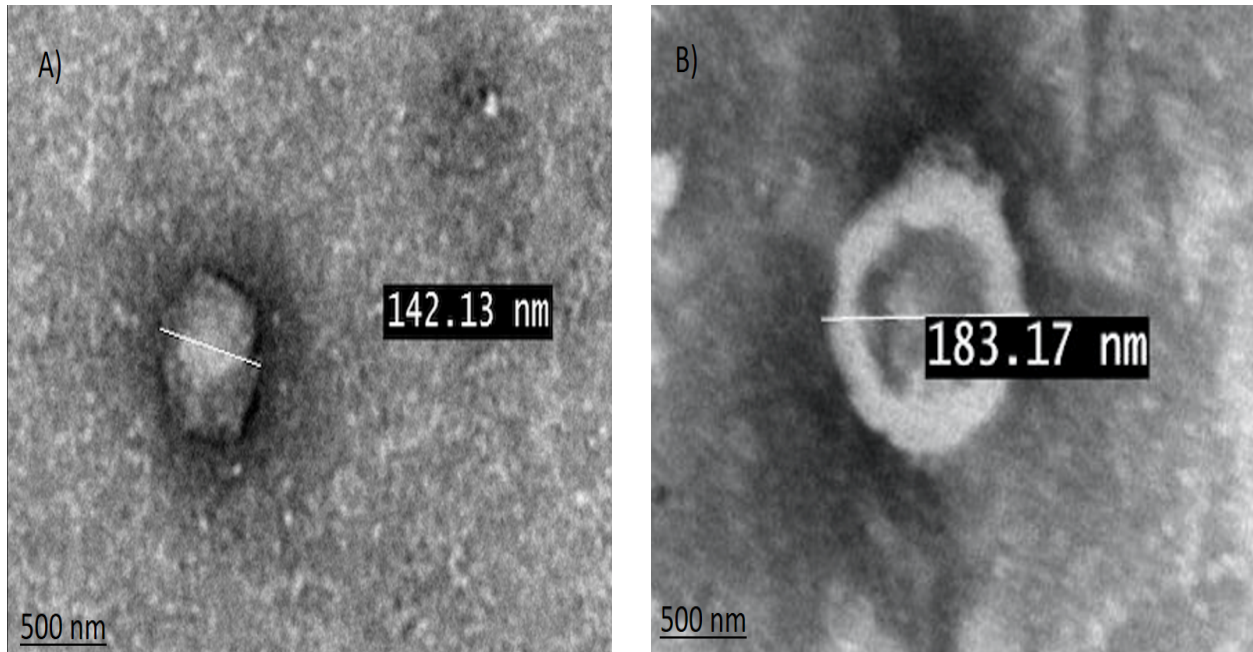


Figura 31. Microscopía electrónica de transmisión del sobrenadante de cultivo de células B95. Observación de dos virus Epstein Barr. A) Se observa la estructura icosaédrica de la cápside característica de los herpesvirus. B) Observación de estructuras virales como envoltura (espacio no electrodenso) y núcleo (espacio central electrodenso).

El virus herpes simple tipo 1 también pertenece a la familia Herpesviridae y presenta las características mencionadas anteriormente para este grupo de virus (Figura 32). En este trabajo se utilizó un anticuerpo contra la glicoproteína E (gE). Esta glicoproteína funciona como proteína de unión con la célula blanco. Junto a la gI, la gE permite la infección basolateral célula-célula debido a la formación de vesículas de virus maduros.

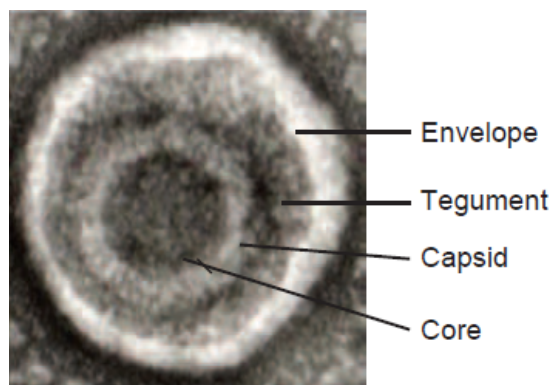


Figura 32. Virus herpes simple tipo 1. Microscopía electrónica de transmisión de referencia (Liu et al 2014).

La concentración del sobrenadante de cultivo de células Vero por centrifugación, posterior a la interacción con anticuerpo contra la glicoproteína E, permitió observar al virus HSV-1 en tinción negativa a través de microscopía electrónica de transmisión. En la Figura 30 se observan dos partículas víricas que muestran la envoltura viral, tegumento, cápside y núcleo viral.

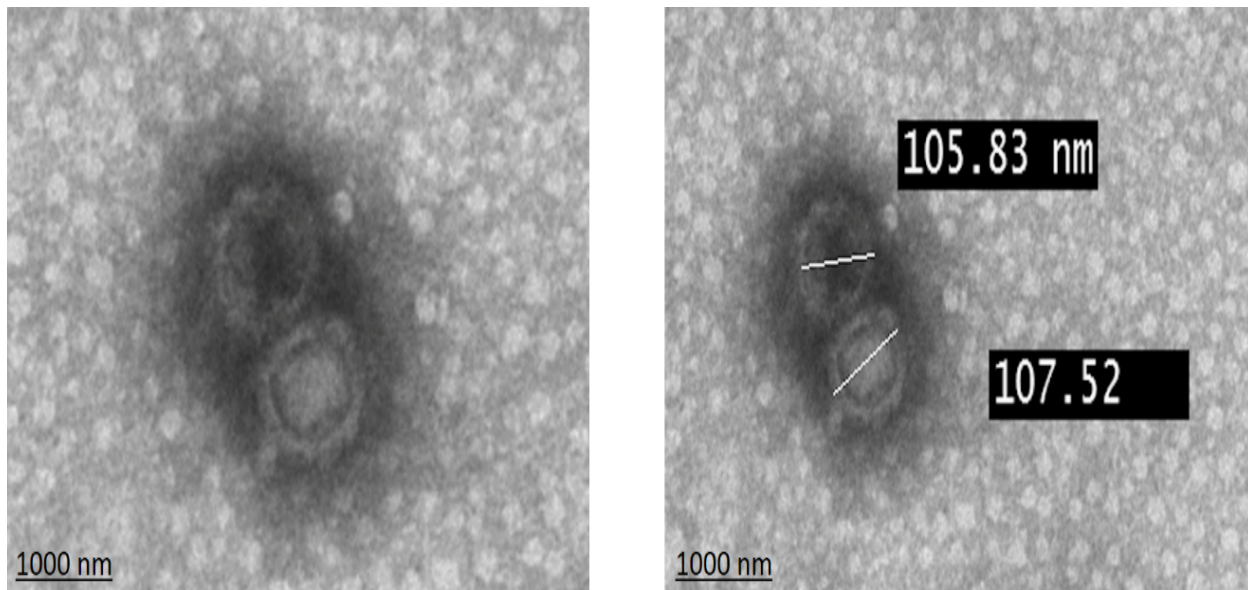


Figura 33. Microscopía electrónica de transmisión del sobrenadante de cultivo de células Vero infectadas. Observación de dos partículas virales en las cuales se aprecian las estructuras de envoltura, tegumento, cápside y núcleo viral.

Discusión

En este trabajo analizamos la posible presencia de tres entidades patógenas –el virus dengue, el virus Epstein-Barr y el virus herpes simple tipo 1– en el LCR de pacientes mexicanos con NMO. El interés surgió de la publicación de varios artículos que asociaban estos virus a las etapas de brote de NMO (Lana-Peixoto et al. 2018; Miranda de Sousa et al. 2006; Puccioni-Sohler et al. 2017; Levinson et al. 2018; Masuda et al. 2015; Sellner et al. 2010) y a que estos virus son clínicamente relevantes en la población mexicana. En 2019 se reportaron 10,183 casos de dengue y 7,049 casos de herpes en México (https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/521457/BESEMANAL_51.pdf).

En nuestro estudio no logramos amplificar las secuencias del genoma del DENV, EBV ni de HSV-1 en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con NMO. La discrepancia de nuestros resultados con los hallazgos reportados por otros grupos puede tener varias explicaciones.

Existe una creciente asociación de la interrelación de factores genéticos con infecciones virales en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, como la NMO. Los virus son capaces de propiciar autoinmunidad por una variedad de posibles mecanismos, como el mimetismo molecular, “bystander activation” o persistencia viral (Fujinami et al. 2006).

Algunos epitopes virales de superficie pueden inducir reconocimiento y provocar una respuesta inmunológica cruzada hacia antígenos propios del huésped, como sucede en la asociación de la infección por EBV y el desarrollo de EM (Fujinami et al. 2006). En este ejemplo, se ha observado que las personas que presentan el alelo HLA-DRB1*15:01 tienen mayor probabilidad de desarrollar EM y esta probabilidad aumenta al ser infectados por EBV. En pacientes con EM se ha demostrado la presencia de células T con especificidad para la proteína de unión a mielina (MBP) y el antígeno nuclear 1 de EBV (EBVNA1). MBP y EBVNA presentan estructuras homólogas de péptidos presentados por la molécula HLA-DRB1*15:01 (Rojas et al. 2018). Así, el

mimetismo molecular viral es el probable responsable del desarrollo de una enfermedad autoinmune del SNC.

En el caso de NMO, (Vaishnav et al. 2013) buscó homología estructural de la AQP4 con alguna otra proteína a través de herramientas bioinformáticas. El estudio reporta similitud del péptido de AQP4 de los aminoácidos 22 a 36 del extremo amino terminal con las proteínas “parsnip yellow fleck virus” y “Medicago truncatula Serpin-ZX”. Sin embargo, no se ha dado seguimiento a este hallazgo. Sería interesante retomar esta línea con las nuevas herramientas bioinformáticas disponibles. .

“Bystander activation” se refiere a una activación heteróloga de linfocitos por un antígeno no específico. Esta activación es mediada por señales que favorecen la inflamación, como las citocinas, co-señalización por ligandos, PAMPS, vesículas extracelulares y partículas microbianas. Se ha observado que “bystander activation” es común en las infecciones por virus. En pacientes infectados con HIV, las células T CD8⁺ específicas para algunos antígenos de EBV, CMV e influenza presentan una activación marcada y proliferan en ausencia de activación antigénica (Rojas et al. 2018). Se ha propuesto que la activación de células T específicas de virus migran a las áreas de infección viral en busca del antígeno blanco, como el corazón, el páncreas o el SNC, donde encuentran células infectadas por el virus y liberan sus gránulos citotóxicos. En estas circunstancias, las células T y células granulocíticas liberan citocinas proinflamatorias que mantienen el estado hiperactivo (Fujinami et al. 2006). En este sentido, podríamos mencionar los trabajos realizados por Carod-Artal en 2013, Miranda de Sousa en 2006 y Sellner en 2010, quienes encuentran DENV, EBV y HSV-1, respectivamente en pacientes con NMO que presentaban particularidades de infección viral sin poder relacionarlos con el desarrollo de la autoinmunidad.

Por otro lado, la persistencia viral se refiere a la presencia constante del virus que conduce al mantenimiento de la respuesta inmunológica. La infección persistente puede provocar lesiones mediadas por el sistema inmune. Un ejemplo de esto es el desarrollo de encefalomiелitis murina de Theiler provocada por una infección viral sostenida en el SNC de estos animales. El virus de la encefalomiocarditis murina puede

persistir en células de la microglia, astrocitos, oligodendrocitos. La infección puede ser identificada a través de la observación de partículas virales, de la amplificación del genoma viral y de la presencia de proteínas virales en el animal infectado (Fujinami et al. 2006). En humanos se ha asociado la persistencia de la infección con el virus HSV-1 con la enfermedad de Alzheimer (Harris 2018), el virus de la hepatitis C con la enfermedad de Parkinson (Abushouk et al. 2017) y el EBV (Masuda et al. 2015; Levinson et al. 2018) o VZV con la esclerosis múltiple (Hernández-González et al. 2018; Sotelo et al. 2008). En conjunto estos antecedentes sugieren la asociación de algunas enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes con la infección por un agente viral.

En los antecedentes presentados para nuestro estudio de NMO describimos los reportes de la persistencia de DENV y EBV en pacientes que presentan la enfermedad. El caso presentado por Puccioni (2017) muestra una infección persistente del DENV en una joven que desarrolla NMO. Un segundo estudio conducido por Lana-Pexioto (2018) muestra dos casos de infecciones virales por DENV que se mantiene activo. Al paso de la semana de iniciar la infección las pacientes muestran signos de NMO. En ambos estudios se realiza el diagnóstico de NMO a través de MRI y clínica. La infección se corrobora con la detección de anticuerpos y de proteínas virales. Por su parte Masuda y colaboradores (2015) reportan los resultados de un estudio de pacientes con enfermedades desmielinizantes y comparan sujetos con EM y NMO. Asimismo, analizan un grupo de pacientes que tienen infección por EBV y diagnóstico de NMO a través de la presencia persistente de IgG contra el antígeno temprano viral (EA-IgG) en LCR y en suero. Finalmente, correlacionan positivamente la concentración de EA-IgG en suero con la concentración de AQP4-IgG.

De acuerdo a la información aquí presentada podemos concluir que la NMO, al igual que muchas enfermedades autoinmunes, depende de factores genéticos y ambientales. A la susceptibilidad genética de los individuos se suma un factor desencadenante como puede ser una infección viral. En distintas poblaciones, diferentes virus pueden ser los que precipitan el desarrollo de la enfermedad. En los casos presentados aquí podemos afirmar que los virus DENV, EBV y HSV-1 no se

encuentran asociados a la NMO de los pacientes. Sin embargo, no se descarta que otros virus sí se encuentren involucrados.

Perspectivas

A pesar de que DENV, EBV y HSV-1 no se encontraron en las muestras analizadas, es posible que otros virus estén presentes. Por ello, entre las perspectivas de este trabajo se encuentra la secuenciación completa de los ácidos nucleicos en el LCR para determinar si se identifica algún otro patógeno en estos pacientes.

En seguimiento al trabajo de (Vaishnav et al. 2013) sería importante buscar homologías estructurales con la AQP4 utilizando las nuevas herramientas bioinformáticas disponibles.

Referencias

- Abushouk, A. I., M. W. A. El-Husseney, M. Magdy, A. Ismail, A. Attia, H. Ahmed, R. Pallanti, and A. Negida. 2017. 'Evidence for association between hepatitis C virus and Parkinson's disease', *Neurological Sciences*, 38: 1913-20.
- Agre, P., and D. Kozono. 2003. 'Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases', *FEBS Lett*, 555: 72-8.
- Alonso, V. R., J. de Jesus Flores Rivera, Y. R. Garci, J. Granados, T. Sanchez, L. Mena-Hernandez, and T. Corona. 2018. 'Neuromyelitis Optica (NMO IgG+) and Genetic Susceptibility, Potential Ethnic Influences', *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 18: 4-7.
- Barth, Ortrud Monika. 2000. *INSTITUTO OSWALDO CRUZ FIRST CENTENARY: 1900-2000 ATLAS OF DENGUEVIRUSES MORPHOLOGY AND MORPHOGENESIS* (Rio de Janeiro).
- Borisow, N., M. Mori, S. Kuwabara, M. Scheel, and F. Paul. 2018. 'Diagnosis and Treatment of NMO Spectrum Disorder and MOG-Encephalomyelitis', *Frontiers in Neurology*, 9.
- Bukhari, W., M. H. Barnett, K. Prain, and S. A. Broadley. 2012. 'Molecular pathogenesis of neuromyelitis optica', *Int J Mol Sci*, 13: 12970-93.
- Chien, L. J., T. L. Liao, P. Y. Shu, J. H. Huang, D. J. Gubler, and G. J. Chang. 2006. 'Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses', *J Clin Microbiol*, 44: 1295-304.
- Delgado-García, Guillermo, Zoé Chávez, Verónica Rivas-Alonso, Teresa Corona, and José Flores-Rivera. 2018. 'Obstetric outcomes in a Mexican Cohort of patients with AQP4-antibody-seropositive neuromyelitis optica', *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, Volume 25: 268-70.
- Feng, Y. Q., N. Guo, F. Huang, X. Chen, Q. S. Sun, and J. X. Liu. 2010. 'Anti-tuberculosis treatment for Devic's neuromyelitis optica', *Journal of Clinical Neuroscience*, 17: 1372-77.
- Fujinami, R. S., M. G. von Herrath, U. Christen, and J. L. Whitton. 2006. 'Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease', *Clin Microbiol Rev*, 19: 80-94.
- Ghezzi, A., M. P. Amato, N. Makhani, T. Shreiner, J. Gärtner, and S. Tenenbaum. 2016. 'Pediatric multiple sclerosis: Conventional first-line treatment and general management', *Neurology*, 87: S97-S102.
- Gleiser, C., A. Wagner, P. Fallier-Becker, H. Wolburg, B. Hirt, and A. F. Mack. 2016. 'Aquaporin-4 in Astroglial Cells in the CNS and Supporting Cells of Sensory OrgansA Comparative Perspective', *International Journal of Molecular Sciences*, 17.
- Harris, S. A., and E. A. Harris. 2018. 'Molecular Mechanisms for Herpes Simplex Virus Type 1 Pathogenesis in Alzheimer's Disease', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10.
- Hernández-González, Olivia, Adolfo Martínez-Palomo, Julio Sotelo, Bibiana Chávez-Munguía, Graciela Ordoñez, Daniel Talamás-Lara, Benjamin Pineda, José de Jesús Flores-Rivera, and Martha Espinosa-Cantellano. 2018. "Varicella-Zoster

- Virus in Cerebrospinal Fluid at Relapses of Multiple Sclerosis is Infective in Vitro." In.
- Hertwig, Laura. 2016. 'The implication of natural killer cells and neutrophils in autoimmune disorders of the central nervous system', Karolinska Institutet. <https://viralzone.expasy.org/5756>
- Huang, T. L., K. H. Lin, J. K. Wang, and R. K. Tsai. 2018. 'Treatment strategies for neuromyelitis optica', *Tzu Chi Medical Journal*, 30: 204-08.
- Jasiak-Zatonska, M., A. Kalinowska-Lyszczarz, S. Michalak, and W. Kozubski. 2016. 'The Immunology of Neuromyelitis Optica-Current Knowledge, Clinical Implications, Controversies and Future Perspectives', *International Journal of Molecular Sciences*, 17.
- Koga, M., T. Takahashi, M. Kawai, K. Fujihara, and T. Kanda. 2011. 'A serological analysis of viral and bacterial infections associated with neuromyelitis optica', *Journal of the Neurological Sciences*, 300: 19-22.
- Kurtzke, J. F. 2015. 'On the origin of EDSS', *Mult Scler Relat Disord*, 4: 95-103.
- Lana-Peixoto, M. A., D. Pedrosa, N. Talim, Jmss Amaral, A. Horta, and R. Kleinpaul. 2018. 'Neuromyelitis optica spectrum disorder associated with dengue virus infection', *Journal of Neuroimmunology*, 318: 53-55.
- Lennon, V. A., T. J. Kryzer, S. J. Pittock, A. S. Verkman, and S. R. Hinson. 2005. 'IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel', *J Exp Med*, 202: 473-7.
- Lennon, V. A., D. M. Wingerchuk, T. J. Kryzer, S. J. Pittock, C. F. Lucchinetti, K. Fujihara, I. Nakashima, and B. G. Weinshenker. 2004. 'A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis', *Lancet*, 364: 2106-12.
- Levinson, Justin B, Milen Rodriguez Alvarez, Krista q Koci, Aleksander Feoktistov, and Isabel M McFarlane. 2018. 'Epstein - Barr virus Infection in a Patient with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder and Sjögren's Syndrome: A Case Report and Review of Literature', *Clin Case Rep Rev*.
- Liu, Lin. 2014. 'Fields Virology, 6th Edition', *Clinical Infectious Diseases*, 59: 613-13.
- Mangiatoridi, G. F., D. Alberga, D. Trisciuzzi, G. Lattanzi, and O. Nicolotti. 2016. 'Human Aquaporin-4 and Molecular Modeling: Historical Perspective and View to the Future', *Int J Mol Sci*, 17.
- Marin Collazo, I. V., C. L. Howe, C. F. Lucchinetti, and W. O. Tobin. 2018. 'Neuromyelitis Optica and Herpes Simplex Virus 2: A Viral Trigger for Aquaporin-4 Autoimmunity?', *Neurologist*, 23: 92-93.
- Masuda, S., M. Mori, K. Arai, A. Uzawa, M. Muto, T. Uchida, H. Masuda, and S. Kuwabara. 2015. 'Epstein-Barr virus persistence and reactivation in neuromyelitis optica', *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 86: 1137-42.
- Miranda de Sousa, A., M. Puccioni-Sohler, A. Dias Borges, L. Fernandes Adorno, M. Papais Alvarenga, and R. M. Papais Alvarenga. 2006. 'Post-dengue neuromyelitis optica: case report of a Japanese-descendent Brazilian child', *J Infect Chemother*, 12: 396-8.
- Mori, M., M. Hosoya, T. Hiwasa, S. Hayakawa, A. Uzawa, and S. Kuwabara. 2011. 'Detection of mumps virus RNA in cerebrospinal fluid of patients with neuromyelitis optica', *Neurol Sci*, 32: 795-9.

- Nakada, T., I. L. Kwee, H. Igarashi, and Y. Suzuki. 2017. 'Aquaporin-4 Functionality and Virchow-Robin Space Water Dynamics: Physiological Model for Neurovascular Coupling and Glymphatic Flow', *Int J Mol Sci*, 18.
- Nakamura, Y., K. Ikeda, Y. Yoshii, H. Ito, T. Hirayama, K. Kawabe, O. Kano, and Y. Iwasaki. 2011. 'Influenza-associated monophasic neuromyelitis optica', *Intern Med*, 50: 1605-9.
- Olindo, S., M. Bonnan, H. Merle, A. Signate, D. Smadja, and P. Cabre. 2010. 'Neuromyelitis optica associated with subacute human T-lymphotropic virus type 1 infection', *J Clin Neurosci*, 17: 1449-51.
- Palace, J., M. I. Leite, I. Leite, and A. Jacob. 2012. 'A practical guide to the treatment of neuromyelitis optica', *Pract Neurol*, 12: 209-14.
- Papadopoulos, M. C., and A. S. Verkman. 2012. 'Aquaporin 4 and neuromyelitis optica', *Lancet Neurology*, 11: 535-44.
- . 2013. 'Aquaporin water channels in the nervous system', *Nature Reviews Neuroscience*, 14: 265-77.
- Puccioni-Sohler, M., A. M. M. Ornelas, A. S. de Souza, M. J. Cabral-Castro, Jma Ramos, C. Rosadas, M. C. F. Salgado, A. A. Castiglione, F. Ferry, J. M. Peralta, C. M. Voloch, A. Tanuri, F. Tovar-Moll, and R. S. Aguiar. 2017. 'First report of persistent dengue-1-associated autoimmune neurological disturbance: neuromyelitis optica spectrum disorder', *Journal of Neurovirology*, 23: 768-71.
- Ratelade, J., and A. S. Verkman. 2012. 'Neuromyelitis optica: Aquaporin-4 based pathogenesis mechanisms and new therapies', *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44: 1519-30.
- Rivas Alonso, V., J. J. Flores Rivera, Y. Rito García, and T. Corona. 2017. 'The genetics of multiple sclerosis in Latin America', *Mult Scler J Exp Transl Clin*, 3: 2055217317727295.
- Rivera, J. F., J. F. Kurtzke, V. J. A. Booth, and T. Corona. 2008. 'Characteristics of Devic's disease (neuromyelitis optica) in Mexico', *Journal of Neurology*, 255: 710-15.
- Rojas, M., P. Restrepo-Jiménez, D. M. Monsalve, Y. Pacheco, Y. Acosta-Ampudia, C. Ramírez-Santana, P. S. C. Leung, A. A. Ansari, M. E. Gershwin, and J. M. Anaya. 2018. 'Molecular mimicry and autoimmunity', *J Autoimmun*, 95: 100-23.
- Sellner, J., S. Cepok, S. R. Kalluri, A. Nestle, I. Kleiter, T. Kumpfel, R. Linker, A. Melms, T. Menge, H. Tumani, F. Paul, B. Hemmer, and A. Berthele. 2010. 'Aquaporin 4 antibody positive central nervous system autoimmunity and multiple sclerosis are characterized by a distinct profile of antibodies to herpes viruses', *Neurochemistry International*, 57: 662-67.
- Shosha, E., D. Dubey, J. Palace, I. Nakashima, A. Jacob, K. Fujihara, T. Takahashi, D. Whittam, M. I. Leite, T. Misu, T. Yoshiki, S. Messina, L. Elson, M. Majed, E. Flanagan, A. Gadoth, C. Huebert, J. Sagen, B. M. Greenberg, M. Levy, A. Banerjee, B. Weinshenker, and S. J. Pittock. 2018. 'Area postrema syndrome: Frequency, criteria, and severity in AQP4-IgG-positive NMOSD', *Neurology*, 91: e1642-e51.
- Sloka, J. S., and M. Stefanelli. 2005. 'The mechanism of action of methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis', *Multiple Sclerosis Journal*, 11: 425-32.

- Sotelo, J., A. Martinez-Palomo, G. Ordonez, and B. Pineda. 2008. 'Varicella-zoster virus in cerebrospinal fluid at relapses of multiple sclerosis', *Annals of Neurology*, 63: 303-11.
- Sotelo, J., G. Ordoñez, B. Pineda, and J. Flores. 2014. 'The participation of varicella zoster virus in relapses of multiple sclerosis', *Clin Neurol Neurosurg*, 119: 44-8.
- Stiasny, K., C. Kössl, J. Lepault, F. A. Rey, and F. X. Heinz. 2007. 'Characterization of a structural intermediate of flavivirus membrane fusion', *PLoS Pathog*, 3: e20.
- Tenembaum, S., T. Chitnis, I. Nakashima, N. Collongues, A. McKeon, M. Levy, and K. Rostasy. 2016. 'Neuromyelitis optica spectrum disorders in children and adolescents', *Neurology*, 87: S59-66.
- Vaishnav, R. A., R. Liu, J. Chapman, A. M. Roberts, H. Ye, J. D. Rebolledo-Mendez, T. Tabira, A. H. Fitzpatrick, A. Achiron, M. P. Running, and R. P. Friedland. 2013. 'Aquaporin 4 molecular mimicry and implications for neuromyelitis optica', *J Neuroimmunol*, 260: 92-8.
- Wingerchuk, D. M., B. Banwell, J. L. Bennett, P. Cabre, W. Carroll, T. Chitnis, J. de Seze, K. Fujihara, B. Greenberg, A. Jacob, S. Jarius, M. Lana-Peixoto, M. Levy, J. H. Simon, S. Tenembaum, A. L. Traboulsee, P. Waters, K. E. Wellik, and B. G. Weinshenker. 2015. 'International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders', *Neurology*, 85: 177-89.
- Yamasaki, K., I. Horiuchi, M. Minohara, Y. Kawano, Y. Ohyagi, T. Yamada, F. Mihara, H. Ito, Y. Nishimura, and J. Kira. 1999. 'HLA-DPB1*0501-associated opticospinal multiple sclerosis: clinical, neuroimaging and immunogenetic studies', *Brain*, 122 (Pt 9): 1689-96.
- Zhang, X., J. Sheng, P. Plevka, R. J. Kuhn, M. S. Diamond, and M. G. Rossmann. 2013. 'Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 6795-9.
- Şen, S. 2018. 'Neurostatus and EDSS Calculation with Cases', *Noro Psikiyatir Ars*, 55: S80-S83.