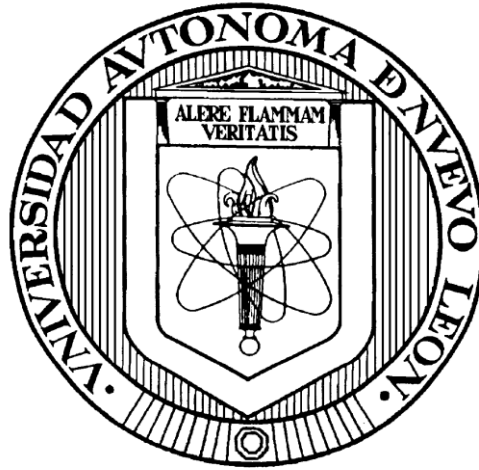


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**“IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES DEL VHS-1 EN  
PACIENTES CON INFECCIÓN ACTIVA Y SU COMPARACIÓN EN LA  
INFECCIÓN LATENTE *IN VITRO*”**

**Por**

**M.C. PILAR DEL CARMEN MORALES SAN CLAUDIO**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Inmunología**

**Febrero, 2013**

*Si mi mente puede concebirlo  
y mi corazón puede creerlo,  
entonces puedo lograrlo.*  
Mohammad Ali

*Dios no te hubiera dado la capacidad de soñar  
sin darte también la posibilidad  
de convertir tus sueños en realidad.*  
Hector Tassinari

**“IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES DEL VHS-1 EN  
PACIENTES CON INFECCIÓN ACTIVA Y SU COMPARACIÓN EN LA  
INFECCIÓN LATENTE *IN VITRO*”**

Aprobación de la tesis



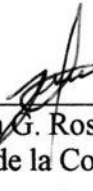
---

Dr. C. Ernesto Torres López  
Director de Tesis



---

Dr. C. Mario C. Salinas Carmona  
Co-Director de Tesis



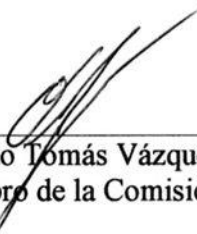
---

Dr. C. Adrián G. Rosas Taraco  
Miembro de la Comisión



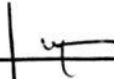
---

Dra. C. Ana María G. Rivas Estilla  
Miembro de la Comisión



---

Dr. med. Osvaldo Tomás Vázquez Martínez  
Miembro de la Comisión



---

Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado  
Subdirector de Estudios de Posgrado


**“IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES DEL VHS-1 EN  
PACIENTES CON INFECCIÓN ACTIVA Y SU COMPARACIÓN EN LA  
INFECCIÓN LATENTE *IN VITRO*”**

**Presentado por:**

**M.C. Pilar del Carmen Morales San Claudio**

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la asesoría del Dr. Ernesto Torres López y la Co-asesoría del Dr. Mario C. Salinas Carmona.

Se contó con la valiosa colaboración de la Dra. Cynthia Mendoza Rodríguez, Dra. Verónica Garza Rodríguez y del Dr. Jorge Ocampo Candiani del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y con el apoyo de CONACYT por la beca brindada.



---

Dr. Ernesto Torres López  
Director de Tesis



---

Dr. Mario C. Salinas Carmona  
Co-Director de Tesis

## DEDICATORIA

A **Dios**, principalmente él porque me ha permitido caminar este sendero de la vida y como parte de mi formación profesional me acompañó en cada paso mostrándome personas y lecciones valiosas. Sus tiempos son perfectos.

A **mi familia, mi Mama** a la cual amo con todo mi corazón y me apoyo en cada decisión que tomaba sin cuestionar o juzgar, por creer en mí.

**Mi hermano Alberto** que fue testigo de mi camino y espero que pueda ser ejemplo para él y deseando que obtenga muchas satisfacciones como yo las he tenido.

**Mi hermana Karina y mi cuñado Eduardo**, por su interés, sus palabras de aliento, su apoyo, el que siempre estuvieron al pendiente mío hasta la última etapa. Por darme unos **Sobrinos** hermosos, **Valery, Iker y Evan**, por el amor que me brindan dándome fuerzas para continuar, por mostrarme con su inocencia y fascinación de las cosas, que hay un mundo tan grande que explorar.

A **Juan** por llegar a mi mundo en una etapa importante en mi vida, por brindarme su amor y su apoyo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ernesto Torres López, por darme la oportunidad de trabajar bajo su asesoría, por su apoyo, mentoría, la confianza que me brindo, su paciencia, consejos, por estar al pendiente de mí, tratándome de guiar siempre con una lección que aprender y no solo académicamente sino también lecciones de vida, por su amistad y cariño.

Al Dr. Adrian Rosas, son años de conocerlo y estoy totalmente agradecida en lo más profundo de mi corazón por todo el apoyo incondicional brindado en mi formación durante todo el posgrado, sus enseñanzas, consejos, por ser un ejemplo de constancia, de lucha, siempre con una palabra de aliento, por ser una extraordinaria persona y un gran amigo.

Al Dr. Mario C. Salinas por haberme abierto las puertas del departamento, por la confianza que deposito en mí tanto como estudiante como trabajador durante mi estancia, por las palabras de sabiduría, siempre exhortando a la reflexión, al análisis y a la crítica constructiva. También porque de alguna manera u otra constantemente estuvo al pendiente de mí y recibí siempre su apoyo.

A la Dra. Ana Rivas por su apoyo y confianza, al Dr. Osvaldo Vázquez, como miembros de la comisión enriquecieron mi trabajo con sus comentarios, por estar al pendiente de mí como estudiante.

A la Dra. Isabel y a la Dra. Vélia por su gran apoyo y palabras de aliento, por la confianza que siempre me mostraron y en la última etapa sus consejos tan valiosos, ayudándome a sacar las cosas adelante. A la QFB. Alejandra Gallegos por la gran experiencia que tiene ayudándome con sus consejos y recomendaciones.

Al QBP. Andrés Mendiola por su gran amistad y apoyo desde que llegue al departamento de inmunología, su experiencia, sus consejos, ayudándome y apoyándome siempre. A Brenda y Alex por la amistad y cariño que me brinda.

A los profesores del departamento, la Dra. AYA, la Dra. Ángeles y el Dr. Carlos Medina, por las observaciones que recibí sobre el trabajo, por ser parte de mi formación y las aportaciones tan valiosas que recibí.

A la Dra. Cynthia Mendoza una gran amiga que me deja esta travesía, por los pacientes, su compañía y apoyo, tu sabes lo mucho que representa esto, el esfuerzo y retos que se presentaron.

Al Dr. Jorge Ocampo y la Dra. Verónica Garza del servicio de Dermatología por su apoyo con los pacientes, sin ese valioso soporte no hubiera sido posible desarrollar el proyecto

Al personal de inmunología, Lizzi, Mirna, Lupita, Isary y Gloria porque son parte de este desarrollo, por la convivencia, por las anécdotas.

Mis compañeros del posgrado Irene por su apoyo, por estar al pendiente de mí, por la convivencia y experiencias durante el desarrollo de la parte experimental. A Heidi y Juan Salazar.

A los más jóvenes del departamento, Kame, Diana, Chuy, Ossian, Zavala, Leni, Humberto, Alberto (QCB), Azalea, por el trato brindado y hacer divertido el ambiente, también de manera especial a Alberto Rdz. (MCP) por la amistad que se genero, así como yo, pues ya tiene tiempo en el departamento, por ser uno de mis primeros alumnos y a Ivonne con mucho cariño, les deseo mucho éxito a todos muchachos.

A CONACYT por la beca brindada, soporte económico que es una parte importante para que se llevara a cabo mi formación.

DESDE EL CORAZÓN A TODOS MUCHAS GRACIAS

## CONTENIDO GENERAL

<b>LUGAR DE TRABAJO.....</b>	<b>I</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>III</b>
<b>CONTENIDO GENERAL.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>XIII</b>
<b>I.- INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
1.1    Virus del Herpes Simplex.....	1
1.2    Prevalencia y características de la infección por VHS-1.....	2
1.3    Diagnostico y tratamiento de la infección herpética .....	5
1.4    Estructura del Virus del Herpes Simplex-1 .....	6
1.5    Infección lítica del VHS-1 .....	8
1.6    Infección de latencia del VHS-1.....	13
1.7    Respuesta inmune contra VHS .....	16
<b>II.- JUSTIFICACION.....</b>	<b>23</b>



<b>III.- OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
3.1    Objetivo General .....	24
3.2    Objetivos Específicos .....	24
<b>IV.- METODOLOGIA</b> .....	<b>25</b>
4.1    Obtención de muestras .....	26
4.2    Determinación de IgG e IgM anti VHS-1 por ELISA.....	27
4.3    Cultivo celular .....	28
4.4    Obtención y aislamiento de las partículas virales a partir de aislados clínicos .	29
4.5    Obtención del concentrado viral (stock viral) .....	30
4.6    Cuantificación de las partículas virales por titulación viral .....	30
4.7    Ensayos de susceptibilidad al aciclovir (ACV) .....	31
4.8    Obtención de antígenos virales en una infección lítica por VHS-1.....	32
4.9    Determinación de antígenos intracelulares de VHS-1 por inmunofluorescencia .....	32
4.10    Obtención de antígenos virales en una infección latente por VHS-1 .....	33
4.11    Determinación de anticuerpos neutralizantes contra VHS-1 por Microneutralización en Placa (MNP).....	34
4.12    Inmunoreconocimiento de las ICP en los modelos de infección lítica y latente por sueros de pacientes positivos para VHS-1 .....	34
4.13    Análisis Estadístico .....	36

<b>V.- RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
5.1 Pacientes con infección herpética de VHS-1 activa. ....	37
5.2 Obtención, amplificación y aislamiento de las partículas virales a partir de muestras clínicas .....	38
5.3 Cuantificación de las partículas virales .....	39
5.4 Ensayos de susceptibilidad al aciclovir (ACV) .....	40
5.5 Patrón de ICP en la infección lítica in vitro por VHS-1 .....	42
5.6 Patrón de ICP en la infección latente in vitro por VHS-1 .....	43
5.7 Determinación de anticuerpos neutralizantes contra VHS-1 por microneutralización en placa (MNP). ....	45
5.8 Identificación de antígenos virales en la infección lítica y latente por VHS-1 .....	47
5.8.1 Proteínas Inmunodominantes en una infección lítica por VHS-1 .....	49
5.8.2 Proteínas Inmunodominantes en una infección latente por VHS-1 .....	51
<b>VI.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>VII.- CONCLUSION .....</b>	<b>63</b>
<b>VIII.- BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>64</b>
<b>IX.- ANEXOS .....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA</b>		<b>PAGINA</b>
1.	Especies de virus herpéticos que forman parte de la gran familia <i>Herpesviridae</i> .....	2
2.	Manifestaciones clínicas del virus herpes simplex.....	3
3.	Genes y proteínas que expresa el VHS-1 durante la infección celular.....	12
4.	Criterios del Paciente.....	26
5.	Títulos virales obtenidos para cada uno de los aislados clínicos así como las cepas virales de referencia.....	40
6.	Resultados del ensayo de MNP y ELISA para cada uno de los sueros de los pacientes con infección activa por VHS-1.....	47

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Esquematación de la progresión de una lesión herpética con respecto al tiempo.....	4
2. Morfología del virión del herpes, consta de cuatro estructuras morfológicamente diferenciables. El núcleo interno que contiene el ADN bicatenario lineal encerrado en una cápside icosaédrica que, a su vez, está rodeado por una capa de proteínas designado el tegumento, finalmente el virus tiene una envoltura lipídica que contiene proteínas codificadas por el virus en su mayoría glicosiladas.....	6
3. Representación de la organización del genoma del VHS-1 con algunos genes que codifican algunas de las proteínas importantes que participan el proceso infeccioso.....	7
4. Ciclo de replicación activa de los herpes virus.....	9
5. Ciclo de infección del VHS-1 en células neuronales.....	15
6. Los mecanismos de neutralización del virus por efecto de los anticuerpos.....	20
7. Anticuerpos IgM e IgG anti-VHS-1 presentes en los sueros de los pacientes con infección herpética activa que fueron determinados por ELISA. A) Determinación de anticuerpos IgM Anti-VHS-1, se muestra que la mayoría de los pacientes tenían bajos niveles de este anticuerpo. B) Determinación de anticuerpos IgG anti-VHS-1, se muestra le presencia de esta inmunoglobulina en la mayoría de los pacientes. Los valores están expresados en Unidades Internacionales por ml. Se realizó una prueba de t de	37

student para determinar la significancia entre los grupos.\*  $P = 0.0127$ .....

8. ECP de las células Vero durante la amplificación de los aislados clínicos por la infección por VHS-1. A) al tiempo cero de infección. B) a los 5 días p.i., C) 7 días p.i, D) a los 7 días p.i a 40X de magnificación..... 38
9. Titulación viral a partir de un concentrado viral por UFP y teñidos con Giemsa. A) formación de placas en diferentes diluciones del virus para determinar la concentración viral en UFP/ml. B) células Vero teñidas sin infección, C) la presencia de una placa lítica a 10X de magnificación..... 39
10. Resultados del análisis de reducción de UFP del aislado #42 y cepa KOS de VHS-1 respectivamente por la presencia de la concentración decreciente de ACV..... 41
11. Concentraciones de  $IC_{50}$  en mg/ml obtenidas para cada uno de los VHS-1 de los aislados clínicos y la cepa KOS..... 41
12. Patrón de ICP en un Gel SDS-PAGE al 10%. Carril 1: marcador de PM en kDa; carril 2: cepa VHS-1 KOS; carriles 3-12 diferentes aislados clínicos (#1, #9, #13, #17, #18, #26, #27, #28, #39 y #42, respectivamente); y carril 13 control negativo (células Vero sin infección)..... 42
13. Ensayo de IF en células Vero no permisivas a la infección por VHS-1 y células de neuroblastoma (SK-N-SH) permisivas para la infección y muestra señal derivada de la presencia del virus..... 44
14. Patrón de ICP en la infección latente *in vitro*. Gel de SDS-PAGE al 10%, carril 1: marcador de PM en kDa; carril 2: cepa VHS-1 KOS; carril 3-12: diferentes aislados clínicos (#1, #9, #13, #17, #18, #26, #27, #28, #39 y #42, respectivamente); y carril 13: control negativo (células SK-N-SH sin infección)..... 45
15. Placa de cultivo donde se ve el efecto neutralizante y se va perdiendo conforme aumenta la dilución de los sueros. Columna 1 control positivo de 46

neutralización, columna de 2 un suero negativo y de las columnas 3 a 11 sueros de pacientes (#1, #4, #5, #6, #7, #8, #13, #14 y #15 respectivamente). En la columna 12 los controles de la infección.....

16. Inmunoelectrotransferencia (Western blot) en los dos modelos de infección con la cepa KOS de VHS-1 como referencia y 4 aislados diferentes.....	48
17. Curva de calibración de pesos moleculares de las proteínas.....	49
18. Porcentaje de reconocimiento para once proteínas de los 11 VHS-1 aislados de muestras clínicas.....	50
19. Porcentaje de reconocimiento de las 11 proteínas virales expresadas 7h p.i. en el ciclo de infección lítico en células Vero.....	51
20. Porcentaje de frecuencia de reconocimiento de 11 proteínas virales expresadas 7h p.i. en el ciclo de infección latente en células SK-N-SH.....	52

## ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
AcN	Anticuerpos Neutralizantes
ACV	Aciclovir
A-DMEM	Medio basal de Eagle modificado de Dulbecco-Advance
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANA	Anticuerpos Anti-Nucleares
ATCC	Colección de cultivos y cultivos americana
BSA	Albúmina sérica bovina
cel	Células
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECP	Efecto Citopático
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FMV	Famciclovir
g	Gramos
gluc	Glucosa
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
HR	Humedad Relativa
HSE	Encefalitis por Herpes Simplex
HRP	Peroxidasa de rábano
ICP	Proteína de célula infectada
IC <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria del 50%
IF	Inmunofluorescencia
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodaltons
KOS	Cepa de virus de Herpes simplex tipo 1
l	Litro
M	Molaridad
mg	Miligramos
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
milliQ	Agua ultra pura
min	Minutos
ml	Mililitros

mM	Milimolar
MNP	Microneutralizacion en placa
MOI	Multiplicidad de infecci3n
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidr3xido de sodio
nm	Nan3metros
°C	Grados Cent3grados
p.i.	Post infecci3n
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacci3n en cadena de la Polimerasa
UFP	Unidad formadora de placa
pH	Potencial de Hidr3geno
PM	Peso molecular
PSA	Persulfato de amonio
PVDF	Fluoruro de polivinilideno (membrana)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes
SK-N-SH	L3nea celular, neuroblastoma humano
TA	Temperatura ambiente
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
V	Voltios
Vero	L3nea celular, fibroblastos de riñ3n de mono verde africano
VHS-1	Virus del Herpes Simplex tipo 1
VHS-2	Virus del Herpes Simplex tipo 1
VP	Prote3na del Viri3n
WB	Western Blot
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu$ g	Microgramos
$\mu$ l	Microlitros
$\mu$ M	Micromolar



## RESUMEN

**Pilar del Carmen Morales San Claudio**  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Obtención del grado: Febrero, 2013

Título del Estudio:

**IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES DEL VHS-1 EN PACIENTES CON INFECCIÓN ACTIVA Y SU COMPARACIÓN EN LA INFECCIÓN LATENTE *IN VITRO***

Número de páginas: 96

Candidata para el grado de Doctor en Ciencias  
Con orientación en Inmunología

Área de estudio: Inmunología

**Propósito y Método del Estudio:** La infección causada por el VHS está ampliamente distribuida en todo el mundo, es responsable de enfermedades infecciosas leves localizadas o recurrentes hasta formas diseminadas y graves e incluso mortales, principalmente en aquellas personas que se encuentran inmunosuprimidas o en recién nacidos. Además el virus tiene la propiedad de infectar células neuronales y establecer una infección latente. En este trabajo se determinó la susceptibilidad al Aciclovir (ACV), la función de las inmunoglobulinas y la expresión de las proteínas virales en un modelo de infección lítico y un modelo de infección de latencia. Se obtuvieron sueros y se aisló el VHS-1 de la lesión de pacientes con infección activa por el VHS-1, se amplificaron las partículas virales en células Vero. La actividad antiviral del ACV se analizó por el método de reducción de placas determinándose la  $IC_{50}$  para cada aislado. Las líneas celulares Vero y SK-N-SH (neuroblastoma humano) se infectaron con los virus aislados durante 7 horas y luego se obtuvieron proteínas de células infectadas para la evaluación de la respuesta humoral por ELISA, ensayo de neutralización de anticuerpos y Western blot con los sueros de pacientes y se determinaron los antígenos inmunodominantes.

**Contribuciones y Conclusiones:** Todos los aislados analizados mostraron una susceptibilidad al ACV, por lo que en la región del noreste de México el tratamiento puede ser efectivo. Todos los pacientes presentaron una respuesta inmune humoral de memoria por anticuerpos IgG, el 87% fueron positivos contra VHS-1 y el 65% mostro una función neutralizante contra el virus. En el modelo de infección lítico se reconocieron 36 proteínas, las que tuvieron mayor reconocimiento fueron proteínas que participan en las etapas tempranas de la infección como ICP0, ICP6, ICP4, gD y VP20. En el modelo de infección latente se reconocieron 33 proteínas, se observó un menor reconocimiento de las mismas proteínas en este modelo, principalmente ICP4, marcando una tendencia en la modulación de la expresión de las proteínas virales y estas en su reconocimiento por el sistema inmune. La proteína de 55 kDa solo fue reconocida en el modelo de infección latente y hasta la fecha no se encontró información sobre esta proteína en este modelo, lo cual puede ser un blanco importante para un diagnostico oportuno principalmente en la HSE y/o candidato para el desarrollo de vacuna.



---

Dr. Ernesto Torres López  
Director de Tesis

# CAPITULO 1

## INTRODUCCION

Las infecciones causadas por virus de manera general están ampliamente distribuidas en el mundo y causan una gran variedad de trastornos patológicos. De los diferentes agentes considerados como infecciosos (bacterias, hongos o parásitos) las partículas virales son de los más simples y sencillos en su constitución. Una característica importante y que los distingue de los otros patógenos es que no presentan actividad metabólica por lo que no se les considera una entidad con vida sin embargo contiene los mínimos elementos necesarios para manifestar actividad y afectar a un organismo vivo ya que la única forma de encontrarlos de manera activa es parasitando una célula viva.

### 1.1 Virus del Herpes Simplex

La familia *Herpeviridae*, la cual está integrada por una gran variedad de especies, por lo que fueron designados en 3 subfamilias las cuales son: *Alfaherpesviridae*, *Betaherpesviridae* y *Gammaherpesvirida*, En ellos están integrados 8 especies que causan enfermedad en el ser humano. Todos lo herpes virus tienen la cualidad de causar una infección lítica en células permisivas y una infección latente en

ciertos tipos de células especializadas (1). El presente trabajo se enfoca de manera particular al virus del herpes simplex tipo 1 (VHS-1) de la familia *Alfaherpesviridae*. (Tabla 1)

SUBFAMILIA	VIRUS	CÉLULAS DIANAS	INFECCION LATENTE
<b><i>Alfa herpesviridae</i></b>			
Virus herpes humano 1	VHS1	Mucoepiteliales	Neurona
Virus herpes humano 2	VHS2	Mucoepiteliales	Neurona
Virus herpes humano 3	VVZ	Mucoepiteliales	Neurona
<b><i>Beta herpesviridae</i></b>			
Virus herpes humano 5	CMV	Monocitos, linfocitos y cel. Epiteliales	Monocitos, linfocitos y cel. Epiteliales
Virus herpes humano 6	VHH6	LT y (?)	Monocitos y Macrófagos
Virus herpes humano 7	VHH7	LT y (?)	LT y (?)
<b><i>Gamma herpesviridae</i></b>			
Virus herpes humano 4	VEB	LB y Cel. Epiteliales	LB
Virus herpes humano 8	VHH8	Linfocitos y otras células	LB

**Tabla 1.** Especies de virus herpéticos que forman parte de la gran familia *Herpesviridae*.

## 1.2 Prevalencia y características de la infección por VHS-1

La infección causada por el VHS es muy común y ampliamente distribuida en todo el mundo, además es responsables de una amplia gama de enfermedades en humanos, que van desde leves infecciones localizadas y/o recurrentes hasta formas

diseminadas y/o graves e incluso mortales, principalmente en aquellos grupos de personas que se encuentran inmunosuprimidos o recién nacidos (2, 3). Se estima una alta morbilidad por los episodios sintomáticos que se presentan en la infección. El determinar una prevalencia de casos con infecciones por VHS es notoriamente difícil por varias razones: en la mayoría de los países no se notifica la enfermedad y la mayoría de los sujetos infectados son asintomáticos o desconocen su infección. Sin embargo, desde la década de 1980 los métodos serológicos han hecho posible el estudio de la epidemiología de la infección por VHS y recientemente por la disposición de mejores pruebas que permiten la discriminación entre una infección causada por VHS-1 y otros virus herpéticos como el VHS-2, los cuales está estrechamente relacionado (con una homología del 83% en su secuencia génica). Por lo que se estima que aproximadamente el 90% de la población está infectada con VHS-1 y en un estudio realizado en estados unidos en una población infantil vieron que la seroprevalencia era de casi el 25% en niños de hasta 7 años incrementando a un 36% hasta los 13 años y junto con otros autores coinciden en que se presenta un incremento en el porcentaje de seropositividad con respecto a la edad. (4,5,6)

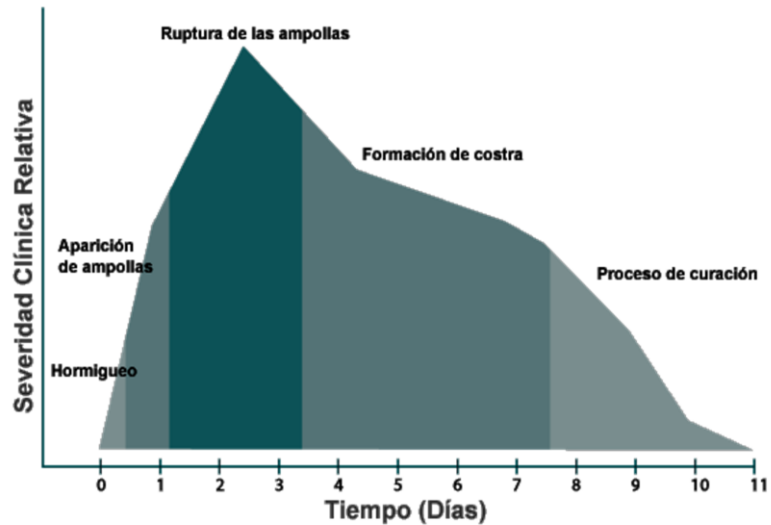
La infección por VHS-1 siempre se caracterizó por afectar la región orofacial conociéndose como herpes labial, aunque en la última década hay un gran número de estudios donde han encontrado este virus en región genital en donde es más frecuente encontrar el VHS-2 (3,6). La infección primaria por el VHS-1 se adquiere por contacto directo con una lesión o con fluidos corporales infectados (saliva, fluidos genitales, exudados de lesiones activas) al compartir vasos, cepillos de dientes u otros objetos

contaminados con saliva siendo las células epiteliales el blanco de infección. La infección por el VHS-1 de los dedos (paroniquia) puede ser el resultado del contacto de la boca con la piel, y el virus penetra a través de una grieta en esta. La autoinoculación puede originar también una infección ocular. (3,7). La infección ocular recurrente por VHS-1 es la principal causa de ceguera corneal infecciosa en los países industrializados. Además el VHS-1 es la causa más común que se ha identificado de encefalitis aguda viral esporádica en EE.UU reportando del 10% -20% de todos los casos (8). Las presentaciones clínicas se resumen en la tabla 2.

<b>INFECCIÓN POR VIRUS HERPES SIMPLEX TIPOS 1</b>	
<b>Características clínicas</b>	VHS-1
<b>Vía de transmisión</b>	Por contacto directo, secreciones orales
<b>Síndromes característicos</b>	Infección Oral-facial Infección Ocular Encefalitis Paroniquia
<b>Reactividad a antígenos monoclonales específicos</b>	VHS-1 específico

**Tabla 2.** Manifestaciones clínicas del virus herpes simplex

Una infección por VHS-1 provoca manifestaciones dolorosas y prurito como síntomas locales y síntomas sistémicos puede haber presencia de malestar, cefaleas y hasta fiebre. En el cuadro clásico, la lesión es una vesícula transparente situada sobre una base eritematosa («una gota de rocío sobre un pétalo de rosa») que posteriormente progresa para dar lugar a lesiones pustulosas, úlceras en donde las células infectadas experimentan apoptosis liberado material líquido en el espacio intradérmico con una carga viral importante causando las vesículas típicas y finalmente esta lesión progresa a costra. Las lesiones suelen aparecer en las comisuras bucales o junto a los labios (2,3).



**Figura 1.** Esquematación de la progresión de una lesión herpética con respecto al tiempo

Durante la progresión de la infección, esta va seguida por la dispersión del virus a las neuronas sensoriales regionales que inervan al tejido y se da el establecimiento de una infección latente que permanece durante toda la vida del hospedero. Por factores desencadenantes como el estrés, la luz UV, trauma o algún tipo de inmunosupresión (por medicamentos o infecciosa), entre otros ocasionando la reactivación del virus latente lo que induce el transporte del virus por la neurona de nuevo al epitelio periférico resultado en la enfermedad recurrente en o adyacente al sitio de la infección primaria. Dentro del tejido epitelial periférico se produce la replicación de VHS-1, que posteriores es la base de los brotes de infecciones leves a severas por el VHS y todo esto dependiendo del tipo de herpes virus en cuestión, la edad y el estado inmune del huésped. (2,5,9)

### 1.3 Diagnóstico y tratamiento de la infección herpética

Los métodos clásicos para la confirmación de las infecciones por VHS son la tinción de Tzang, ya que durante la infección se generan grupos de células multinucleadas y forman las células gigantes que son característicos para el VHS. También se encuentra el aislamiento y la detección en cultivos celulares mediante la observación del efecto citopático (ECP) y la detección inmunológica con anticuerpos fluorescentes. Son numerosas las técnicas descritas para la detección del antígeno, entre las cuales se encuentran la inmunofluorescencia, la que puede estar ligada a la citometría de flujo, los ensayos inmunoenzimáticos, la hibridación *in situ*, el análisis de restricción y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), todas utilizadas como herramientas de diagnóstico. El análisis por PCR del líquido cefalorraquídeo ha sustituido el análisis por inmunofluorescencia de una biopsia cerebral en el diagnóstico de la encefalitis herpética. (10,11)

Con respecto al tratamiento, este se basa en el uso de drogas anti herpéticas, que pueden clasificarse en al menos 2 categorías: la primera consiste en una variedad de análogos de nucleósidos; dentro de este grupo podemos citar al aciclovir (ACV), penciclovir (PCV), el Valaciclovir y famciclovir (FMV) entre otros. El ACV, representa el tratamiento de elección para las infecciones herpéticas, el cual es un análogo de la guanósina que para su activación requiere de fosforilación por la timidin quinasa (*tk*) herpética antes de trifosforilarse por enzimas celulares del hospedero. La forma trifosforilada inhibe la ADN polimerasa viral, inhibiendo en forma irreversible la

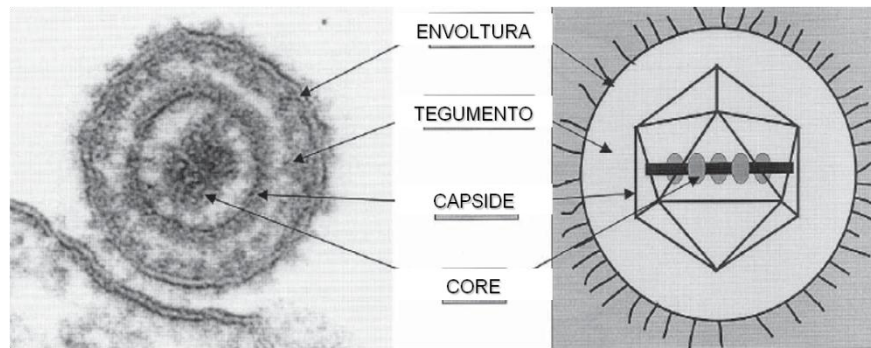
síntesis de ADN viral (12). La segunda categoría consiste en los análogos de pirofosfatos, los cuales actúan por inhibición directa de la ADN-polimerasa viral. El foscarnet es el más utilizado; se utiliza como tratamiento alternativo en pacientes con patologías producidas por cepas de VHS resistentes a ACV. La resistencia a los antivirales es inducida por 3 mecanismos: a) deficiencia de la *tk* en el virus, b) alteración en la especificidad del sustrato de la *tk* viral o c) virus con una ADN polimerasa alterada. (11,12)

Antes de la terapia antiviral la mortalidad era mayor del 70% en pacientes que desarrollaban encefalitis herpética, después del desarrollo de estas terapias en los años 80s solo el 20% de ellos fallecían (8). Tiempo después se observó la resistencia al ACV sobre todo en los pacientes inmunocomprometidos reportando una prevalencia de resistencia del 4 al 7%. (24)

#### **1.4 Estructura del Virus del Herpes Simplex-1**

El VHS-1 de la subfamilia *Alpha herpesviridae* del género herpes simplex forma parte de un grupo de virus constituidos por un genoma de ADN de doble cadena lineal de aproximadamente 155 kbps, (13,14) debido a que tiene un genoma grande el VHS codifica aproximadamente 80 proteínas con funciones moduladoras discretas entre estas están regular el proceso infeccioso en múltiples etapas, incluyendo la expresión génica, síntesis de ADN y el ensamblaje del virión. (9, 22)



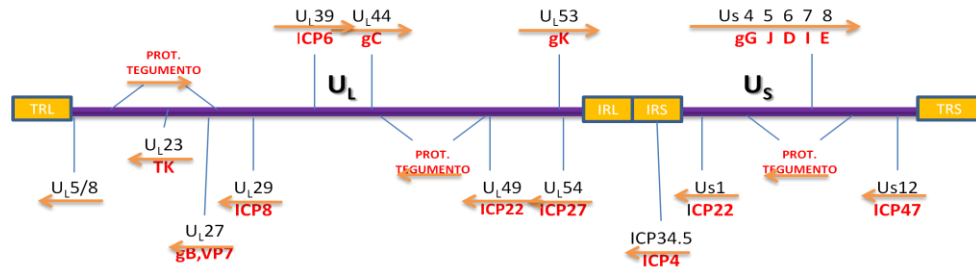


**Figura. 2.** Morfología del virión del herpes. Consta de cuatro estructuras morfológicamente diferenciables. El núcleo interno que contiene el ADN bicatenario lineal encerrado en una cápside icosaédrica que, está rodeado por una capa de proteínas denominando esta zona el tegumento, finalmente el virus tiene una envoltura lipídica que contiene proteínas codificadas por el virus en su mayoría glicosiladas. (15)

La partícula viral tiene un tamaño aproximado de 150-200 nm de diámetro y está constituida por cuatro estructuras bien definidas (figura 2) las cuales son:

- A.- Un núcleo (core) electro-opaco el cual está formado por ADN de doble cadena lineal que consta de 80 genes. El genoma está organizado en 2 segmentos denominados región única larga (UL) que es el 82% del genoma, una región única corta (Us) el 18%. Estas regiones están flanqueadas por regiones repetitivas no traducibles como se representa en la figura 3. (14,16) Los genes virales se expresan en cascada y se han clasificado en 3 grupos denominándolos genes alfa o inmediatos tempranos ( $\alpha$ , IE), beta o tempranos ( $\beta$ , E) y gama o tardíos ( $\gamma$ , L); cada uno con características particulares. Generalmente los genes  $\alpha$  son inductores de la transcripción, los genes  $\beta$  codifican para enzimas virales

tales como la *tk* y la ADN polimerasa viral y los productos de los genes  $\gamma$  son las proteínas estructurales de la partícula viral. (5,8)



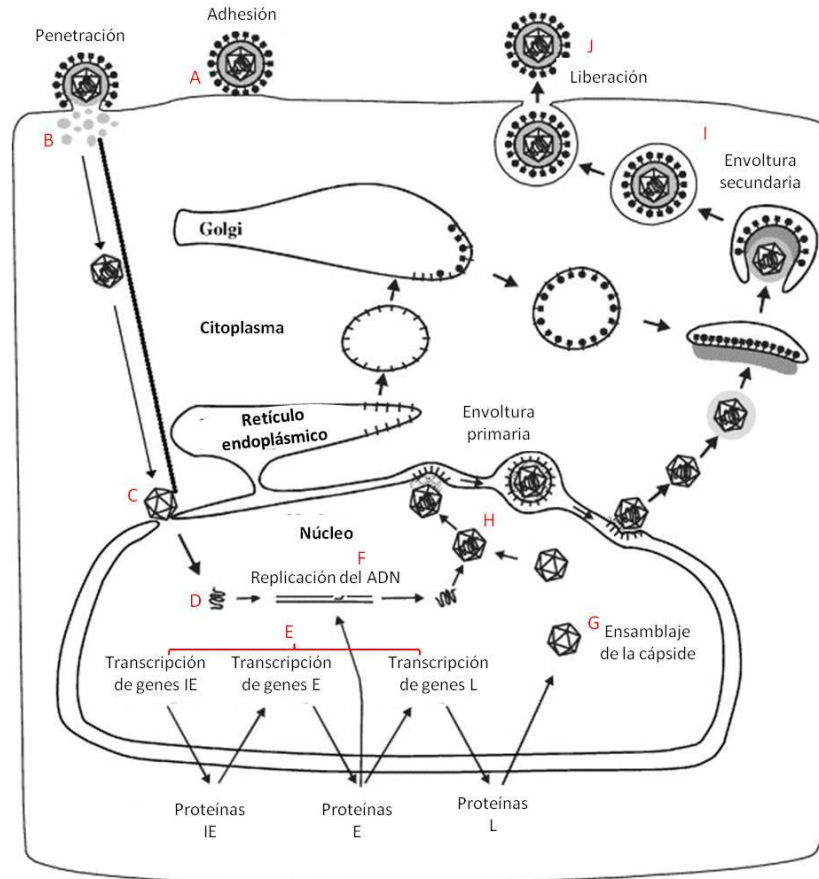
**Figura 3.** Representación de la organización del genoma del VHS-1 con algunos genes que codifican algunas de las proteínas importantes que participan el proceso infeccioso.

- B.- La segunda estructura es la cápside de forma icosaédrica con 162 capsómeros formados por cuatro proteínas designadas proteínas del virión (VP), la principal proteína VP5, VP26, VP23 y VP19C, con la cual contiene y resguarda el material genético del virus. La cápside es de aproximadamente 125 nm de diámetro y aproximadamente 15 nm de espesor (5,7,17)
- C.- Después de la cápside hay un espacio amorfo denominado tegumento el cual contiene aproximadamente 20 proteínas virales implicadas en las fases iniciales de la infección y replicación viral, como también en el transporte del ADN viral (7, 13)
- D.- El VHS-1 es un virus envuelto así que como última estructura externa esta la membrana viral, la cual es una bicapa lipídica que contiene 11 diferentes glicoproteínas designadas como: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI,

gJ, gK, gL, y gM, las cuales median la interacción y penetración del virus a la células. De todas las glicoproteínas cuatro (gD, gH, gL y gB) son esenciales para la entrada del VHS a la célula animal. (18)

### **1.5 Infección lítica del VHS-1**

Se menciona que el virus tiene la propiedad de establecer dos tipos de infecciones. Una infección activa denominada lítica y una de latencia. El ciclo de infección lítica se caracteriza de manera general por las siguientes etapas que incluyen: entrada en la célula a través de la fusión mediada por el receptor, la entrega del genoma envuelto en el núcleo, establecimiento de por vida de la infección latente, la replicación del ADN y ensamblaje de la cápside en el interior del núcleo, salida de los genomas envueltos desde el núcleo hasta el citosol, la maduración y envolvimiento de partículas virales en el citoplasma, y exocitosis de partículas virales infecciosas, entre otras propiedades moleculares figura 4 (19)



**Figura 4.** Ciclo de replicación activa de los herpesvirus. Representación esquemática del ciclo de replicación del herpesvirus, incluyendo: A) entrada del virus, B) disociación de tegumento, C) transporte de cápside al poro nuclear, D) liberación de ADN viral en el núcleo, E) transcripción de genes de un modo de cascada, F) replicación del ADN, G) ensamblaje de la cápside, H) empaquetamiento del ADN, I) el virión adquiere la membrana y finalmente J) se libera la partícula viral completa y madura. (Modificada de Mettenleiter (23)).

La entrada del VHS a la célula del huésped es un proceso de múltiples pasos que permite la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular del hospedero. Esta interacción es mediada principalmente por cuatro de las 11 glicoproteínas presentes en la membrana viral, suficientes para permitir la fusión virus con la membrana plasmática de la célula huésped y estas son la gB, gD, gH, y gL (20)

Como primer paso es la interacción de la glicoproteína gC y/o gB de la envoltura del VHS con los glicosaminoglicanos de la superficie celular como los heparán sulfato. La interacción de la gD con uno de los receptores desencadena la penetración del virus, que se produce a través de fusión de la envoltura viral con la membrana celular y requiere glicoproteínas gB, gD, gH y gL (24). En general, las tres clases diferentes de receptores de superficie que sirven como receptores de gD para la entrada VHS en las células son: un miembro de la familia del receptor de TNF (receptor HveA), dos miembros de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig), los cuales son nectin-1 (también conocido como Prr1 o HveC) y nectin-2 (también conocido como Prr2 o HveB) y finalmente sitios específicos de heparán sulfato generado por la acción de ciertas isoformas de la 3-sulfotransferasa (como 3-OST-3A, 3-OST-3B, y 3-OST-5) (21,25).

Una vez que las membranas se han fusionado, quedan liberadas las proteínas del tegumento y nucleocápside viral en el citoplasma. La región del tegumento contiene algunas proteínas importantes para que se dé el arresto celular, transporte de la nucleocápside al núcleo (por VP16 y VP1-2), en donde el ADN viral se libera. Tras la interacción con un complejo multiproteico formado por la proteína del tegumento VP16, el factor celular octámero (Oct1, proteína de unión al ADN) y otros factores celulares, se inicia la transcripción en cascada secuencial primero de los genes inmediato-temprano (IE), sus picos de síntesis son de 2-4 h postinfección y estos sirven como transactivadores de la expresión de los genes tempranos (E). Estos alcanzan sus niveles más elevados de 5-7 horas, se pueden detectar en las primeras 3 h y continúa hasta las 15 horas post infección. Las proteínas de los genes tempranos incluyen a las enzimas que se

requieren para la replicación del genoma viral: una ADN polimerasa. Finalmente la expresión de genes virales termina con la aparición de las proteínas gamma o tardías, que constituyen a las proteínas estructurales del virus. Las proteínas virales se traducen en el citoplasma, y el ADN viral se replica y se empaqueta en cápsides en el núcleo. (26,27)

La Expresión del gen VHS es temporal y es regulada en tres fases distintas: los genes IE, E y tardíos L. En la transcripción de IE no requiere la síntesis de proteínas nuevas y es estimulada por la VP16 y otros factores. Son 5 las proteínas del gen E para la replicación del virus en cultivo celular, estas son: ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 y ICP47. La ICP0 tiene al menos dos funciones importantes: estabilizar el ciclo celular regulando proteínas (por ejemplo, ciclina D3), obligando a la célula hasta el límite de la fase S (pero que no permite la división celular) y mantener una la síntesis activa de proteínas para su propio uso (8,18).

En general ICP4 reprime la expresión de los genes IE y activa los genes E o L expresión mediante la interacción con el factor transcripcional RNA polimerasa II. La expresión de los genes E es más dependiente de por lo menos una proteína de IE y en general los genes E codifican proteínas no estructurales que juegan un papel importante en que se lleve a cabo la síntesis y replicación del DNA viral. Finalmente se expresan los genes L los cuales requiere de las proteínas producidas por los genes IE. Las proteínas L son proteínas estructurales ya que conforman la estructura del virión, se forma la cápside

y se empaqueta el ADN viral. Las proteínas de tegumento se unen después a la cápside. Las partículas virales adquieren una envoltura por gemación en la membrana nuclear interna. La subsecuente salida implica la fusión de las partículas víricas con la envoltura dentro del espacio perinuclear con la membrana nuclear externa, y las cápsides desnudas producidas adquieren su envoltura lipídica, ya sea desde la membrana plasmática o de organelos tales como el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (ER) antes de ser transportados a la superficie celular liberando las partículas virales y causando la muerte de la célula (9,28)

En la tabla 3 se ejemplifican algunas de las proteínas virales que se sintetizan durante el proceso infeccioso (9, 29, 30, 31, 49).

GENES	PROTEÍNAS	FUNCIÓN
<b>Inmediatos tempranos (IE)</b>	ICP0	Trans-activador de ARNm inespecífico, co-factor para la transcripción mediada por ICP4; reordenamiento del dominio nuclear antes de la síntesis de ADN VHS
	ICP4	Fosfoproteína de regulación de la transcripción de los genes E y L; específico en unión a ADN
	ICP22	Co-factor para la expresión de genes L
	ICP27	Participa en la expresión génica tardía: inhibe el empalme de ARN nuclear (redistribución de snRNA) y transporta ARNm viral al citoplasma
	ICP47	Inhibe el transporte de péptidos y su presentación por la vía CMH clase 1
<b>Tempranos</b>	ICP8	Se une al AND de cadena sencilla, esencial para la

<b>(E)</b>		replicación del ADN
	ICP6	Subunidad larga de la ribonucleotido reductasa
<b>Tardíos</b>	VP23	Formas tríplex con VPI9C
<b>(L)</b>	VP5	Proteína principal de la cápside, (155 kDa)
	VP21	Producto de escisión C-terminal después de empaquetamiento del ADN
	VP24	Dominio N-terminal del precursor UL26 con actividad proteasa de serina.
	VP22a	Proteína típica de cápside B, eliminado después el empaquetamiento del ADN y la escisión por la VP24
	VP26	Proteína vértice
	VPI9C	Forma básica de la cápside junto con VP5 y VP23

**Tabla 3.** Genes y proteínas que expresa el VHS-1 durante la infección celular lítica.

## 1.6 Infección de latencia del VHS-1

Los herpes virus están asociados con varios tipos de infecciones en el sistema nervioso central (SNC), siendo la Encefalitis del herpes simple (HSE) considerada como una de las enfermedades más graves. El HSE es la causa más frecuente de la encefalitis fatal esporádica en los Estados Unidos. En pacientes no tratados es superior a 70% y la recuperación completa de la función neurológica es baja. El VHS establece una infección latente en los ganglios del trigémino, sacra y vagal en humanos. Cuando se reactiva la infección, el VHS a menudo causa una enfermedad más leve. Se ha estimado que aproximadamente la mitad de los casos de HSE se deben a infecciones primarias y la otra mitad son de infecciones recurrente (32,33).



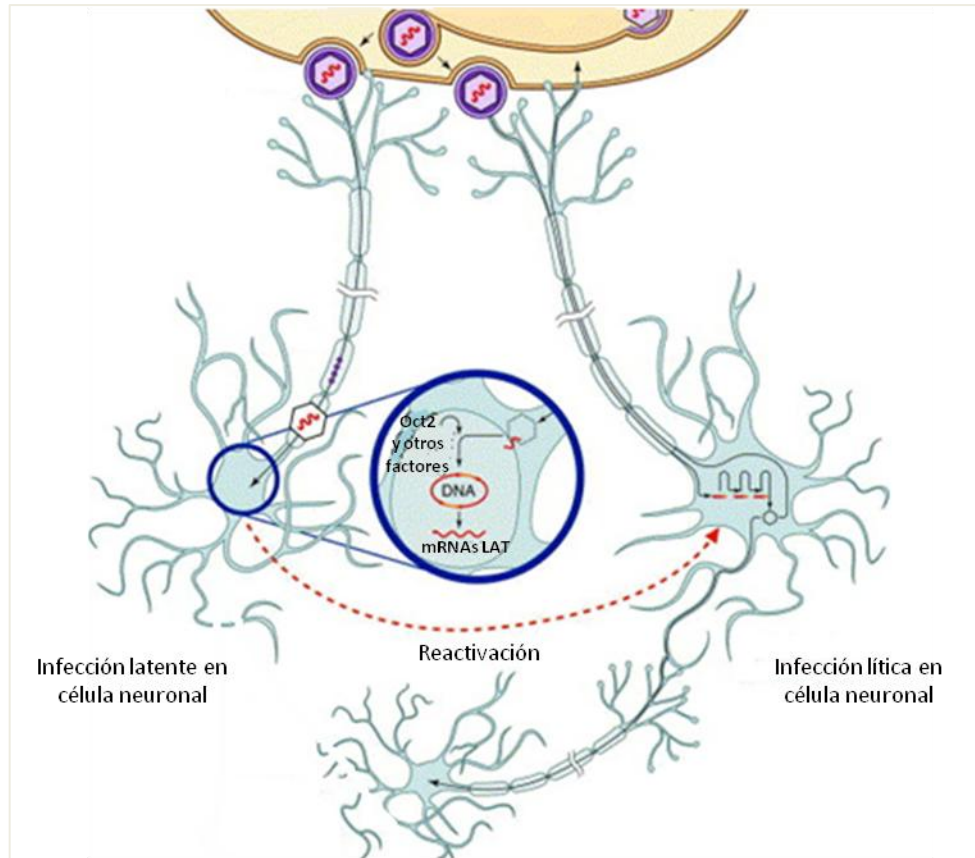
Después de la inoculación de la piel o mucosas, el virus pasa por el proceso de la infección lítica antes de entrar a los ganglios dorsales de las neuronas sensoriales. De donde la nucleocápside es transportada de los nervios terminales a través de los axones en una dirección retrógrada hacia el cuerpo celular neuronal, penetra al núcleo, el ADN es liberado y la transcripción génica es restringida. Como la proteína VP16 y la cápside viral llegan al núcleo de la célula, se ha planteado la hipótesis de que, si la proteína se pierde durante el transporte axónico, la entrada en el estadio de latencia es favorecida. El virus posee un sistema promotor natural (LAP1 y LAP2) que se mantiene activa durante la latencia, donde solo se expresa un transcripto denominado transcripto asociado a latencia (LATs, Latency-associated transcript) existen tres formas: 8.3 kb, 2.0 kb y 1.5 kb. Factores neuronales transcripcionales tales como Oct2 y Pou4, se han reportado para regular de manera negativa la expresión de genes en neuronas en la infección latente. Durante su existencia latente dentro de la neurona el DNA del VHS-1 forma un episoma. Finalmente el virus se establece y mantiene de por vida en el huésped. (26,34,35)

La función precisa de LAT es desconocida. Se cree que puede estar implicado en la reactivación del virus. La transcripción del gen LAT se expresa abundantemente en las neuronas infectadas, y se ha demostrado que es necesaria para promover el establecimiento y el mantenimiento de la latencia, en parte debido a las funciones anti-apoptosis de LAT, y la capacidad de los micro-ARN y otros ARNs pequeños no codificantes para interferir con la infección productiva principalmente en la regulación

de la expresión de la proteína ICP0 e ICP4 que como ya se menciono son importantes en el desarrollo de una infección activa (36,37).

En las reactivaciones periódicas resultan del transporte del virus de forma anterógrada del cuerpo celular hasta los axones nerviosos terminales en donde causa ya sea una enfermedad clínica recurrente o una condición asintomática de carga viral en la piel o mucosa. Los factores que causan una reactivación pueden ser ambientales como la radiación UV o factores del huésped como el estrés o la inmunosupresión. También se ha dado un aumento de la evidencia sugiere que los genes ICP0, ICP4 y VP16 son esenciales para la reactivación del virus en latencia, sin embargo los mecanismos moleculares siguen siendo inciertos (29,39,40,41).

La parte positiva de esta característica que tienen los herpes virus es su intención en usarlos para el tratamiento de problemas neuronales, esto mediante la transferencia de genes directamente en neuronas o de proteínas genéticamente alteradas que tienen funciones críticas en la fisiología neuronal, incluyendo los responsables de la generación de potenciales de acción, la síntesis y liberación de neurotransmisores por mencionar algunos ejemplos (38).



**La figura 5.** Ciclo de infección del VHS-1 en células neuronales. Se da posterior al ciclo de infección en células mucoepiteliales. Los Viriones envueltos son liberados en la membrana celular. Las partículas virales encuentran y se fusionan con la membrana celular de las terminales nerviosas periféricas que inervan el sitio de la infección primaria. La nucleocápside viral viaja a través de transporte axonal retrógrado al cuerpo celular neuronal, donde el virus puede proceder a través de la cascada altamente regulado de la expresión génica lítica e inducir latencia. El virus es capaz de reactivarse a sí mismo desde el estado latente en respuesta a una amplia variedad de estímulos que le permiten entrar en la actividad lítica de su ciclo de infección. En esta etapa, los viriones progenie puede ser transportado de vuelta al sitio de la primaria infección o el virus puede entrar en el SNC (modificado de M. Simonato *et.al*,(26))

## 1.7 Respuesta inmune contra VHS

El VHS-1 se trasmite por contacto a través de la piel lesionada o mucosas para adherirse a las células epiteliales que representan la principal objetivos del VHS. La infección por VHS inducen mecanismos de defensa innatos que están destinados a limitar la propagación del virus y la difusión inicial de célula a célula, seguido por la activación de la respuesta inmune adquirida antígeno/específica , la cual se encarga de eliminar la infección con eficacia.

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa cuenta con estrategias contra las infecciones, entre ellas las virales. Los macrófagos producen óxido nítrico y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) es liberado por los linfocitos TCR  $\gamma\delta$  + proporcionan componentes de una respuesta inmune innata que ayuda en el control de la replicación y la propagación viral. Otros elementos con actividad antiviral son los interferones de tipo I, interferón alfa e interferón beta 1 (INF $\alpha$  e INF $\beta$ ) los cuales actúan a nivel de replicación del genoma viral reduce su replicación d y el establecimiento de latencia. Esta temprana protección elimina la mayoría de los virus replicantes que infectaran al TG antes de una respuesta inmune adaptativa. (42)

La expresión de quimiocinas inflamatorias durante la infección por VHS-1 es inducido por el reconocimiento de los productos virales por receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y de linfocitos específico reconociendo

antígenos virales. El reconocimiento de antígenos conduce la expresión de quimiocinas, así como la producción de  $\text{IFN}\gamma$  y factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ). Los PAMPs inducen la transducción de señales a través de la familia de receptores tipo Toll (TLR) y ARN de cadena doble inducible proteína quinasa (PKR). Tras el reconocimiento estas vías inducen ya sea directamente la producción de quimiocinas a través del factor nuclear kappa B ( $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ) y proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) o activación indirectamente a través de la  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  o factores regulador de interferón 3 y 7 impulsado la expresión de citocinas inflamatorias tales como los IFN tipo I,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 e IL-6.(43)

El control de VHS-1 durante la infección primaria requiere la expresión de IFN tipo I y el reclutamiento de células natural killer (NK), que culmina en la inducción de respuestas antígeno específicas por las células que controlan la replicación viral a través de la lisis de las células infectadas y en la producción de citoquinas. Además la generación de células T  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$  específicas contra el virus se requiere en última instancia para controlar la replicación viral en los tejidos neurales, unidad de VHS-1 en latencia, y evitar la reactivación. El fracaso en cualquier paso en este proceso resulta en la replicación viral no controlada que conduce a la encefalitis por herpes simple. A la inversa, el control eficaz de la replicación viral innata puede disminuir la carga viral latente presente en los ganglios sensoriales, y reducir la frecuencia de la subsiguiente reactivación. (44)

La historia natural de las infecciones por VHS es influenciada por ambos mecanismos de defensa específicos y no específicos. Con la aparición de cambios inflamatorios no específicos que son paralelos a un pico en la replicación viral, la respuesta específica se puede cuantificar, pero varían entre los sistemas animales. En el ratón, las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado se identifican dentro de 4-6 días después de la aparición de la enfermedad y son seguidos por la respuesta de linfocito T citotóxico y por la aparición de ambos anticuerpos IgM e IgG específicos. La respuesta en el hombre está retrasada, desarrollándose aproximadamente 7-10 días después de la infección. (45)

Los anticuerpos neutralizantes y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos aparecen generalmente 2-6 semanas después de la infección y persisten durante toda la vida del hospedero. La respuesta de anticuerpos en la Inmunotransferencia e inmunoprecipitación define la respuesta del hospedero a polipéptidos de células infectadas y se han correlacionado con el desarrollo de anticuerpos neutralizantes (AbN). Después de la aparición de la infección, se ha observado que los anticuerpos van dirigidos contra gD, gB, ICP-4, gE, gG-1 o gG-2, y gC.(18)

La inmunidad humoral es importante para la protección contra la infección viral y neutralización de virus extracelular, pero la desaparición del virus de tejidos infectados se cree que está mediada únicamente por la inmunidad celular (22). A través de diversas

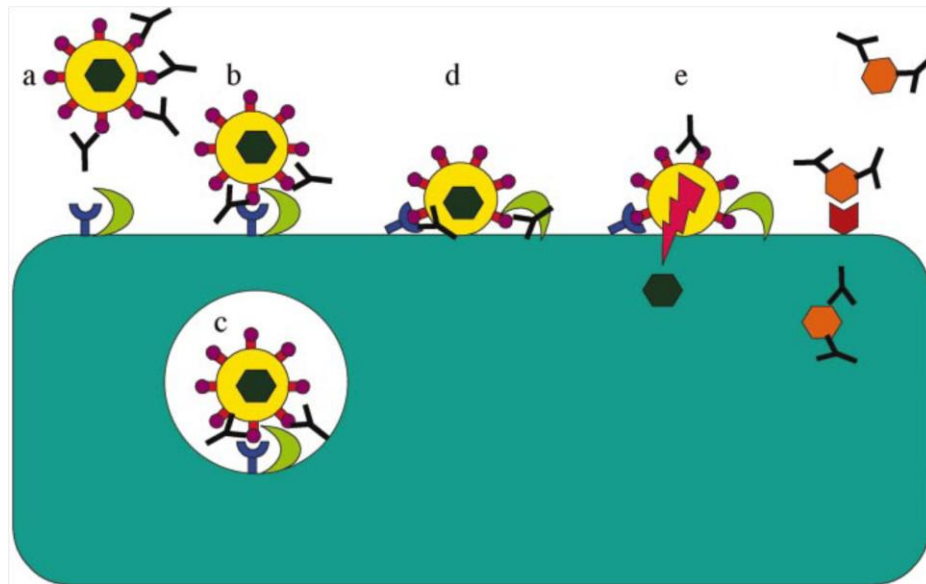
infecciones por virus, se ha encontrado que los AbN emplean múltiples mecanismos para interferir con la replicación viral. La unión al receptor y la fusión mediada por las proteínas de la envoltura son pasos esenciales en el ciclo de vida de todos los virus y por lo tanto un objetivo principal para los anticuerpos neutralizantes. La mayoría de los anticuerpos neutralizan viriones libres mediante la prevención de la participación del receptor o al interferir con el proceso de fusión (29,48).

Existen varios mecanismos por el cual los anticuerpos pueden de alguna forma neutralizar a las partículas virales evitando la infección de la célula animal, a continuación se describen 5 mecanismos de acción (figura 6):

- a) El Ab se une a una proporción de las estructuras del virión que interactúa con el receptor en la célula, bloqueando la unión del virus a la superficie de las células diana.
- b) El Ab interacciona entre la proteína de la envoltura viral y los receptores de superficie celular, está demostrado que ocurre después de que el virión se ha unido a los receptores. Por ejemplo, un receptor puede servir como un punto de unión induciendo de cambios conformacionales que permiten la interacción con un co-receptor, que a su vez mediará los acontecimientos posteriores, como la fusión de membranas. El Ab interfiere con cualquiera de estos mecanismos necesarios que conducen a la entrada del virus, constituiría un mecanismo de neutralización.

- c) Con el fin de infectar, algunos virus requieren internalización por endocitosis y la disminución del pH en el endosoma como un disparador de los cambios conformacionales de las proteínas virales. Se ha observado Ab que no han bloqueado la fijación del virus pero si se internalizaron, podrían retrasar o prevenir la penetración de la cápside en el citoplasma de las células diana. El virión puede ser destruido debido a la degradación lisosomal. Tales efectos de Ab constituirían un mecanismo de neutralización de virus. Además los Ab pueden modificar la ruta de entrada del virus que preferentemente entran directamente a través de la superficie de la célula a una vía endosomal menos permisiva puede suprimir la infectividad.
- d) La intercalación de los Ab en la interfaz de fusión entre la membrana celular y la envoltura de un virus puede bloquear la fusión en la superficie celular o en un endosoma.
- e) Se ha sospechado que incluso una baja interacción de anticuerpo en el virión puede causar cambios globales o internos transmitiendo una señal a través de la envoltura viral. Estos cambios hipotéticos pueden permitir al núcleo viral entrar en el citoplasma, pero compromete a más pasos de replicación.





**Figura 6.** Los mecanismos de neutralización del virus por efecto de los Ab. (Modificada de Klasse y Sattentau (47)).

El sistema inmune está diseñado para proteger la integridad del organismo, con el paso del tiempo no solo el ser humano ha evolucionado y establecido mecanismos celulares y moleculares complejos sino que también los microorganismos. Para establecer la infección por herpesvirus, es esencial que modulen las células y evadir las respuestas inmunitarias del hospedero. Evadir el sistema inmune innato puede ser particularmente importante para los herpesvirus, dado su ciclo de replicación y su mantenimiento de infecciones latentes de toda la vida.

Estos mecanismos de evasión comprenden: Variación genética del virus, Resistencia viral, Regulación de la presentación de antígeno, mutaciones de secuencias repetidas así como de mimetismo de receptores y proteínas secretoras. Además, la expresión viral del gen IE, la proteína ICP47 bloquea la interacción de los péptidos

virales con el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I inhibiendo al transportador asociado con la presentación de antígenos (TAP) en el retículo endoplasmico, impidiendo o retardando la presentación antígeno viral a los linfocitos T CD8+.

La apoptosis de las células representa un importante mecanismo de defensa contra la infección por virus previniendo la replicación y diseminación viral. Existen vías extrínsecas que inducen apoptosis que es mediante la activación de receptores o por efecto de granzimas. Desencadenantes intrínsecos de la apoptosis están el ADN dañado, el estrés oxidativo, la privación de factores de crecimiento, perdida la integridad de la membrana mitocondrial e infecciones virales lo que resulta en la liberación de citocromo c en el citoplasma. Los virus, incluyendo VHS-1 han desarrollado numerosas estrategias para contrarrestar la apoptosis. La apoptosis es inducida en respuesta a VHS-1 en varios puntos de control de señalización y el virus a su vez, se ha desarrollado múltiples mecanismos que bloquean apoptosis para evitar la muerte celular prematura (49).

Se ha demostrado que VHS-1 hace que las células infectadas resistentes a la apoptosis inducida por los linfocitos T citotóxicos. Por otra parte, estudios realizados en conejos y ratones han demostrado que la infección latente en neuronas son resistentes a la apoptosis, aunque solo LAT y no proteínas virales podrían ser detectado. Una estrategia importante de evasión inmune de VHS-1 es atacar células inmunes, incluyendo células T, células B y macrófagos. Lo más importante, al igual que muchos otros virus de herpes, VHS-1 también se dirige a las células dendríticas humanas

inmaduras (IDC) e induce la apoptosis, representando un mecanismo de evasión inmune que da al virus la oportunidad de replicarse eficientemente en las células epiteliales y establecen latencia en las neuronas. (50)

Otro mecanismo es por medio de las glicoproteínas E que son receptoras de Fc, y las glicoproteínas C tienen actividad de unión al fragmento C3b del complemento. La porción Fc de la IgG se une al complejo gE/gI encubriendo así al virus y a las células infectadas por este, reduciendo de esta manera la efectividad de los anticuerpos (40).

Para el análisis de un patógeno siempre fue primordial el que este se pudiera aislar y mantener de manera *in vitro* como parte de los postulados de Koch (51). Los primeros reportes del aislamiento de VHS-1 fue en 1955 del hospital Johns Hopkins de un paciente con eccema herpético, se realizaron varios pasajes y en 1958 se designó cepa NT. En 1967 en la universidad de Chicago se aisló otro virus del herpes de una infección en cara denominándolo cepa F (face) (52), siendo esta cepa la más trabajada y publicada. De los principales trabajos que se encuentran son los realizados por el Dr. Bernard Roizman y sus colaboradores a partir de los años 70.

La infección por VHS es muy antigua y existen muchos trabajos publicados donde principalmente trabajan con una cepa de referencia como VHS-1 KOS. El trabajo de C. Glorioso *et al* infectan la línea celular neuronal B103 de rata evaluando solo las

proteínas se superficie (26). En un trabajo realizado por Corey y cols evalúan solo los anticuerpos contra la glicoproteína G en los pacientes con infección herpética (55).

Existen otros trabajos donde emplean la línea celular neuronal humana SK-N-SH. Esta el trabajo de Roizman y cols, pero evalúan el comportamiento del genoma del virus, enfocándose en el gen g<sub>1</sub>34.5 (53). En el 2008 sale una publicación de Blaho y cols. Retomando la importancia de las proteínas y en su trabajo se enfoca en 3 de ellas (ICP4, ICP27 y VP22) (56).

## **CAPITULO II**

### **JUSTIFICACION**

El virus del herpes está distribuido en el mundo y persiste estableciéndose como una infección latente que permanece durante toda la vida del ser humano. La infección por el VHS-1 puede causar encefalitis herpética además de que se ha asociado también con enfermedades neurodegenerativas.

No se conocen totalmente los factores involucrados que determinen el establecimiento de la infección latente en células neuronales por el VHS y su relación con la respuesta inmune, principalmente la respuesta inmune humoral, la cual juega un papel importante en la infección viral. El ver cuál es el papel de la respuesta inmune y si hay reconocimiento en la infección latente proporcionara más información para entender mejor este mecanismo.

Por lo anterior, es de gran importancia el estudiar los antígenos inmunodominantes del VHS-1 durante los ciclos de infección lítica y latente en un modelo *in vitro*, proporcionará más información para identificar posibles blancos terapéuticos o desarrollo de vacunas.

## **CAPITULO III**

### **OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Identificar los antígenos inmunodominantes que se expresen en la infección lítica y en la infección latente del VHS-1 aislados de los pacientes con infección activa

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Obtener y amplificar las partículas virales de VHS-1 de aislados clínicos de pacientes del Hospital Universitario “ Dr. José Eleuterio González”
2. Reproducir el ciclo de infección viral lítico del VHS1 *in vitro* en la línea celular Vero a partir de los aislados clínicos.
3. Reproducir el ciclo de infección viral de latencia *in vitro* por VHS-1 en la línea celular neuronal humana SK-N-SH con cada aislado clínico.
4. Determinar la presencia y función de los Anticuerpos de los Pacientes con Infección Activa del VHS-1
5. Identificar las proteínas inmunodominantes en los modelos de infección lítico y latente por los virus VHS-1 a partir de aislados clínicos

## **CAPITULO IV**

### **METODOLOGIA**

#### **4.1 Obtención de muestras**

Los pacientes incluidos en el estudio fueron atendidos en la consulta del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” con sospecha de diagnóstico de la infección por VHS-1 en el periodo de diciembre de 2009 a diciembre de 2010, donde se les invitó a participar en el proyecto registrado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina con la clave IN08-007. Una vez que firmaron la carta de consentimiento-informado (ver anexo), y que cumplieran con los criterios para el estudio (tabla 2), se realizó una asepsia de la lesión con alcohol para posteriormente romper la lesión con un bisturí número 11 y realizar un raspado de la lesión empleando un hisopo con fibra de alicate estéril (Fisherbrand Calcium Alginate Swabs, 14-959-77). El hisopo fue colocado en un criovial con solución PBS-Glucosa al 1% a 4°C. Por otra parte, se obtuvo una muestra de sangre periférica por medio de una punción venosa para la separación de suero. Tanto el exudado viral en el criovial y el tubo de sangre fueron etiquetados y transportados en frío al Laboratorio de Inmunovirología del Servicio de Inmunología, donde se almacenó el criovial a -80°C y las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos, posteriormente el

suero fue separado y se realizaron alícuotas del mismo para almacenarlos a -20°C hasta su uso.

Criterios de inclusión:	Mayor de edad con infección clínica activa (vesícula) Firma de la carta de consentimiento informado Cultivo y PCR positivo para VHS -1
Criterios de exclusión:	Que no deseen participar en el estudio Pacientes con infección clínica por VHS-1 en resolución (costra) Pacientes con Varicela Zoster
Criterios de eliminación:	Cultivo negativo

**Tabla 4.** Criterios establecidos para la inclusión, exclusión y eliminación de los pacientes incluidos en el estudio.

#### 4.2 Determinación de IgG e IgM anti VHS-1 por ELISA

Los sueros obtenidos de los pacientes sospechosos para la infección por VHS-1 fueron analizados por la técnica de ELISA para identificar y cuantificar la presencia de anticuerpos (IgG e IgM) por medio del kit de ELISA semi-cuantitativo DiagMex (Diagnostic Automation, Inc.) anti-VHS-1. Se realizaron diluciones de los sueros y de los estándares según las recomendaciones del fabricante, se colocaron en la placa de 98 pozos. Las muestras y estándares fueron incubados a temperatura ambiente por 30 minutos, se realizaron 3 lavados con solución de lavado. El anticuerpo secundario anti IgG o IgM conjugado con peroxidasa fue adicionado e incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron 3 lavados, se agregó el sustrato e



incubó por 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente, la reacción fue detenida adicionando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N y la placa fue leída en un lector de ELISA a 450nm. Los cálculos fueron realizados en base a la fórmula reportada por el fabricante y los valores se expresaron en unidades internacionales por mililitro (U/ml).

### **4.3 Cultivo celular**

Se trabajó con dos líneas celulares: las células Vero (línea celular de riñón de mono verde africano, ATCC CCL-81) donadas por el Dr. Miguel Dector; y la línea celular SK-N-SH (línea celular de neuroblastoma de humano, ATCC HTB-11). Estas líneas celulares fueron empleadas para realizar las infecciones con los aislados de VHS-1. Las células Vero fueron colocadas en frascos de  $25\text{mm}^2$  (T-25) con medio de cultivo DMEM-Advanced (A-DMEM, GIBCO) suplementado (2 mM de glutamina, 100U/ml de penicilina, 0.1mg/ml de estreptomycin (GIBCO) y 2% de suero bovino fetal (SBF, CELLGRO), se dejaron incubando a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad relativa.

Las células SK-N-SH fueron trabajadas de similar manera excepto que el medio fue suplemento con 10% de SBF (57). De ambas líneas celulares se realizó un concentrado celular en alícuotas de 1 ml mantenidas a  $-80^\circ\text{C}$  para su uso, en este estudio se trabajo a partir de los viales congelados y no mayor de P15, para ambas líneas celulares, como se describe a continuación.

Los pasajes de las células se realizaron a partir de un cultivo celular en frasco T-25 confluyente (aproximadamente  $3 \times 10^6$  cel.) se realizó un lavado con PBS 1X pH 7.4 (GIBCO) estéril al frasco de cultivo, se decantó y se agregó 1ml de tripsina al 1X (Gibco) atemperada a  $37^\circ\text{C}$  en baño de agua. Posteriormente, se incubó por 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y se agregó el mismo volumen de medio A-DMEM y 2% SBF. Con una pipeta serología estéril se recuperó la suspensión celular y fue colocada en un tubo cónico de 15ml en donde las células fueron disgregadas para obtener una suspensión homogénea. En este punto se puede tomar 0.1ml de la suspensión celular y realizar el pasaje a un frasco de cultivo. Para cuantificar y estandarizar la cantidad de células, el tubo cónico se centrifugó a 1000 RPM por 5 min; se decantó y resuspendió en 1ml de medio, se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  más 10  $\mu\text{l}$  de azul tripano y 60  $\mu\text{L}$  de A-DMEM en un micro tubo, la mezcla fue homogenizada y se tomó 10  $\mu\text{L}$  de esta suspensión para realizar el conteo de células en un hematocitómetro calculándose el número de células [No. de células por ml = (promedio de células) (Factor de dilución [8]) (10,000)]. De acuerdo al conteo de células se realizaron los cálculos y el pasaje, incubando a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ .

Se prepararon stock de las líneas celulares para nuestros modelos de infección. Primero, las células fueron amplificadas en frascos de 175  $\text{mm}^2$  (T-175), las células ya confluentes fueron cosechadas y se resuspendieron en medio A-DMEM con 5% de DMSO, fueron ajustadas a  $2 \times 10^6$  cel./ml/criovial. Se etiquetaron adecuadamente y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ . Para el trabajo de infección celular se sacó un vial del congelador, se colocó en un contenedor con hielo, se dejó descongelar durante aproximadamente 30

min. Las células fueron resuspendidas en 3 ml de A-DMEM para colocarlas en un frasco de cultivo T-25mm<sup>2</sup>, se incubó bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas observando periódicamente el crecimiento de la monocapa celular.

#### **4.4 Obtención y aislamiento de las partículas virales a partir de aislados clínicos**

Frascos de cultivo T-25 fueron preparados conteniendo una monocapa de células Vero en 3ml de medio A-DMEM suplementado, se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa hasta alcanzar una confluencia celular del 90%. Se descongelaron los crioviales que contenían las muestras clínicas obtenidas de los pacientes con sospecha de VHS-1; se agitaron y se tomaron 0.3ml de la solución con pipeta serológica de 1ml desechable estéril y se agregó al frasco T-25 con las células Vero confluentes. Los frascos fueron colocados en agitación a 60 rpm a 37°C durante 1 hora para facilitar la adsorción de las partículas virales a las células, transcurrido el tiempo, los frascos de cultivo fueron incubados como se mencionó anteriormente. El efecto de citopatogenicidad (ECP) de las células inducida por la infección viral se evaluó diariamente para identificar la replicación del virus, cuando se observó un cambio en la morfología celular y daño citopático igual o mayor del 80-90%, se recuperaron las células y se transfirieron a un tubo estéril en hielo y se realizaron alícuotas de 1 ml para finalmente almacenarlas a -80°C.

#### **4.5 Obtención del concentrado viral (stock viral)**

A partir de un frasco T-25 se realizaron pasajes para tener un frasco de cultivo T-175 con células Vero confluentes. Listas las células, se descongelaron las muestras que dieron positivo en el primer cultivo viral identificándose como P1 y fueron infectadas las células Vero colocándolas 1h a 60rpm a 37°C y posteriormente se incubó hasta observar daño citopático aproximadamente al 90%. Se realizaron alícuotas homogeneizadas de 0.6ml para cada uno de los aislados clínicos. También se trabajó bajo las mismas condiciones que los virus de los aislados clínicos el virus VHS-1 cepa KOS (ATCC VR-1493) como virus de referencia.

#### **4.6 Cuantificación de las partículas virales por titulación viral**

La titulación viral fue determinada mediante la técnica de formación de placas líticas. En condiciones de esterilidad se realizaron diluciones seriadas logarítmicas base 10 en una solución de PBS-glucosado 0.1% de un vial del stock viral que fue obtenido de cada uno de los virus aislados y la cepa de referencia respectivamente. Se homogeneizaron y 1ml fue transferido con pipeta serológica estéril a una placa de cultivo de 6 pozos con células Vero (aproximadamente  $5 \times 10^5$  cel./ml/pozo), las cuales conteniendo el virus fueron colocadas a 60rpm a 37°C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se desechó la solución viral y se adicionó 3 ml de A-DMEM suplementado y con inmunoglobulina G (IgG) al 0.32%, las placas fueron incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por cuatro días. Finalizada la incubación, se realizó una tinción con Giemsa como sigue: primero se desechó el medio, se adicionó metanol por 5 minutos para fijar las células,

posteriormente fue decantado y se agregó Giemsa por 10 minutos; la placa se lavo con agua, se dejo secar. Se contaron las zonas líticas, es decir, donde hubo infección por parte del virus causando la lisis de la célula, determinando las unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml) para cada una de las muestras. Se ajusto la concentración viral a 50 UFP/ml para los ensayos de susceptibilidad a aciclovir (ACV).

#### **4.7 Ensayos de susceptibilidad al aciclovir (ACV)**

La determinación de la susceptibilidad a ACV se realizó mediante la técnica de reducción de placas líticas. Células Vero ( $3 \times 10^5$  cel./ml/pozo) fueron incubadas por 24 horas en placas de 12 pozos, para después infectar con una suspensión viral de cada uno de los aislados clínicos y de referencia conteniendo partículas de VHS-1 a una concentración de 50 UFP/0.5ml los cuales fueron agregados con pipeta serológica de 1ml desechable estéril a 11 pozos, dejando el pozo 12 como control negativo. Las placas fueron colocadas en agitación a 60rpm a 37°C durante 1 hora. A partir del ACV obtenido de la casa comercial (Zovirax® I.V.) fue preparada una solución stock estéril de 1mg/ml en medio A-DMEM con Ig al 0.32% y DMSO al 1%. A partir de esta solución de ACV se realizaron diez diluciones seriadas 1:2 obteniendo las siguientes concentraciones: 6,25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39, 0.195, 0.097, 0.048, 0.024 y 0.012, mg/ml. Transcurrido el tiempo de infección se desecho la suspensión viral y se agregaran 1 ml de cada una de las soluciones de concentración de ACV a cada pozo, dejando el pozo 11 que se le adicionó simplemente A-DMEM con Ig al 0.32%, DMSO al 1% quedando como control positivo de infección. Las placas fueron incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 4 días, se realizó la tinción con Giemsa como se describió

anteriormente (los ensayos se realizaron por duplicado) y se determinó la concentración inhibitoria al 50% (IC<sub>50</sub>) para cada muestra. (58,59).

#### **4.8 Obtención de antígenos virales en una infección lítica por VHS-1**

Como modelo de infección lítica se trabajo con las células Vero. En frascos T-25 se colocaron las células necesarias en base a: 1) los títulos de los stocks virales de cada aislado que fueron determinados, y 2) la condición de infección, que fue con una Multiplicidad de Infección (MOI) de 5. Estos ensayos fueron realizados por duplicado, además se trabajo con la cepa VHS-1 KOS como cepa viral de referencia y un control negativo (sin infección viral (MOCK)). Las células fueron infectadas como fue descrito anteriormente y transcurrido el tiempo en el que se deja adsorber a la partícula viral (1hr a 60rpm), se adicionó solamente A-DMEM suplementado y se incubo a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y se muestreo a las 7 horas post-infección, se decanto el medio, las células fueron lavadas una vez con PBS y se cosecharon mediante una espátula (scraper, Corning), la suspensión de células infectadas fue transferida a un microtubo y fue centrifugada a 1000 rpm durante 3 min. El sobrenadante fue descartado y el paquete celular fue resuspendido en 0.075ml de solución de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, NaCl 150 mM, 5 mM EDTA, 0.4% Tritón X-100). Las células fueron congeladas y posteriormente colocadas en hielo por 20 min(56). Se les agregó 0.075 ml de coctel de inhibidores de proteasas (Abcam) y finalmente la concentración de las proteínas intracelulares virales (ICP) obtenidas fue determinada por el método de Bradford.

#### **4.9 Determinación de antígenos intracelulares de VHS-1 por inmunofluorescencia**

Las células SK-N-SH de neuroblastoma son permisibles a la infección por el VHS-1 por lo tanto no se observan cambios morfológicos, para evidenciar la presencia del virus en estas células se realizó el análisis de inmunofluorescencia. A partir de un cultivo celular SK-N-SH en un frasco T-25 se realizó un pasaje a una laminilla de cultivo con 8 pozos (NUNC) a una concentración de  $7 \times 10^3$  células con medio A-DMEM y 10% de SBF, se incubaron por 24h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron infectadas con VHS-1 KOS a una concentración de 100 UFP/0.05ml por pozo; se dejaron en condiciones de adsorción, transcurrido el tiempo se agregó medio fresco e incubó el cultivo por 7h. El medio de cultivo fue retirado y se realizó un lavado con PBS, las células fueron fijadas con metanol frío al 100% (-20°C) durante 10 minutos. El metanol se descartó y se adicionó 0.1ml de solución permeable (0.2% TritónX-100 en PBS) por 2 minutos, se realizó un lavado y se agregó ASB 2% como solución bloqueadora por 2 minutos. La prueba y la detección de antígenos virales se realizó empleando como primer anticuerpo los sueros de los pacientes positivos para VHS-1 trabajando con la dilución de 1:80. La muestra (0.1 ml) fue adicionada y se incubó la laminilla por 1h en cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron de 3 a 5 lavados con PBS y se agregó el anticuerpo secundario anti humano conjugado con FITC (Abcam) a una dilución de 1:10,000; se incubó por 30 minutos bajo las mismas condiciones antes mencionada. Nuevamente, se realizaron de 3 a 5 lavados y finalmente se agregó una gota de solución de montaje, se colocó el cubreobjetos y se observó en microscopio de fluorescencia (LEICA DM1000). Como control positivo de la técnica se

usaron anticuerpos positivos para la prueba de Anticuerpos Antinucleares (ANA) con patrón homogéneo. También a cada suero de paciente se le realizaron la prueba de ANA para descartar fluorescencia por alguna enfermedad autoinmune.

#### **4.10 Obtención de antígenos virales en una infección latente por VHS-1**

El modelo de infección latente se desarrolló en la línea célula SK-N-SH (células derivadas de un neuroblastoma humano). Las condiciones de infecciones con los diferentes virus VHS-1 fueron las mismas empleadas en el modelo de infección lítica, descrito en el punto 5.8.

#### **4.11 Determinación de anticuerpos neutralizantes contra VHS-1 por Microneutralización en Placa (MNP).**

Los anticuerpos neutralizantes fueron evaluados a partir de los sueros de los pacientes con la infección activa de herpes. Los sueros se dividieron en alícuotas de 0.050 ml e inactivados a 56°C por 30 minutos. Una vez inactivados, se realizaron diluciones seriadas de cada suero partiendo de 1:10 (90µl de PBS/gluc. más 10µl de suero) y se trabajo hasta una dilución de 1:1280. Por otra parte, se descongeló un vial de VHS-1 KOS y una suspensión viral fue preparada a una concentración de 100PFU/0.05mL. La suspensión viral se mezcló con cada una de las diluciones del suero e incubaron a 37°C por 1h a 50rpm.



En una placa de 96 pozos se colocaron 15,000 células Vero por pozo e incubaron durante 24h; después de la incubación se transfirieron 100 µl de la mezcla de los virus/sueros a cada pozo e incubó 1h más a 37°C y 50 rpm. Una vez transcurrido el tiempo, se retiro la suspensión viral y medio fresco suplementado fue adicionado e incubó nuevamente a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 48h. Finalmente, el medio de cultivo fue descartado, las células fueron fijadas con metanol y la tinción de Giemsa fue realizada. Se registro como titulo de neutralización la dilución del suero al cual ya no se observo la formación de placas líticas en el invertoscopio (Ziess Axiovert 40 CFL).

#### **4.12 Inmunoreconocimiento de las ICP en los modelos de infección lítico y latente por sueros de pacientes positivos para VHS-1**

La determinación de las ICP obtenidas de las infecciones por VHS-1 en los modelos líticos y latentes se realizó mediante electroforesis de una dimensión en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y posteriormente analizadas por Western blot. Las proteínas obtenidas de las infecciones celulares se ajustaron a una concentración de 0.15 mg, empleando como control las proteínas de las células sin infección; se adicionó el buffer de muestra 2X (10% 2-mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.004% azul de bromo fenol, 0.125M Tris-HCl) y se trataron con calentamiento a ebullición por 1 min. Las muestras individualmente fueron cargadas en un carril de una dimensión de 66mm de largo; se empleo un marcador de peso molecular pre-teñido con un rango de 10 a 260 kDa (Thermo). La electroforesis se llevo a cabo en buffer de corrida (25 mM Tris-base, 190 mM glicina, 0.1% SDS) a 80V

por un tiempo aproximado de 3h (se realizaron previamente geles de 9 carriles y se tiñeron con Comassie para observar las bandas de proteínas). Una vez finalizado el corrimiento, los geles fueron colocados en buffer de transferencia (25mM tris-base, 190mM glicina, 20% metanol, pH 8.3) durante 30 min.

Membranas de PVDF (GE Healthcare) fueron colocadas en metanol por 5 min, luego en agua destilada por 2 min y finalmente en buffer de transferencia frío por 5 min. Una vez listo el gel y la membrana se realizó el montaje de las mismas para la electrotransferencia. En el casete de electrotransferencia se colocó una esponja y sobre ella papel filtro (2 o 3 piezas) humedecido con buffer de transferencia, luego la membrana de PVDF activada, el gel, de nuevo papel filtro (2 o 3 piezas) humedecido con buffer de transferencia y otra esponja. Al colocar el casete dentro de la cámara la membrana fue colocada en dirección del polo positivo y el gel del polo negativo. Se corrió la electrotransferencia en húmedo a 100V durante 1 h en cuarto frío. Transcurrido el tiempo se recuperó la membrana y fue transferida a un contenedor con solución bloqueadora (leche descremada 5% en PBS 1X) y se incubó por 1 h en agitación. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS 1X y la membrana fue cortada en tiras de 4mm de ancho y se almacenaron a -20°C hasta su uso. (23,25).

A partir de las tiras de las muestras de ICP contenidas en las membranas de PVDF se realizaron 2 lavados con la solución de lavado (PBS 1X, Tween 20 1:1000). Los sueros de los pacientes fueron diluidos 1:50 en leche descremada al 3% en PBS 1X

y se incubaron con las membranas a temperatura ambiente en agitación por 2h. Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno y el anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (Abcam) fue adicionado a una dilución de 1:10,000, nuevamente se incubó a temperatura ambiente en agitación por 1h, se realizaron 3 lavados como se mencionó anteriormente y finalmente fueron revelados TMB de membrana (Sigma). Las bandas positivas reconocidas fueron determinadas y su peso molecular (PM) fue calculado de acuerdo a su RF (relación de frente).

#### **4.13 Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos fueron analizados empleando una prueba de t de student para el análisis de Elisa con el programa GraphPad Prism 5.

## **CAPITULO V**

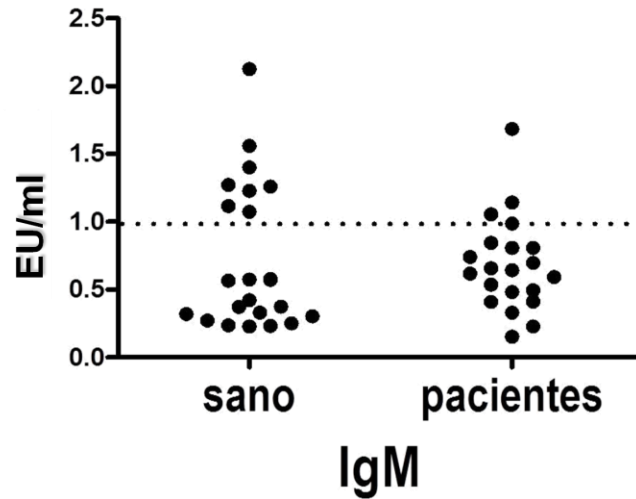
### **RESULTADOS**

#### **5.1 Pacientes con infección herpética de VHS-1 activa.**

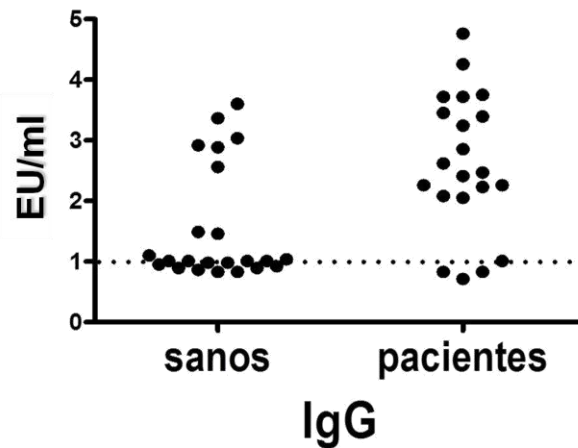
Durante un periodo de un año que abarco de noviembre del 2009 a noviembre del 2010 participaron 50 personas que llegaron con lesiones de tipo ulcerosas en la zona orofacial a la consulta de dermatología del Hospital Universitario “José Eleuterio González”. Las características de los pacientes se encuentran descritas en la tabla 3. Se determinó la presencia de anticuerpos IgM e IgG anti-VHS-1 por el método de ELISA. Solo 24 de los pacientes con infección viral activa, se diagnosticaron con VHS-1, los demás fueron diagnosticados con otro tipo de infección (VHS-2 o varicela zoster).

Se lograron recolectar un total de 24 sueros, 4 sueros fueron descartados porque no se obtuvieron con la calidad necesaria para la realización de la prueba por lo que solo se trabajaron con 20 sueros de pacientes. Además, se emplearon 23 sueros como controles negativos de personas que no presentaban la infección clínicamente. El 14.3% de los pacientes presentaron anticuerpos IgM anti VHS-1, mientras el 85.7% de los pacientes presentaron anticuerpos IgG anti-VHS-1. El grupo control mostro que el 61% de los sueros fueron positivos para IgG. Figura 8.

A)



B)

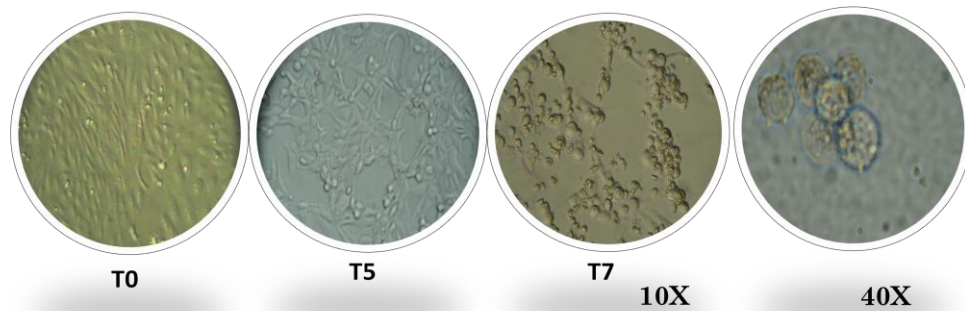


**Figura 7.** Anticuerpos IgM e IgG anti-VHS-1 presentes en los sueros de los pacientes con infección herpética activa que fueron determinados por ELISA. A) Determinación de anticuerpos IgM Anti-VHS-1, se muestra que la mayoría de los pacientes tenían bajos niveles de este anticuerpo. B) Determinación de anticuerpos IgG anti-VHS-1, se muestra la presencia de esta inmunoglobulina en la mayoría de los pacientes. Los valores están expresados en Unidades Internacionales por ml. Se realizó una prueba de t de student para determinar la significancia entre los grupos.\*  $P = 0.0127$ .

## 5.2 Obtención, amplificación y aislamiento de las partículas virales a partir de muestras clínicas

Se realizaron los cultivos empleando las 24 muestras tomadas de las cuales solo diez aislados clínicos fueron amplificados en cultivo celular, tomándose como muestras positivas. Cabe mencionar que las muestras positivas además de cumplir con los criterios clínicos se les realizaron un ensayo aparte el cual fue una PCR para la amplificación del gen *tk* como parte de la confirmación molecular dando positivas las muestras (datos no mostrados)

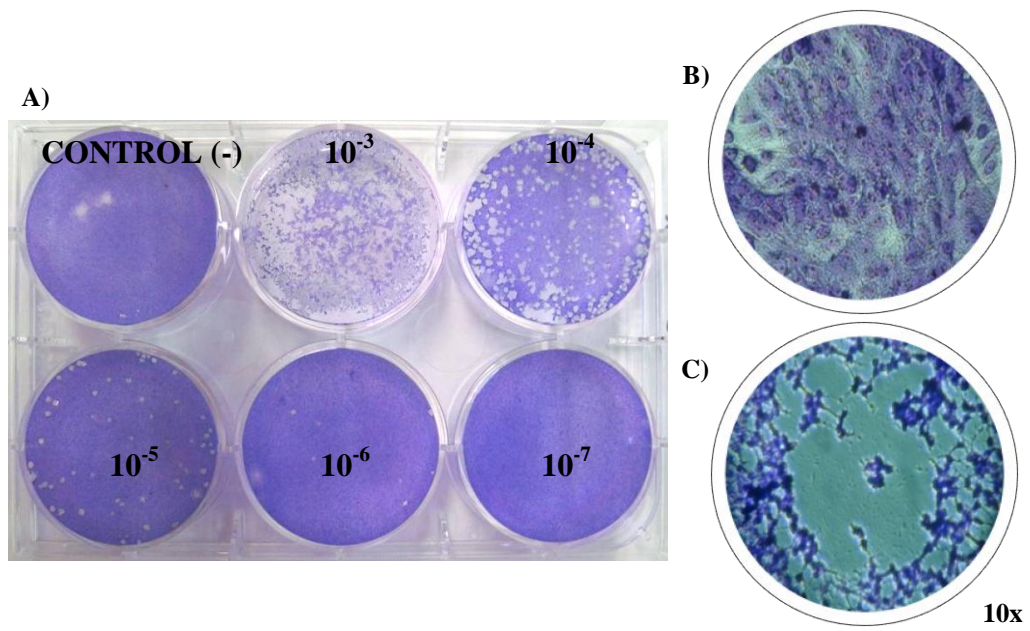
Se realizaron 2 ciclos de infección donde se obtuvo en promedio 37 crioviales como stock viral para cada uno de los 10 aislados y la cepa de referencia VHS-1 KOS como cepa control y estos se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En la figura 1, se muestra el desarrollo del daño citopático por la replicación de la partícula viral, manifestándose en cambios morfológicos. Las infecciones fueron realizadas en células Vero, las cuales tienen una morfología epitelial y se adhieren a la base del frasco de cultivo. Entre los días 5-8 post-infección (p.i) se empezaron a manifestar los cambios morfológicos, de una célula alargada a una célula redondeada, a mayor tiempo de infección se observaron más células con estas características, además, las células perdieron su capacidad de adherencia. Posteriormente, las células presentaron más daño que finalizó en la lisis celular.



**Figura 8.** Efecto citopático de las células Vero durante la amplificación de los aislados clínicos por la infección por VHS-1. A) al tiempo cero de infección. B) a los 5 días p.i., C) 7 días p.i., D) a los 7 días p.i., a 40X de magnificación.

### 5.3 Cuantificación de las partículas virales

La cuantificación de las partículas virales se realizó por la técnica de formación de placas líticas. A partir de los stocks virales de cada uno de los aislados y de la cepa VHS-1 KOS se determinó la concentración de las partículas virales obtenidas. En la figura 2, se muestra una placa de 6 pozos donde fue observada claramente el efecto de lisis celular causado por la infección del VHS-1. A diluciones menores se observa una lisis total de las células, a mayor dilución se definieron la zonas de infección, hubo lisis celular y esta se determinó como unidades formadoras de placa (UFP). En la misma figura, se muestra a detalle las placas líticas indicando la infección viral.



**Figura 9.** Titulación viral a partir de un concentrado viral por UFP y teñidos con Giemsa. A) formación de placas en diferentes diluciones del virus para determinar la concentración viral en UFP/ml. B) células Vero teñidas sin infección, C) la presencia de una placa lítica a 10X de magnificación.

Se realizó el conteo para cada aislado y la cepa VHS-1 KOS, los valores obtenidos se determinaron en un rango de dilución de  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ . Los resultados de la cuantificación de las partículas virales se muestran en la tabla 4.

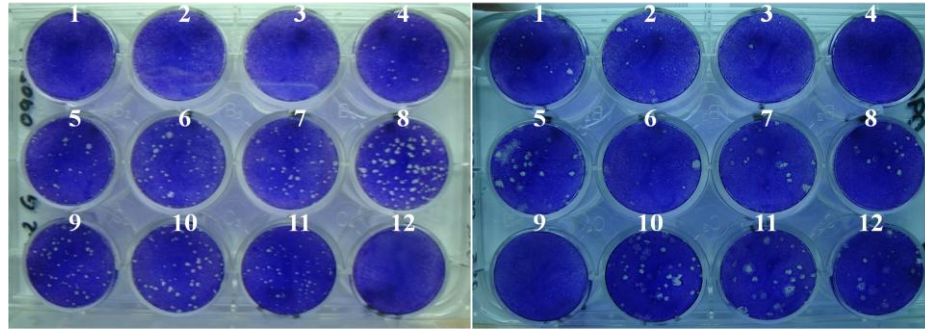


No. MUESTRAS	AISLADO CLÍNICO	TÍTULO (UFP/ml)
1	#01	3X10 <sup>5</sup>
2	#09	8x10 <sup>6</sup>
3	#13	4.3X10 <sup>5</sup>
4	#17	5X10 <sup>6</sup>
5	#18	7.2X10 <sup>5</sup>
6	#26	7.2X10 <sup>5</sup>
7	#27	7X10 <sup>6</sup>
8	#28	7 X 10 <sup>5</sup>
9	#42	3 x 10 <sup>6</sup>
10	#39	1.1X10 <sup>6</sup>
11	KOS	4.5 x 10 <sup>6</sup>

**Tabla 5.** Títulos virales obtenidos para cada uno de los aislados clínicos y la cepa viral VHS-1 KOS.

#### 5.4 Ensayos de susceptibilidad al aciclovir (ACV)

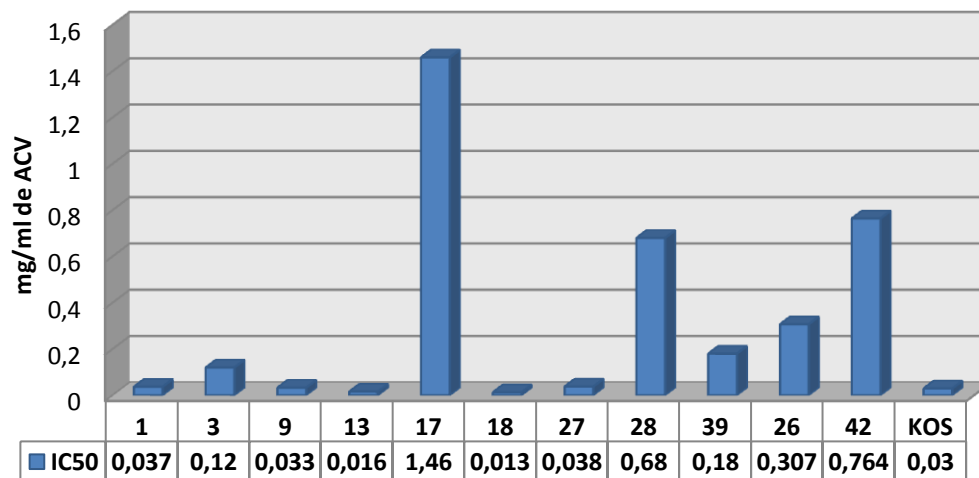
El ensayo de susceptibilidad al ACV fue realizado para determinar esta actividad biológica en los aislados virales. Se trabajaron con 10 concentraciones diferentes del ACV. Por medio de la técnica de reducción de placas, se contaron las placas líticas, se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC50) por el método de Reed y Muench. En la figura 3, se muestra el desarrollo de las placas de infección y la cantidad de estas fueron disminuyendo conforme la concentración del medicamento aumentaba.



**Figura 10.** Resultados del análisis de reducción de UFP del aislado #42 y cepa KOS de VHS-1 respectivamente por la presencia de la concentración decreciente de ACV.

Las cepas virales del VHS-1 fueron clasificadas como cepas resistente al ACV solamente aquellas cuyo valor de  $IC_{50}$  se encontrará igual o mayor a 3.0 mg/ml, en el caso de los virus aisladas todas las cepas de VHS-1 incluyendo la de referencia mostraron ser susceptibles al ACV obteniéndose un promedio en la concentración de ACV de 0.3 mg/ml, 10 veces menor del  $IC_{50}$  para ser consideradas como resistentes. En el caso del aislado #17 se determinó una  $IC_{50}$  de 1.5 mg/ml, la cual fue la mayor concentración que se encontró, sin embargo es una cepa no resistente al ACV. Los datos obtenidos para cada muestra se encuentran en la figura 4.

## IC<sub>50</sub> de ACV

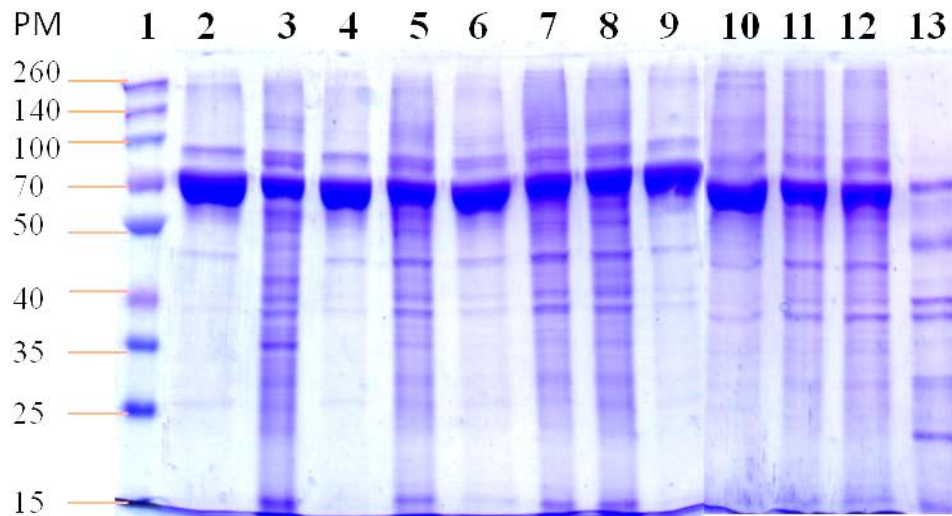


**Figura 11.** Concentraciones de IC<sub>50</sub> en mg/ml obtenidas para cada uno de los VHS-1 de los aislados clínicos y la cepa KOS.

### 5.5 Patrón de ICP en la infección lítica in vitro por VHS-1

Se realizaron las infecciones en células Vero con los diferentes VHS-1 aislados y KOS a una MOI de 5 por 7 horas. Las células infectadas se lisaron en un volumen final de 0.15ml para evitar una mayor dilución de las proteínas. La cuantificación de las proteínas fue realizada por el método de Bradford encontrando una concentración promedio de 2.81mg/ml. Para corroborar la infección además de las observaciones morfológicas se realizaron geles SDS-PAGE al 10%. Se observó claramente un cambio en el patrón de expresión de proteínas en los carriles del 2 al 12 que corresponden a las proteínas extraídas de las infecciones con los virus de los aislados clínicos, este cambio de hace evidente por el control negativo donde solo están las proteínas celulares en el carril 13. De los cambios más notorios como se puede observar en la figura 5 corresponde a las proteínas de alto peso molecular, en esta región caen la mayoría de las glicoproteínas virales presentes en la membrana viral por ejemplo gA, gB y gC cuyo

peso moleculares oscilan entre los 120,000 a 130,000 Daltons (Da). Así mismo, las proteínas ICP4, ICP8 e ICP9 se encuentran entre los pesos moleculares de 175,000, 132,000 y 125,000 Da, respectivamente. También están presentes proteínas de bajo peso molecular entre ellas se encuentran las proteínas UL14 y VP22 que corresponden a un peso molecular de 34,000 y 38,000 Da, respectivamente.

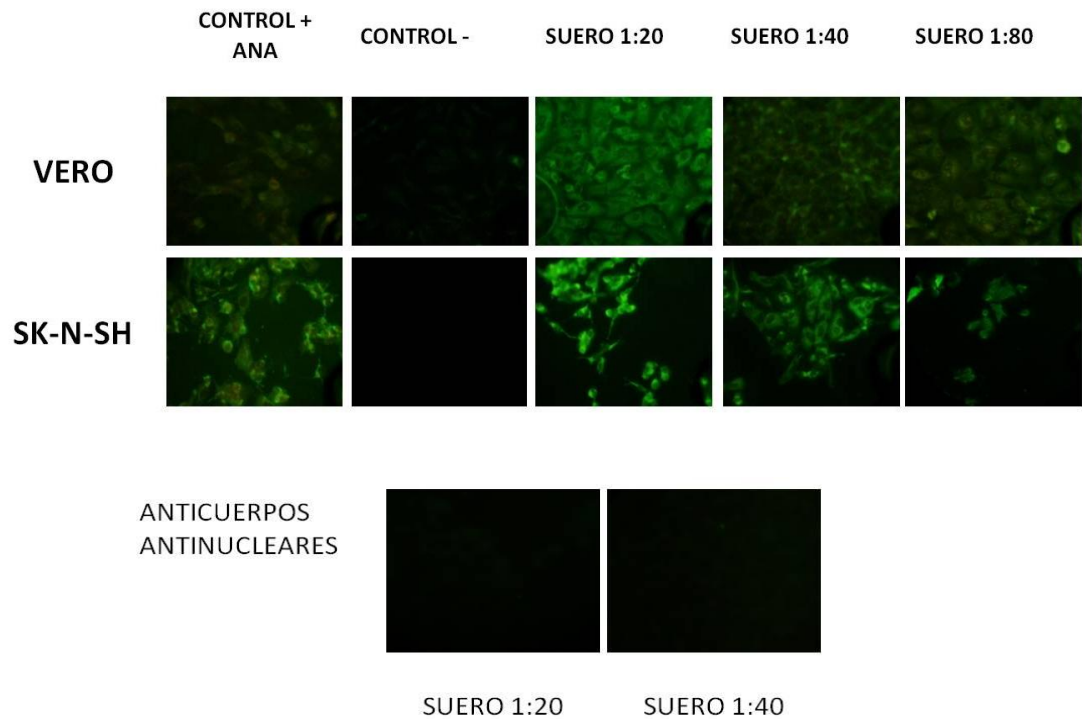


**Figura 12.** Patrón de ICP en un Gel SDS-PAGE al 10%. Carril 1: marcador de peso molecular en kilodalton; carril 2: cepa VHS-1 KOS; carriles 3-12 diferentes aislados clínicos (#1, #9, #13, #17, #18, #26, #27, #28, #39 y #42, respectivamente); y carril 13 control negativo (células Vero sin infección).

## 5.6 Patrón de ICP en la infección latente in vitro por VHS-1

Debido a la naturaleza de la infección de VHS-1 en células neuronales, la línea celular SK-N-SH no manifiesta daño citopático por la infección viral por VHS-1, en el presente trabajo infectamos las células neuronales y para evidenciar tal infección se realizó una prueba de inmunofluorescencia (IF) para determinar el establecimiento de la misma en la línea celular empleada.

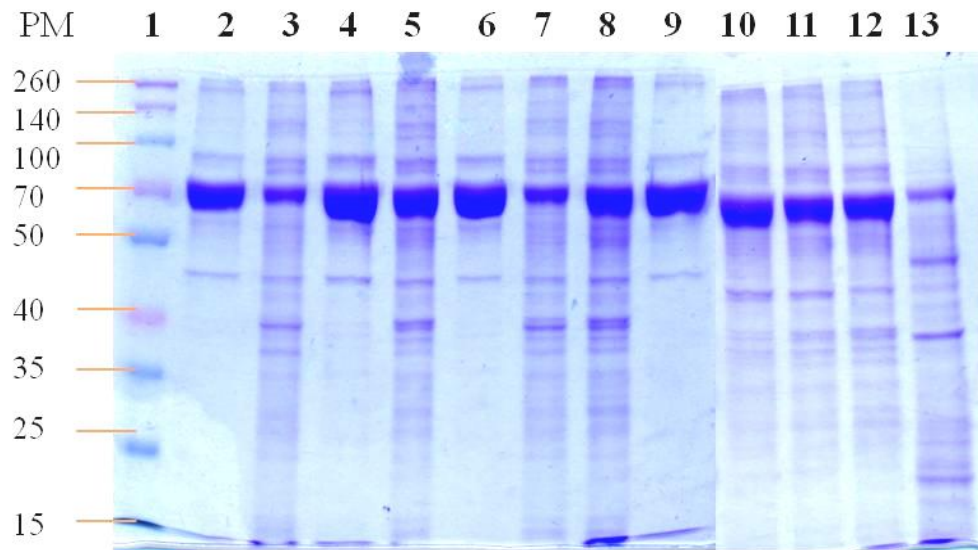
La prueba se realizó sobre las células SK-N-SH que fueron de nuestro particular interés debido a que estas células son permisivas a la infección por el VHS-1 y como control de infección se trabajaron con las células Vero, las cuales se infectaron con VHS-1 KOS dejando el mismo tiempo de infección para la obtención de las ICP para evitar cambios en la expresión de proteínas ni acumulación o baja concentración de estas. Como controles fue empleado un control positivo de la técnica el cual fue de anticuerpos antinucleares (ANA), como control negativo se emplearon células sin infección y se trabajaron con 3 diluciones de los sueros de los pacientes (1:20, 1:40, 1:80), cabe recalcar que a los sueros de los pacientes también se les realizó la determinación de ANA para descartar que la señal observada fuera correspondiente a alguna enfermedad autoinmune. Los resultados obtenidos se puede observar en la figura 6, las células Vero mostraron fluorescencia como se esperaba y que nos sirvió de referencia, al igual que las células Vero, las células SK-N-SH mostraron fluorescencia evidenciando la infección viral, la fluorescencia en las células neuronales fue visualizada mejor a una dilución de 1:80 de los sueros de los pacientes.



**Figura 13.** Ensayo de IF en células Vero permisivas a la infección por VHS-1 y células de neuroblastoma (SK-N-SH) no permisivas para la infección viral donde se muestra señal derivada de la presencia del virus en las células.

Con los resultados anteriormente obtenidos se realizaron las infecciones correspondientes con todos los aislados en la línea celular neuronal para la obtención de las ICPs. Se corrió un gel SDS-PAGE al 10% y se observó el patrón de corrimiento de las proteínas. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford y la concentración promedio fue de 1.75mg/ml.

Similar a la infección lítica, en la infección latente, se observó la presencia de proteínas de alto peso molecular correspondiente en parte a las glicoproteínas de membrana, recalcando que estas proteínas fueron observadas a las 7 horas post infección.

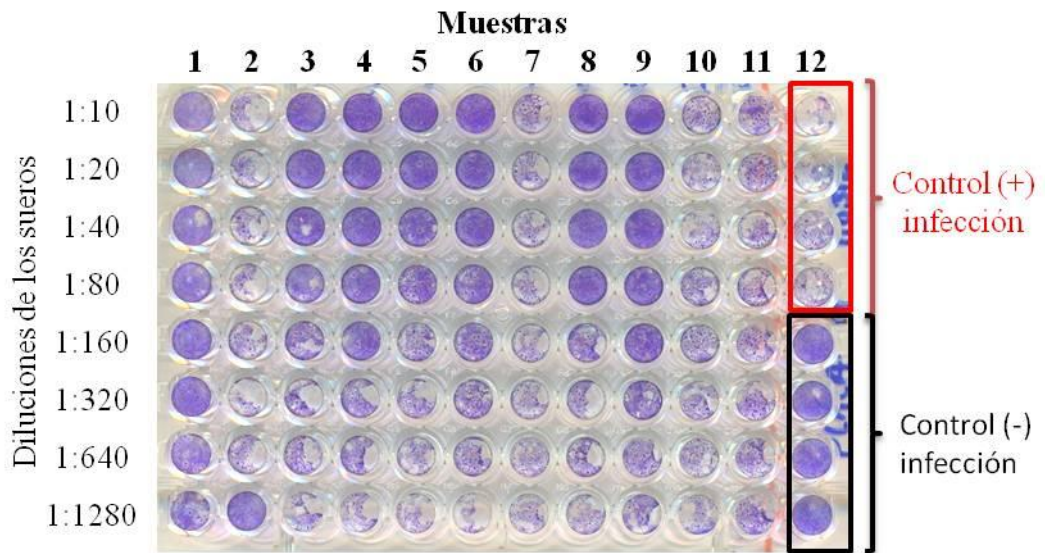


**Figura 14.** Patrón de ICP en la infección latente *in vitro*. Gel de SDS-PAGE al 10%, carril 1: marcador de peso molecular en kilodaltons; carril 2: cepa VHS-1 KOS; carril 3-12: diferentes aislados clínicos (#1, #9, #13, #17, #18, #26, #27, #28, #39 y #42, respectivamente); y carril 13: control negativo (células SK-N-SH sin infección).

### 5.7 Determinación de anticuerpos neutralizantes contra VHS-1 por microneutralización en placa (MNP).

En la determinación de AcN (anticuerpos neutralizantes) fueron analizados los 20 sueros obtenidos de los pacientes y que previamente fueron evaluados por ELISA. En la figura 9, se ve la representación de una placa de cultivo donde se llevo el ensayo de microneutralización en placa con las diluciones que se realizaron para la prueba. Como

se mencionó anteriormente solo 3 sueros (#7, #14 y #15) dieron negativo por este método confirmando los datos obtenidos por ELISA. En los ensayos de MNP fueron 4 sueros los que dieron una dilución neutralizante menor de 1:40, 12 sueros (entre estas muestras se encuentran la de los pacientes que dieron cultivo positivo) mostraron diluciones iguales o mayores a 1:40. En general las muestras presentaron un efecto neutralizante. En la tabla 5, se muestran los valores obtenidos para cada muestra, así como, su comparativo con los resultados de ELISA corroborando los datos entre ellos, es decir, en las muestras que fueron positivo para ELISA tanto IgM e IgG fueron las que presentaron un efecto de neutralización a una mayor dilución, así como también 3 muestras dieron negativo y no se observó efecto de neutralización y finalmente mostraron un cultivo negativo.



**Figura 15.** Placa de cultivo donde se ve el efecto neutralizante y se va perdiendo conforme aumenta la dilución de los sueros. Columna 1 control positivo de neutralización, columna de 2 un suero negativo y de las columnas 3 a 11 sueros de pacientes (#1, #4, #5, #6, #7, #8, #13, #14 y #15 respectivamente). En la columna 12 los controles de la infección.



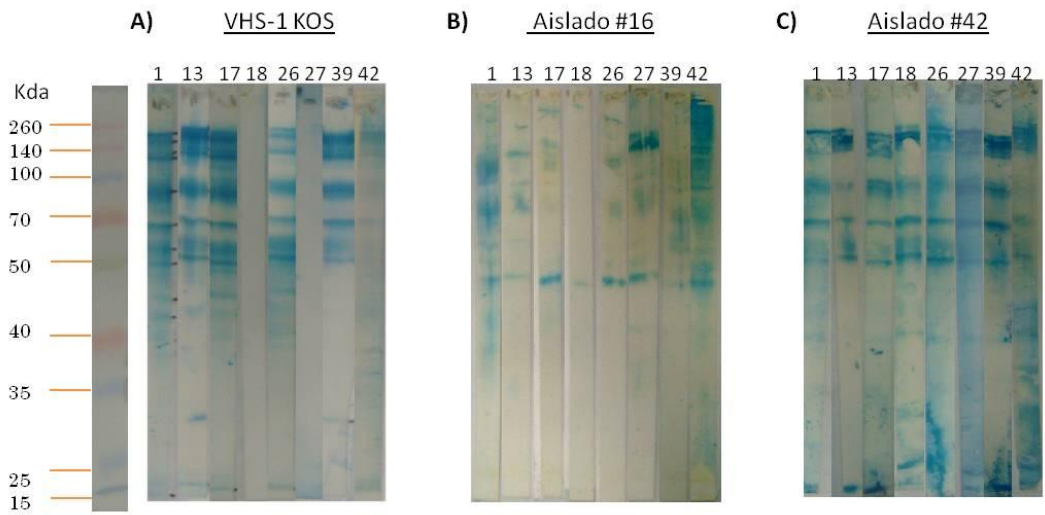
Muestras	MNP	ELISA	
	DILUCIÓN	IgG	IgM
1	1:80	+	-
5	1:10	+	-
6	1:80	+	-
7	Negativo	-	-
8	1:160	+	-
13	1:160	+	-
14	Negativo	-	-
15	Negativo	-	-
17	1:80	+	+
18	1:80	+	+
24	1:40	+	-
25	1:20	+	-
26	1:80	+	-
27	1:80	+	-
29	1:20	+	-
31	1:160	+	+
39	1:160	+	-
40	1:20	+	-
42	1:160	+	+
44	1:160	+	-

**Tabla 6.** Resultados del ensayo de MNP y ELISA para cada uno de los sueros de los pacientes con infección activa por VHS-1.

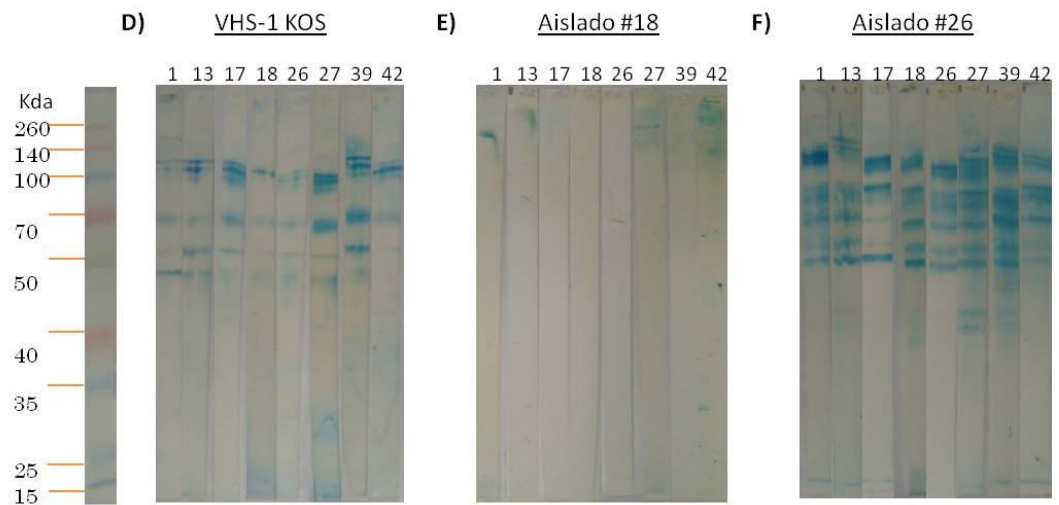
### 5.8 Identificación de antígenos virales en la infección lítica y latente por VHS-1

Una vez ya obtenidos las ICP y determinado la presencia de anticuerpos en los sueros de los pacientes, estos sueros fueron empleados para determinar que ICP son reconocidas durante la infección lítica o latente causada por VHS-1.

## INFECCIÓN LÍTICO

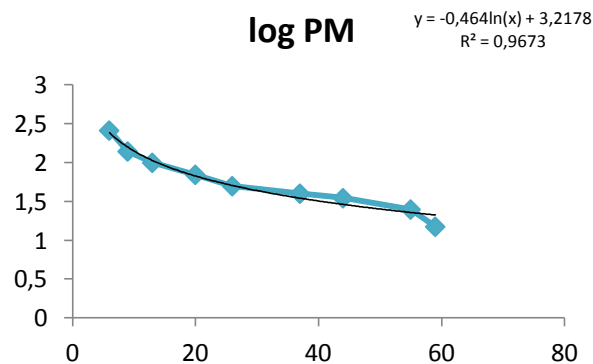


## INFECCIÓN LATENTE



**Figura 16.** Inmunoelctrotransferencia (Western blot) en los dos modelos de infección con la cepa KOS de VHS-1 como referencia y 4 aislados diferentes.

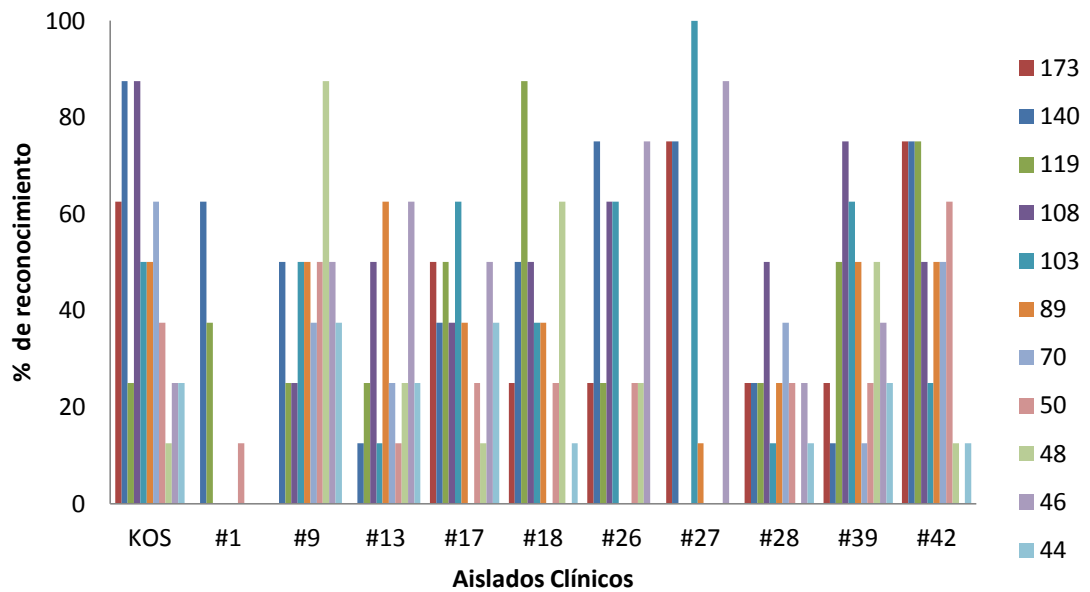
Para la evaluación de las bandas de proteínas reconocidas se calculó el R.F. para cada banda, así como, el de los marcadores de peso molecular pre-teñidos. A partir de estos últimos datos se gráfico el  $\text{Log}_{PM}$  contra la distancia de migración en mm (figura 17) a partir de ahí fue calculado el peso molecular de cada una de las bandas.



**Figura 17.** Curva de calibración de pesos moleculares de las proteínas.

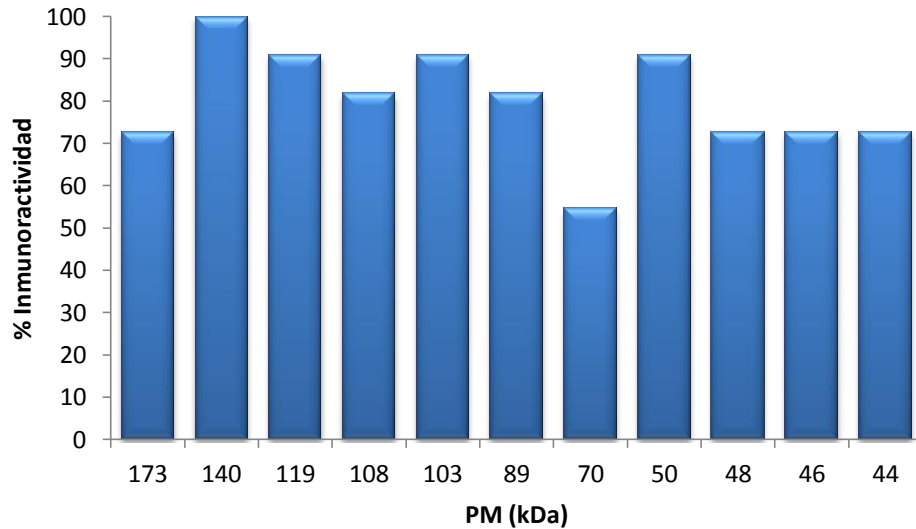
### 5.8.1 Proteínas Inmunodominantes en una infección lítica por VHS-1

Al analizar los Western blot en la infección lítica, 36 proteínas fueron reconocidas tomando en cuenta todos los aislados. Once proteínas correspondientes a los PM de 173, 140, 119, 108, 103, 89, 70, 50, 48, 46 y 44 kDa se encontraron en la mayoría de los sueros analizados. En la figura 12, se muestra una gráfica general para cada proteína y el porcentaje de reconocimiento según el aislado considerando los 8 sueros de los pacientes.



**Figura 18.** Porcentaje de reconocimiento para once proteínas de los 11 VHS-1 aislados de muestras clínicas.

De las 11 proteínas seleccionadas de la infección lítica, solo las proteínas de 140, 119, 103 y 50 kDa fueron reconocidas por el 90% de los sueros analizados como se puede observar en la figura 13. De acuerdo, con el PM de esas proteínas corresponden a la ICP6, ICP0 y a TK o gD del VHS-1. Otra proteína reconocida con un peso aproximado de 173kDa corresponde a la ICP4. Todas estas proteínas son importantes en la primera fase de infección del virus a la célula.

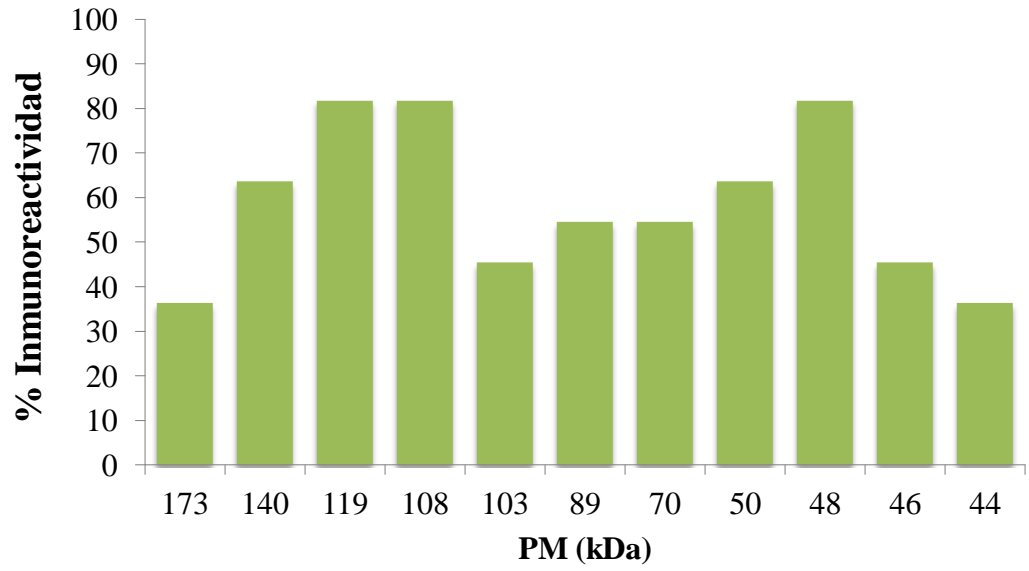


**Figura 19.** Porcentaje de reconocimiento de las 11 proteínas virales expresadas 7h p.i. en el ciclo de infección lítica en células Vero.

### 5.8.2 Proteínas Inmunodominantes en una infección latente por VHS-1

Treinta y tres antígenos fueron reconocidos en la infección latente por los anticuerpos de los pacientes. De estos mismos antígenos, se evaluaron las 11 proteínas previamente seleccionadas en la infección lítica debido a su frecuencia y como se puede observar en la figura 14, las proteínas de 119, 108 y 48 kDa fueron reconocidas por el 80% de los sueros.

Con respecto a las proteínas que estuvieron presentes en ambos tipos de infección, la proteína de 108kDa mostró la misma frecuencia de reconocimiento, sin embargo, la proteína de 39kDa obtuvo un mayor inmunoreconocimiento en la infección latente a pesar de que también estuvo en la infección lítica. La proteína de 55 kDa solo fue reconocida en la infección latente.



**Figura 20.** Porcentaje de frecuencia de reconocimiento de 11 proteínas virales expresadas 7h p.i. en el ciclo de infección latente en células SK-N-SH.

## CAPITULO VI

### DISCUSIÓN

Las infecciones virales, particularmente la infección por el VHS-1 está distribuida en el mundo, es una infección con una alta incidencia y recurrencia, además de que no existen datos epidemiológicos de la infección que causa en zona orofacial. En México, no existen hasta la fecha estudios epidemiológicos masivos para identificar la prevalencia de la infección por virus del género herpes. La forma de estimar su prevalencia de manera indirecta es mediante pruebas serológicas (60) en la determinación de anticuerpos IgG que proporcionan información de que el sujeto ha estado expuesto al patógeno, ha sido reconocido por el organismo y ha generado memoria inmunológica. Se conoce a la fecha que las especies de herpes simplex 1 y 2 son de alta seroprevalencia según lo reportado por varios estudios serológicos (61). En este trabajo nos enfocamos a estudiar los patrones de respuesta inmunológica a la infección *in vitro* por herpes simplex 1 en dos modelos de infección (lítica y latente).

En el presente trabajo se tuvieron 2 tipos de muestras, aquellas de sujetos que no manifestaban características clínicas de la infección por VHS-1 y aquellos que presentaban la lesión herpética activa en la zona orofacial. Se evaluó la presencia de los anticuerpos IgM e IgG. Nuestros resultados mostraron que un 14.3% de los pacientes

fueron positivos para IgM, mientras, el 85.7% fueron positivos para IgG, lo anterior fue asociado con el diagnóstico clínico en el sentido de que los pacientes que dieron positivo en la ELISA presentaban la lesión y el éxito de aislar la partícula viral del herpes *in situ* era mayor. Por otra parte, se observó que el 61% de los sujetos sanos (sin infección activa) fueron positivos para anticuerpos IgG indicando la seroprevalencia del VHS-1 en nuestra región. Nuestros resultados concuerdan con los valores de seroprevalencia reportados por Rezaei-Chaparpordi *et. al.*, donde la seroprevalencia reportada fue del 58.4% en 800 sujetos estudiados (61). En otro estudio, D. Bünzli y cols en Suiza recolectaron muestras de sueros por un periodo de 1992 a 1993, encontrando una seroprevalencia del 80% para VHS-1 en una población adulta en un total de 3,120 muestras analizadas por ELISA (60).

En el desarrollo de las investigaciones con patógenos una parte importante de ellas involucra su aislamiento para realizar estudios *in vitro* en el laboratorio. El virus del herpes simplex tipo 1 y 2 fueron aislado por primera vez a principios de los años 70's donde se realizaron ensayos de infección en modelos celulares *in vitro*. Bowies *et. al.*, realizaron varios aislamientos, de esos solo 3 aislados correspondían al VHS-1 en lesiones orofaciales (56).

En el presente trabajo aislamos el VHS-1 a partir de lesiones en la región oral de 24 pacientes con infección activa y se lograron realizar 10 infecciones de manera efectiva en línea celular Vero para la amplificación de las partículas virales y esta misma



prueba se empleo en el modelo de infección lítico *in vitro*, el cual se discutirá más adelante. Tres de las 24 muestras obtenidas de los pacientes estudiados fueron negativas para la prueba de ELISA, lo anterior se asoció directamente con la ausencia de la capacidad de neutralizar las partículas virales. De igual manera, aquellas muestras con resultados negativos por el método de ELISA fueron negativas en el cultivo viral, sugiriendo que es otro el agente etiológico responsable de la lesión en los pacientes estudiados. Finalmente, once muestras fueron negativas en el cultivo a pesar de presentar una lesión clínica característica que sugiere la presencia del virus además de una serología positiva, esto puede deberse a varios factores, pueden ser de tipo biológico en el cual la concentración de virus presente en la lesión pudiera no ser suficiente para su amplificación *in vitro*, así como, la forma de transportación al lugar donde se inician los estudios, ya que el trabajar con partículas virales activas es muy delicado por ser un parásito intracelular estricto.

Una de las posibles causas de la recurrencia de la infección por el VHS-1 es la resistencia al tratamiento que puede llegar a generar el virus como parte de los factores de virulencia. Dentro de los ensayos que se realizaron fue determinar la  $IC_{50}$  de nuestros aislados clínicos, considerando cepas susceptibles a ACV aquellas encontradas con una  $IC_{50}$  menor de 3mg/ml, medicamento que es el estándar de oro para el tratamiento de las infecciones herpéticas. También consideremos que no hay actualmente publicaciones o reportes de resistencia al tratamiento en nuestro país. La información sobre cepas resistentes a ACV circulantes en las muestras incluídas en el presente estudio hubiese sido de utilidad para cualquier contingencia que se hubiera presentado durante el

desarrollo del trabajo, además de apoyo para la selección de otras alternativas terapéuticas.

De los 10 aislados clínicos de VHS-1 analizados para determinar su susceptibilidad a ACV, el 100% de las muestras fueron sensibles al anti-viral. La resistencia ha sido reportada en varias poblaciones a nivel mundial, sin embargo, en nuestra muestra la resistencia no fue encontrada esto puede deberse al tamaño de la “n” analizada. El grupo de M. Freire realizó un trabajo de susceptibilidad en pacientes que estaban bajo inmunosupresión por medicamentos ya que estos pacientes fueron sometidos a un trasplante; de las 26 muestras estudiadas que presentaban infección por el VHS-1 solo un aislado mostró resistencia correspondiendo al 3.8%. Ellos mismos reportan que aproximadamente hay un 5% de resistencia por el VHS-1 al ACV según estadísticas publicadas por otros autores (58,59). Losada et. al., trabajaron con 2 grupos de pacientes, uno con infección por herpes (n=19) y el segundo con herpes e inmunosuprimidos por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH, n=63) reportaron de manera general que el primer grupo mostró un 100% de sensibilidad al ACV y el segundo grupo un 96.9% de sensibilidad (46). Finalmente, en la India fue reportada una sensibilidad del 97% de 66 muestras (62). Todo esto indica que la resistencia del VHS-1 al ACV se presenta alrededor a nivel mundial del 5%, por lo tanto, este medicamento continúa siendo una buena referencia de tratamiento incluso en los pacientes bajo inmunosupresión causada por medicamentos o infección. Sin embargo el monitoreo de los casos resistentes debe continuar para modificar esquema de terapia.

Otro de los factores que influyen para que llegue a establecerse y desarrollarse de manera exitosa la infección es la respuesta inmune del hospedero. En la respuesta inmune innata contra virus se caracteriza por la participación de las células NK y la producción de interferones de tipo 1. Al desarrollarse una respuesta inmune adquirida, en esta participan los linfocitos T CD8+ y los anticuerpos. Los anticuerpos tienen funciones de neutralización, bloqueando la unión del virus a la célula del hospedero (32). La existencia de anticuerpos anti-VHS-1 no nos indica si estos tienen función neutralizante, por lo tanto, esta fue evaluada por la técnica de MNP. De los 20 sueros de los pacientes analizados el 15% fueron negativos para la prueba de MNP, los cuales fueron negativos también por el método de ELISA, a pesar de que el paciente mostraba una lesión no se encontró evidencia de una respuesta inmune humoral adquirida. Nosotros realizamos un ajuste en el punto de corte del título de anticuerpos para determinar la positividad por MNP ( $\geq 1:40$ ) con la finalidad de descartar algún efecto de reacción cruzada, al cambiar lo anterior, bajo este criterio el 65% de las muestras de los pacientes presentaron anticuerpos neutralizantes contra el VHS-1. En un estudio realizado por Eberle y Courtney con sueros de pacientes VHS-1 y otros con VHS-2, encontraron que la mayoría de ellos presentaron anticuerpos neutralizantes tomando como positivos aquellos con un título de 10, pero una muestra catalogada como control de no infección dio positivo para el ensayo de MNP para el VHS-1 y también tuvo un título de 20 de anticuerpos neutralizantes para el VHS-2 mostrando una reacción cruzada (63). Lo anterior, apoya nuestra decisión de haber tomado como valor de corte un título

de 40 además, se evito en nuestro estudio ya que todos los pacientes estudiados solamente presentaban infección por VHS-1.

Zweerink y Stanton trabajaron con 15 muestras de pacientes con infecciones faciales recurrentes por VHS-1; ellos encontraron que todos los sueros presentaban altos títulos de anticuerpos neutralizantes con respecto al control y también observaron que estos títulos se mantenían en un nivel alto (con títulos de 256) después de 3 meses de haberse presentado la lesión (48). En este estudio no dio el seguimiento serológico a los pacientes lo cual sería interesante, pero bajo estas observaciones deducimos que el paciente tiene una buena respuesta inmune y que esta se mantiene presente en el transcurso de un cierto plazo. Estos autores mencionan que a pesar de que los títulos de anticuerpos neutralizantes bajaron un poco, estos se mantenían sugiriendo que la recurrencia de la infección herpética no esta tan relacionada con fluctuaciones temporales en los niveles de los anticuerpos, mientras la ausencia o presencia de anticuerpos específicos no hacen que los individuos sean más susceptibles a infecciones recurrentes.

También es interesante considerar que tipo de intervención tienen estos anticuerpos neutralizantes presentes en el paciente; si están participando en el bloqueo de la interacción del virus con la célula o en anular la liberación y diseminación de las partículas virales en el hospedero, en donde, de manera general se ha denominado efecto de neutralización pero según Klasse y Sattentau en su revisión lo consideran como

efectos diferentes (47). La participación de los anticuerpos neutralizantes en la infección viral y como complementa a la respuesta inmune es de gran importancia debido a la diversidad de trabajos enfocados en el desarrollo de vacunas que inducen este tipo de anticuerpos a pesar de estar presentes en el hospedero, siguen padeciendo de esta y muchas otras infecciones virales.

La importancia de haber determinado los títulos de los anticuerpos neutralizantes es porque nos permite ver el nivel de respuesta del individuo hacia el agente infeccioso, en este caso frente al VHS-1. La eficacia del anticuerpo puede radicar en el tipo de antígeno específico que llega a reconocer. En este caso hay una gran cantidad de epítomos antigénicos que pueden llegar a reconocer los anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes, estos antígenos pueden ser de tipo común entre especies estrechamente relacionadas y manifestar una reacción cruzada como se ha observado con la gB entre VHS-1 y el VHS-2 o de tipo exclusivo del agente infeccioso (64). El empleo de anticuerpos monoclonales antígeno-específico puede llegar a ser una opción para las prueba con fines diagnósticas al tener más valor específico, sin embargo, queda el análisis de los sueros policlonales de los pacientes por el método de ELISA que llega a tener una sensibilidad del 100% y especificidad del 100% según lo reportado por el fabricante.

Lo anterior pone en evidencia que no solo es suficiente el conocer la presencia y función de los anticuerpos, sino también se requiere conjuntar esta información con otras

pruebas para hacer la identificación de antígenos inmunodominantes del agente infeccioso. La determinación de cuál o cuáles de las casi 80 proteínas sintetizadas por el VHS-1 durante la infección juegan un papel importante en la interacción antígeno-anticuerpo-infección. Los virus de manera general tienen la propiedad de modular las funciones biológicas de una célula animal modificándolas para que se sinteticen nuevas partículas virales. El VHS-1 no es la excepción, de ahí que la infección herpética puede manifestarse de manera clínica en células mucoepiteliales desarrollando lesiones ulcerosas por efecto de la lisis celular al ser liberadas las partículas virales y la particularidad de este virus es su tropismo por las células neuronales sensoriales estableciéndose y manteniéndose en estado de latencia, de ahí el interés particular del comportamiento de la infección viral sobre este último tipo celular.

En nuestro trabajo evaluamos los antígenos que de manera particular fueron reconocidos por los sueros de los pacientes. Se infectaron células Vero como representantes del desarrollo de una infección activa. La infección se dejó progresar por 7 horas figurando las primeras etapas de una infección y se obtuvieron las proteínas virales intracelulares. Treinta y seis de los antígenos virales fueron expresados durante la infección lítica, de entre 25 y 240 kDa. En la mayoría de las muestras el reconocimiento se dio en la región de las proteínas de alto peso molecular.

Eberle *et.al*, trabajaron con muestras de pacientes para determinar las proteínas que reconoce el sistema inmune mediante inmunoprecipitación de antígenos a partir de

sueros de pacientes e identificaron proteínas de 125 a 130 kDa correspondientes a las glicoproteínas gC, gA, gB y gD (63). En el presente trabajo nosotros empleamos la prueba de Western blot para la determinación de antígenos específicos donde observamos también un reconocimiento constante de las proteínas de alto peso molecular del VHS-1 para los 10 aislados por parte de los sueros empleados. De ahí que se decidió hacer 2 grupos de proteínas, las de alto peso molecular que van de 100 a 260 kDa y otro grupo de proteínas de bajo peso molecular que va de 45 a 70 kDa, aproximadamente (ver resultados).

De acuerdo con el peso molecular de las proteínas que fueron reconocidas en el 90% de las muestras estudiadas corresponden a las ICP6, ICP0, timidin cinasa, gD e ICP4. Esas proteínas son importantes en los mecanismos de virulencia durante las etapas tempranas de la infección celular, esto también confirma el establecimiento de una infección viral celular *in vitro* (36). Bowles *et.al*, en su publicación declaran la importancia de las pruebas inmunológicas como apoyo en el establecimiento de un diagnostico con respecto a otras técnicas disponibles. En su trabajo emplearon las mismas herramientas que nosotros utilizamos, el Western blot. Estos investigadores se enfocaron en la evaluación de 3 proteínas únicamente: ICP4, ICP27 y VP22. Coincidiendo con sus hallazgos en la presencia de ICP4 como en otros trabajo, al igual Kuhn *et.al*, reportó en su trabajo el reconocimiento de ICP4 y de gD además de gB, VP19, VP20 y VP23 (56,64).

Kuhn et.al, encontraron al igual que nosotros las proteínas con un peso molecular aproximado de 90, 70 y 45 kDa, esta última corresponde a la VP20 una proteína estructural de la cápside viral. La presencia de esta proteína se relaciona con la expresión de proteínas de los genes tardíos, en este caso por las pocas horas que se dejó el cultivo celular en infección pueden ser que su presencia este más relacionada por el proceso inicial de la infección que a una expresión génica viral, ya que se desconoce el tiempo que le lleva a la célula degradar estas primeras proteínas mientras el virus sintetiza nuevas para la formación de las nuevas partículas virales (64,65).

La glicoproteína gD fue una de las proteínas inmunoreconocidas por la respuesta inmune humoral. Estos anticuerpos pueden jugar un papel importante, no solo en la función neutralizante como ya se mencionó anteriormente, sino también impidiendo la diseminación de las partículas virales ya que estos anticuerpos específicos bloquean su liberación a partir de células infectadas, según lo reportado por Shariffa *et al.* (35, 39). También esta proteína es crucial en la fusión de la membrana viral y la membrana celular y por lo tanto en la infección de células no permisivas, además de que se estudia como un posible candidato para el desarrollo de una vacuna (52)

Las dos propiedades biológicas más importantes y únicas de los herpesvirus son la neurovirulencia y la latencia. Los mecanismos virales implicados en esta afinidad y su modulación en su expresión génica en células neuronales no están bien definidos aún. El determinar que antígenos proteínicos pudieran estar presentes en la infección latente,



principalmente, en las primeras horas de la infección proporciona información importante en el comportamiento de la infección.

En el presente trabajo también determinamos las proteínas virales que estuvieron presentes en la infección por el VHS-1 en la línea neuronal humana SK-N-SH utilizada como modelo de infección de latencia. Como las primeras horas de una infección son importantes y son cruciales para el desarrollo de una buena respuesta inmune, infectamos las células SK-N-SH por 7 horas y como ya se describió se determinaron los antígenos reconocidos por los sueros de los pacientes.

Un total de 33 proteínas diferentes fueron reconocidas en este tipo de infección con los 11 virus evaluados y los sueros correspondientes, de igual manera se seleccionaron las mismas 11 proteínas analizadas en el ciclo lítico donde se encontró claramente las proteínas que participan en las etapas tempranas de la infección. En las células permisivas hubo un menor reconocimiento de manera general para estas proteínas en las células neuronales, por ejemplo de la proteína de 173 kDa correspondiente a la ICP4 disminuyó su reconocimiento en un 50%. Lo anterior, puede indicar una disminución de la actividad viral, sin la presencia de las proteínas de los genes tempranos, por lo tanto no hay inducción de la actividad biosintética de las proteínas virales.

Otra proteína es la ICP0 (119 kDa) donde hubo una disminución de un 10% en el inmunoreconocimiento en el modelo de infección latente. Esta proteína es importante en la actividad del virus. El mecanismo de regulación entre ICP10 y LAT es crucial en la modulación de los dos estadios de infección del VHS-1, un menor reconocimiento sugiere que la actividad viral cambio sugiriendo este cambio de actividad viral inclinándose hacia el estadio latente. En este trabajo no logramos detectar una posible proteína de LAT que se puede encontrar como una proteína de 40 kDa si esta degradada o de 80 kDa; y esto pueda deberse por los tiempos cortos de infección.

Un reporte por Chou y Roizman donde infectaron células SK-N-SH, a las 7h post-infección muestra la presencia de varias proteínas virales entre estas la ICP5, 11, 19, 25 y 32, persistiendo hasta las 13h post-infección. En este trabajo estos autores no se enfocaron en estas proteínas, si no que evaluaron la mutación en el gen 34.5 del VHS-1, no muchos investigadores se centran en las proteínas si no que se van a niveles génicos que si bien aporta información también sabes que no siempre se relaciones los niveles de expresión génica con los niveles de expresión de proteínas (65).

Otra proteína detectada fue la de aproximadamente 55 kDa encontrada solamente en el modelo de infección de latencia y no en el modelo de infección lítico. No se encontró información sobre esta proteína, motivo por el cual este hallazgo tiene un interés particular, posiblemente esta proteína pueda ser un blanco para el diagnóstico oportuno y diferencial tratándose de una encefalitis herpética o como otro candidato para

una vacuna enfocándonos en la prevención de la infección latente. Para ello se requieren de otros estudios analíticos para corroborar las características de esta proteína desde el empleo de técnicas relativamente sencillas como una electroforesis de doble dimensión la cual proporcionaría información muy valiosa sobre la proteína, hasta el empleo de cromatografías. Además el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos contra esta proteína apoyarían más a su estudio y aplicaciones como el ver su efecto como inmunógeno en un modelos de infección animal y para un diagnostico más certero.

## **CAPITULO VII**

### **CONCLUSION**

- Todos los pacientes con infección con el VHS-1 presentaron una respuesta de memoria medida por anticuerpos IgG neutralizantes.
- En la infección lítica el 90% de los sueros de los pacientes infectados reconocieron las proteínas de 140, 103 y 50 kDa del VHS-1.
- En la infección latente el 90% en los sueros reconocieron las proteínas de 108 y 48 kDa del VHS-1.
- Las proteínas de 119 y 39 kDa del VHS-1 fueron reconocidas en ambos ciclos de la infección; pero la de 39 kDa mostró más Inmunoreconocimiento en el ciclo de latencia.
- La proteína de 55 kDa del VHS-1 sólo fue inmunoreconocida en el ciclo de latencia.

## **CAPITULO VIII**

### **BIBLIOGRAFIA**

1. S.R. Paludan, A.G. Bowie, K.A. Horan And K.A. Fitzgerald. Recognition Of Herpesviruses By The Innate Immune System. *Nature Reviews Immunology*. 2011. 11
2. N. Novak And WM. Peng. Dancing With The Enemy: The Interplay Of Herpes Simplex Virus With Dendritic Cells. *Clinical And Experimental Immunology* 2005.142: 405–410.
3. Patrock R. Murray, *Microbiología Medica*, 5º Edición. Editorial Elsevier España. ISBN 978-84-8174-927-4.
4. J-E Malkin, P Morand, D Malvy, T D Ly, B Chanzy, C De Labareyre, A El Hasnaoui, S Hercberg. Seroprevalence Of HSV-1 And HSV-2 Infection In The General French Population. *Sex Transm Infect*. 2002. 78:201–203
5. D.T. Fleming, G. M. Mcquillan, R. E. Johnson, A. J. Nahmias, S. O. Aral, F. K. Lee, and M. E. St. Louis. Herpes Simplex Virus Type 2 In The United States, 1976 To 1994. *N Engl J Med*. 1997. 337(16):1105-1111.
6. Fujie Xu, Francis K. Lee, Rhoda A. Morrow, Maya R. Sternberg, Kristina E. Luther, Gary Dubin, And Lauri E. Markowitz. Seroprevalence Of Herpes Simplex Virus Type 1 In Children In The United States. *The Journal Of Pediatrics*. 2007. 151 (4):374–377
7. P. G. Arduino, S. R. Porter. Herpes Simplex Virus Type 1 Infection: Overview On Relevant Clinico-Pathological Features. *J Oral Pathol Med*. 2008. 37: 107–121

8. P. Guey-Chuen and J. Clinton. Towards An Understanding Of The Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Reactivation Cycle. *Interdisciplinary Perspectives On Infectious Diseases*. 2010.
9. T. J. Taylor, M. A. Brockman, E. E. Mcnamee, and D. M. Knipe. Herpes Simplex Virus. *Frontiers In Bioscience*. 2002. 7:752-764.
10. P. A. Maritza et al. Anticuerpos Monoclonales (Acm) Que Reconocen El Virus Herpes Simple (HSV) Y Su Posible Aplicación Al Diagnóstico. *Rev Cubana Med Trop*. 1997. 49 (3): 181-185.
11. Semsettin Ustacelebi. Diagnosis Of Herpes Simplex Virus Infections. *Journal Of Clinical Virology*. 2001. 21: 255–259
12. Yi Wang,C, Qi Wang,E, Qinchang Zhua,D, Rong Zhoua,B, Jinsong Liua,E, Tao Penga,C. Identification And Characterization Of Acyclovir-Resistant Clinical HSV-1 Isolates From Children. *Journal Of Clinical Virology*. 2011. 52: 107– 112
13. Kay Grunewald, Prashant Desai, Dennis C. Winkler, J. Bernard Heymann, David M. Belnap, Wolfgang Baumeister, Alasdair C. Steven. Three-Dimensional Structure Of Herpes Simplex Virus From Cryo–Electron Tomography. *Science*. 2003. 302, 1396
14. R. Lehman and P. E. Boehmer. Replication of Herpes Simplex Virus DNA. *The Journal Of Biological Chemistry*. 1999. 274 (40).
15. T. C. Mettenleiter. Pathogenesis of Neurotropic Herpesviruses: Role of Viral Glycoproteins in Neuroinvasion and Transneuronal Spread. *Virus Research*. 2003. 92: 197-206
16. D. J. Mcgeoch, M. A. Dalrymple,T A. J. Davison, A. Dolan, M. C. Frame,, D. McNab, L. J. Perry, J. E. Scott And P. Taylor. The Complete DNA Sequence Of The Long Unique Region In The Genome of Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Gen. Virol*. 1988. 69: 1531-1574.
17. W. Gibson and B. Roizman. Proteins Specified By Herpes Simplex Virus. VIII. Characterization And Composition of Multiple Capsid Forms Of Subtypes 1 And 2. *Journal of Virology*. 1972. 10(5):1044-1052

18. R. J. Whitley, D. W. Kimberlin, and B. Roizman. Herpes Simplex Viruses. *Clinical Infectious Diseases*. 1998. 26:541–555
19. S. V. Zaichick, , K. P. Bohannon and G. A. Smith. Alphaherpesviruses and the cytoskeleton in neuronal infections. *Viruses*. 2011. 3(7): 941-981
20. G. A. Karasneh and D. Shukla. Herpes Simplex Virus Infects Most Cell Types In Vitro: Clues To Its Success. *Virology Journal*. 2011. 8:481
21. T. Sakisaka, T. Taniguchi, H. Nakanishi, et al. Requirement of Interaction of Nectin-1alpha/Hvec With Afadin For Efficient Cell–Cell Spread of Herpes Simplex Virus Type 1. *J of Virol*. 2001. 75:4734–4743.
22. B. Levine, J. M. Hardwick, B. D. Trapp, T. O. Crawford, R. C. Bollinger, D. E. Griffin. Antibody-Mediated Clearance of Alphavirus Infection from Neurons. *Science*. 1991; 254: 856–860
23. Thomas C. Mettenleiter. Budding Events In Herpesvirus Morphogenesis. *Virus Research*. 2004. 106: 167–180
24. M. Salio, M. Cella, M. Suter, A. Lanzavecchia. Inhibition of Dendritic Cell Maturation By Herpes Simplex Virus. *Eur J Immunol*. 1999. 29: 3245–3253.
25. S. Manoj, Ch. R. Jogger, D. Myscofski, M. Yoon and P. G. Spear. Mutations in herpes simplex virus glycoprotein D that prevent cell entry via nectins and alter cell tropism. *PNAS*. 2004. (101)34: 12414–12421
26. Michele Simonato, Roberto Manservigi, Peggy Marconi and Joseph Glorioso. Gene Transfer Into Neurones For The Molecular Analysis of Behaviour: Focus On Herpes Simplex Vectors. *Trends Neurosci*. 2000. 23: 183–190
27. I. R. Lehman, and P. E. Boehmer . Replication of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem*. 1999. 274(40): 28059-28062.
28. M. M. Saksena, H. Wakisaka, B. Tijono, R. A. Boadle, F. Rixon, H. Takahashi and A. L. Cunningham. Herpes simplex virus type 1 accumulation, envelopment, and exit in growth cones and varicosities in mid-distal regions of axons. *J of Virol*. 2006. 80(7): 3592-3606.
29. M. Huber and A. Trkola. Humoral Immunity to HIV-1: Neutralization And Beyond. *Journal of Internal Medicine* 2007. 262: 5–25

30. Mahan Knipe, Peter M. Howley, Diane E. Griffin. *Fundamental Virology*. Cuarta Edición. Editorial Lippincott-Raven, 2001.
31. Roizman, Sears A.E. Herpes simplex viruses and their replication, in B.N. Fields, DM Knipe, P.M. Howley. Eds. *Fields Virology*, 3rd ed Lipincott-Raven, Philadelphia 1996. 2231-2295
32. Sauerbrei, P. Wutzler, P. Wutzler. Laboratory Diagnosis of Central Nervous System Infections Caused by Herpesviruses. *Journal of Clinical Virology*. 2002. 25: S45–S51
33. S. W. Fenninga, F. Esperb, D. Schollc, Y. T. Huangd. HSV IgG Antibody Inhibits Virus Detection In CSF. *J Clin Virol*. 2012.
34. R. J. Whitley, D. W. Kimberlin, and B. Roizman, and N. W. Fraser. Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice. *Nature*. 1983. 302:523–525.
35. Wolverton S. *Comprehensive Dermatology Drug Therapy*. 2da Edición, Editorial Saunders. Elsevier. 2007. 106-108.
36. G. C. Perng, and C. Jones. Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2010.
37. J. L. Umbach, M. F. Kramer, I. Jurak, H. W. Karnowski1, D. M. Coen and B. R. Cullen. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *NATURE*. 2008. 454(7): 780-785
38. Alfred I. Geller, Matthew J. During and Rachael L. Neve. Molecular Analysis Of Neuronal Physiology By Gene Transfer Into Neurons With Herpes Simplex Virus Vectors. *Trends Neurosci*. 1991. 14, 428-432
39. Craig S. Miller, Robert J. Danaher, and Robert J. Jacob. ICP0 Is Not Required for Efficient Stress-Induced Reactivation of Herpes Simplex Virus Type 1 from Cultured Quiescently Infected Neuronal Cells. *Journal of Virology*. 2006. 80 (7): 3360–3368.
40. Freedberg I. 2003. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. Mc GrawHill. New York.
41. Cheryl X Zhang, Harrison Ofiyai, Ming He, Xuexian Bu, Yanhua Wen, And William Jia. Neuronal Activity Regulates Viral Replication Of Herpes Simplex



- Virus Type 1 In The Nervous System. *Journal Of Neurovirology*. 2005. 11: 256–264,
42. Sherrie Divito, Thomas L. Cherpes, Robert L. Hendricks. A Triple Entente: Virus, Neurons, and CD8+ T Cells Maintain HSV-1 Latency. *Immunologic Research*. 2006. 36:119–126.
  43. Decman V, Freeman ML, Kinchington PR, Hendricks RL: Immune control of HSV-1 latency. *Viral Immunol*. 2005. 18:466–473.
  44. Svend Ellermann-Eriksen. Macrophages and Cytokines in The Early Defence Against Herpes Simplex Virus. *Virology Journal* 2005, 2:59
  45. Todd R. Wuest and Daniel J. J. Carr. The role of chemokines during herpes simplex virus-1 infection. *Front Biosci*. 2009. 13: 4862–4872.
  46. Leung KN, Nash AA, Sia DY, Wildy P. Clonal analysis of T-cell responses to herpes simplex virus: isolation, characterization and antiviral properties of an antigen-specific helper T-cell clone. *Immunology*. 1984. 53:623.
  47. I. Losada, A. Cañizares, T. Hellín, P. Martí-Belda, A. Guerrero. Estudio de Sensibilidad *In Vitro* del Virus Herpes Simple a Aciclovir y Foscarnet. ¿Son Necesarios los Estudios de Sensibilidad de Forma Rutinaria?. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002. 20: 25-27.
  48. P. J. Klasse And Q. J. Sattentau. Occupancy And Mechanism In Antibody-Mediated Neutralization Of Animal Viruses. *Journal Of General Virology*. 2002. 83, 2091–2108
  49. Hans J. Zweerink and Linda W. Stanton. Immune Response to Herpes Simplex Virus Infections: Virus-Specific Antibodies in Sera From Patients With Recurrent Facial Infections. *Infection and Immunity*. 1981. 31 (2): 624-630.
  50. Rajcani, V. Durmanova. Early Expression Of Herpes Simplex Virus (HSV) Proteins And Reactivation Of Latent Infection. *Folia Microbiol*. 2000. 45 (I), 7-28.
  51. A. Kather, M. J. Raftery, G. Devi-Rao, J. Lippmann, T. Giese, R. M. Sandri-Goldin, and Günther Schönrich. Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1)-Induced Apoptosis in Human Dendritic Cells as a Result of

Downregulation of Cellular FLICE-Inhibitory Protein and Reduced Expression of HSV-1 Antiapoptotic Latency-Associated Transcript Sequences. *J. Virol.* 2010 84:1034-1046

52. Volcy, Charles. *Dogma De La Bacteriología Y Otros Eventos Como Puntas De Lanza De La Virología*. Iatreia, Medellín, 2009. 22 (4).
53. Jochen W. Heine, Robert W. Honess, Enzo Cassai, And Bernard Roizman. Proteins Specified By Herpes Simplex Virus Xii. The Virion Polypeptides Of Type 1 Strains. *J. Virol.* 1974, 14 (3).
54. Joany Chou And Bernard Roizman. The 134.5 Gene Of Herpes Simplex Virus 1 Precludes Neuroblastoma Cells From Triggering Total Shutoff Of Protein Synthesis Characteristic Of Programed Cell Death In Neuronal Cells. *Proc. Nail. Acad. Sci.* 1992. 89: 3266-3270.
55. David M. Knipe And Anna Cliffe. Chromatin Control Of Herpes Simplex Virus Lytic And Latent Infection, *Nature Reviews Microbiology*. 2008. 6:211-221
56. Rhoda L. Ashley, Julie Militoni, Francis Lee, Andre Nahmias, and Lawrence Corey. Comparison Of Western Blot (Immunoblot) And Glycoprotein Specific Immunodot Enzyme Assay For Detecting Antibodies To Herpes Simplex Virus Types 1 And 2 In Human Sera. *J of Clinical Microbiology*, 1988. 26 (4): 662-667
57. Robert N. Bowles, Jamie C. Yedowitz, And John A. Blaho. Reconsideration Of Viral Protein Immunoblotting For Differentiation Of Human Herpes Simplex Viruses *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008. 62(2): 167–176.
58. June L Biedler, Lawrence Helson, and Barbara A. Spengler. Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer Research.* 1973. 33:2643 2652
59. Illán H., Jacob N., Maiolo E., Cisterna D., Schiavelli R., Freire M.C.. Estudio De Sensibilidad Antiviral De Virus Herpes Simplex En Pacientes Trasplantados. *Rev. Argent. Microbiol.* 2004. 36(2): 88-91
60. J. Christophers, J. Clayton. Survey Of Resistance Of Herpes Simplex Virus To Aciclovir In Northwest England. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998. 42
61. Dominique Bünzli, Vincent Wietlisbach, Fabrizio Barazzoni, Roland Sahli And Pascal RA Meylan. Seroepidemiology Of Herpes Simplex Virus Type 1 And 2 In

- Western And Southern Switzerland In Adults Aged 25–74 In 1992–93: A Population-Based Study. *BMC Infectious Diseases*. 2004, 4.
62. S Rezaei-Chaparpori, M Assmar, N Amirmozafari, L Modiri, A Massiha, S Shokri-Fashtali, Z Gholizadeh, S Akbari. Seroepidemiology Of Herpes Simplex Virus Type 1 And 2 In Northern Iran. *Iranian J Publ Health*, 2012. 41(8).
63. Abraham AM, Kavitha S, Joseph P, George R, Pillay D, Malathi J, Jesudason MV, Sridharan G. Aciclovir Resistance Among Indian Strains of Herpes Simplex Virus As Determined Using A Dye Uptake Assay. *Indian J Med Microbiol*. 2007. 25:260-2.
64. R. Eberle and Richard J. Courtney. Assay of Type-Specific And Type-Common Antibodies To Herpes Simplex Virus Types 1 And 2 In Human Sera. *Infection and Immunity*, Mar. 1981. 31 (3):1062-1070.
65. Joachim E. Kuhn, Gabriele Dunkler, Klaus Munk, And Rudiger W. Braun. Analysis Of The Igm And Igg Antibody Response Against Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Structural And Nonstructural Proteins. *Journal Of Medical Virology*. 1987. 23:135-150.
66. D.M. Shariffa, J. Hallworth, M. Desperbasquesa, A. Buchana, G.R.B. Skinnera. Immune Inhibition Of Virus Release From Herpes Simplex Virus-Infected Cells By Human Sera. *Intervirology* 1988;29:125-132.
67. D.M. Shariffa, J. Daviesa, M. Desperbasquesa, M. Billstroma, H.J. Geerligsb, G.W. Wellingb, S. Welling-Westerb, A. Buchana, G.R.B. Skinnera. Immune Inhibition Of Virus Release From Human And Nonhuman Cells By Antibody To Viral And Host Cell Determinants. *Intervirology* 1988;32:28-36

## ANEXO

### CARTA DE CONSENTIMIENTO

**Protocolo N°:**

**PROTOCOLO:** **Estudio Molecular E Inmunológico De Infecciones Virales Inductoras De Encefalitis y/o Dermatitis, Desarrollo De Vacunas Contra Infecciones Virales**

**INVESTIGADOR:** **Dr. Ernesto Torres López**

Esta forma de consentimiento pudiera contener palabras que no entienda. Por favor pregunte al doctor del estudio o al equipo del estudio que le expliquen cualquier palabra que usted no entienda totalmente.

**En la lesión dérmica:**

El estudio realizará una investigación en la búsqueda de partículas virales, con muestras biológicas (el líquido de la lesión superficial en la piel) de las lesiones dérmicas causadas por algunos virus.

**En la encefalitis herpética:**

El estudio realizará una investigación en la búsqueda de partículas virales, en muestras biológicas, en este caso en Líquido Cefalorraquídeo, en donde pueden estar las partículas virales causantes de la enfermedad.

### **PROPÓSITO Y DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO**

Breve descripción del estudio:

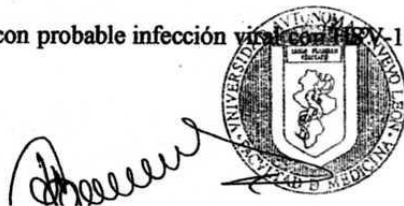
**Nosotros buscamos partículas virales para evaluar su propiedad de daño y poder diseñar vacunas antivirales contra estas partículas.**

Aproximadamente 500 pacientes con estas infecciones virales menores de 80 años de edad participarán en este estudio

El estudio es sencillo y requiere de solo una toma de muestra de la lesión del causada por el virus con un hisopo "estéril" y no causa dolor, además de una toma de sangre, también en condiciones estériles, en el caso de la infección por HSV-1 y 2, en el caso de la infección por HSV-1 que produce encefalitis será una toma de Líquido Cefalorraquídeo (LCR) en condiciones de esterilidad, estas serán tomadas y dirigidas por el Dr. Héctor Ramón Martínez del Departamento de Neurología, además de una toma de sangre, el tratamiento será para estas infecciones virales será bajo la dirección de los Departamentos de Dermatología y Neurología , respectivamente.

El estudio tiene solo tres fases:

- (1) Selección y reclutamiento de pacientes con probable infección viral con HSV-1 o HSV-2.



The image shows a handwritten signature in black ink over a circular official seal. The seal features a central emblem with a caduceus (a staff with two snakes) and is surrounded by the text 'UNIVERSIDAD DEL PACÍFICO' at the top and 'FACULTAD DE MEDICINA' at the bottom.

- (2) Consentimiento y firma del paciente, en el momento que usted firma este consentimiento se realiza la primera toma de muestras de la lesión y de sangre.
- (3) La fase de tratamiento y seguimiento., en caso de que se requiera serán dirigidos por su médico

Si está dispuesto(a) a participar en este estudio, se le pedirá que interrumpa cualquier medicamento que pudiera estar tomando pero que continúe su actual régimen para otras condiciones médicas. A las mujeres embarazadas solo se tomara una muestra de la lesión herpética y una toma de sangre.

Este es un estudio para aislar virus patógenos que causen lesiones herpéticas o enfermedades cerebrales en humanos.

Se planea que alrededor de 500 personas que tengan una infección herpética no mayores de 80 años de edad participarán en este estudio.

## **PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO**

### **Selección:**

Antes de iniciar el estudio, usted será evaluado en una consulta de selección por el Doctor del estudio en la oficina o clínica para valorar si usted es elegible para participar en este estudio. Se le harán varias preguntas respecto a su salud, antecedentes médicos y medicamentos que pudiera estar tomando. El doctor del estudio determinará si usted es elegible para participar en el estudio.

Las mujeres en edad reproductiva (teniendo periodos menstruales y no esterilizadas quirúrgicamente) o embarazadas también solo serán incluidas en el estudio dermatológico.

### **Periodo de Seguimiento:**

En caso necesario será por la consulta y la dirección del departamento de Neurología o Dermatología, respectivamente.

## **BENEFICIOS**

No existe garantía que usted obtendrá un beneficio al participar en este estudio; sin embargo, usted y los futuros pacientes pudieran sacar provecho de cualquier investigación científica. Tales beneficios incluyen la posibilidad de que este estudio pudiera ayudar a desarrollar una nueva inmuno terapia como la producción de una vacuna contra esta infección, para usted u otras personas con esta misma infección

## **COSTOS**

Las visitas a la clínica y los procedimientos relacionados con el estudio serán sin costo.

A handwritten signature in black ink is written over a circular official stamp. The stamp features a central emblem with a figure and text around the perimeter, including the words "UNIVERSIDAD DEL PACÍFICO" and "FACULTAD DE MEDICINA".

## **NUEVOS HALLAZGOS**

Se le notificará de manera oportuna respecto a cualquier nueva información importante en relación a su seguridad y que pudiera influir sobre su voluntad de continuar participando.

## **CONFIDENCIALIDAD Y REVISIÓN DE DOCUMENTOS FUENTE**

Los archivos del estudio que lo identifican se mantendrán confidenciales como lo requieren las leyes. Excepto cuando lo requieran las leyes, no se le identificara por su nombre, domicilio, número de teléfono o cualquier otro identificador personal directo en los registros del estudio divulgados fuera del centro de estudio. Para aquellos registros divulgados fuera del centro de estudio, se asignará un número de código único para proteger la confidencialidad de los sujetos participando en el estudio.

Su autorización para el uso de los datos de investigación, muestras biológicas y fotografías almacenadas como parte de este estudio no tiene fecha de expiración. Sin embargo, la divulgación de los resultados del estudio no incluirá ninguna información que pudiera permitir la identificación de algún individuo participando en el estudio.

## **PREGUNTAS**

Usted tiene derecho de realizar cualquier pregunta, en cualquier momento, respecto al estudio, incluyendo los riesgos potenciales y conocidos.

Si en cualquier momento tiene una pregunta relacionada con este estudio o si experimenta una lesión relacionada con la investigación, el **Dr. Ernesto Torres López** o su representante estará disponible para contestar sus preguntas en el número de teléfono: 83 33 10 58, Departamento de Inmunología, en el horario de 9 a.m. a 4:00 p.m.

Si tiene cualquier pregunta respecto a sus derechos como paciente de investigación, se puede comunicar con el Comité de Ética del Hospital Universitario "José E. González". El número de teléfono es: 818-329-4050.

No firme esta forma a menos que haya tenido la oportunidad de preguntar y haya recibido respuestas adecuadas a todas sus preguntas.

## **PARTICIPACIÓN /RETIRO VOLUNTARIO**

Usted puede decidir no participar en el estudio, o, si decide participar en el estudio, se puede retirar del estudio en cualquier momento.

Su decisión de no participar o de retirarse del estudio no significará ningún castigo o pérdida de beneficios a los cuales tenga derecho, y no evitara su acceso a la atención médica. Si decide retirarse, por favor notifique al Dr. Ernesto Torres López o a su representante en la consulta por escrito y hágale saber que se está retirando del estudio.



The image shows a handwritten signature in black ink over a circular official seal. The seal features a central emblem with a caduceus and is surrounded by text, including "HOSPITAL UNIVERSITARIO 'JOSÉ E. GONZÁLEZ'" and "DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA".

Su doctor del estudio puede retirarlo a usted el estudio en cualquier momento cuando Él / Ella considere que es en su mejor interés.

### CONSENTIMIENTO

He leído y entendido toda la información precedente describiendo este estudio de investigación. Esta investigación me la explicó el Dr. Ernesto Torres López y/o el coordinador del estudio y todas mis preguntas fueron contestados a mi entera satisfacción.

Yo consiento en participar voluntariamente en este estudio.

Entiendo que recibiré una copia firmada de esta forma de consentimiento.

Al firmar esta forma yo no he renunciado a ninguno de los derechos legales a los cuales yo de otra forma tuviera derecho como participante en un estudio de investigación.

Yo otorgo la autorización para divulgar mis antecedentes médicos al Patrocinador, la FDA, la SSA, Comité de Ética y/o Consejo de Revisión Institucional y otras autoridades sanitarias.

Otorgo la autorización para divulgar mis antecedentes médicos relacionados con la investigación a Dr. Ernesto Torres López, la FDA, otras autoridades sanitarias y al Comité de Ética y/o Consejo de Revisión Institucional. También estoy de acuerdo que la información resultante de mi caso se pueda usar en publicaciones resultando de este estudio, sin revelar mi identidad personal de manera alguna.

\_\_\_\_\_  
Firma del paciente

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre del paciente en letras de molde

\_\_\_\_\_  
Nombre de la persona conduciendo la discusión de consentimiento

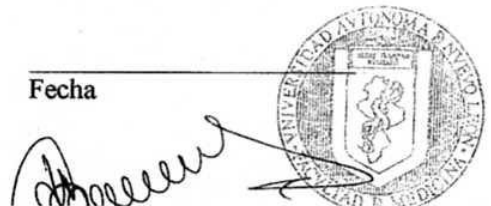
\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre del testigo

\_\_\_\_\_  
Firma del testigo

\_\_\_\_\_  
Parentesco con el paciente

\_\_\_\_\_  
Fecha

A handwritten signature in black ink is written over a circular seal. The seal features a central emblem with a caduceus and is surrounded by the text "UNIVERSIDAD ANTIOQUIA FACULTAD DE MEDICINA".

## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS

### Generalidades de Cultivo Celular

Componentes para suplementar Medio A-DMEM:

Componentes	Volumen para células Vero	Volumen para células SK-N-SH
Medio A-DMEM	500 ml	500 ml
Suero bovino fetal (2%)	10 ml	58 ml
Aminoácidos No esenciales (1%)	5 ml	5 ml
Antibiótico (Penicilina/estreptomicina, 1%)	5 ml	5 ml
L-Glutamina (1%)	5 ml	5 ml

- Volúmenes a manejar en Cultivo celular:

Tamaño de botella	PBS (lavados) ml	Tripsina 1x, ml	Medio (A-DMEM) ml
<b>25 cm<sup>2</sup></b>	3	1	3
<b>75 cm<sup>2</sup></b>	4	2	10
<b>150 cm<sup>2</sup></b>	5-7	2.5	21

- Etiquetar las botellas y placas de cultivo con los siguientes datos:

Línea Celular	Vero	SK-N-SH
# de pasaje	p33 (pasaje #)*	p9**
Fecha	170912 (día-mes-año)	170912 (día-mes-año)

\*máx. 20 pasajes después de descongelar un vial con células.

\*\* max. 10 pasajes después de descongelar un vial con células.

Cepa Viral	VHS-1 (KOS) ATCC VR-1493
------------	--------------------------

- Cálculos para MOI a partir de PFU:

Para calcular la MOI se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{MOI} = \frac{(\text{PFU})(\text{Volumen de Infección})}{\# \text{ de células a infectar}}$$

Ejemplo de cálculos:

MOI: 0.01

Partiendo de un concentrado viral con un título de  $7 \times 10^8$  PFU/ml

Células a infectar:  $2.5 \times 10^5$  células Vero.

Primero se debe calcular el número de PFU necesarios, despejando de la fórmula anterior:

$$\text{PFU} = \frac{(0.01)(2.5 \times 10^5 \text{ células})}{0.8 \text{ ml}}$$



PFU= 3,125 PFU

Pero si se van a preparar 3 ml:

$3,125 \text{ PFU} \times 3 \text{ ml} = 9,375 \text{ PFU}$  para tener 3,125PFU/ml.

Entonces, hacer diluciones seriadas del concentrado viral, el valor de dilución más cercano al número de PFU's necesarios es  $7 \times 10^4$  (7,000 PFU/ml), es decir la dilución  $10^{-4}$  (dilución #4); si se va a preparar 3ml de dilución con una MOI: 0.01, se usa la fórmula de:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(7 \times 10^4 \text{ PFU}) V_1 = (9,375 \text{ PFU})(3 \text{ ml})$$

$$V_1 = 0.4 \text{ ml de la dilución } 10^{-4} + 2.6 \text{ ml de medio A-DMEM 2\% SBF} \rightarrow \text{dilución \#5}$$

Con ésta última dilución infectar  $2.5 \times 10^5$  células Vero con 0.8ml a una MOI= 0.01

## EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

### Soluciones de raspado:

Para 50 ml

Reactivo	Concentración	Medir
PBS 1x	1x	50 ml
EDTA pH=8	100 mM	100 ul

### -Buffer de lisis

Reactivo	Concentración
Tritón x-100	0.4%
Tris-HCl pH= 7.5	1 M
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM

Aforar a 10 ml con agua.

Almacenar a 4°C.

### -Solución de lisis\*:

Para 500 µl

Reactivo	Medir
Buffer de lisis	75 µl
“complete”*	75 µl
Inhibidor de proteasas 1X	

\*Almacenar a -20 °C y tiene caducidad de 15 días.

## CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR MÉTODO DE BRADFORD CURVA DE CALIBRACIÓN:

Hacer un stock de ASB (albúmina sérica bovina) de 0.1 g/ml (disolver 0.1 g en 1 ml de agua destilada estéril), después hacer una dilución 1:50 de la solución stock empleando agua destilada

Realizar diluciones para los estándares de BSA:

Estándar (µg/ml)	Volumen del stock de BSA (100 µg/ml)	Agua (µl)	Reactivo de Bradford (µl)	Volumen final (µl)
0	0	75	75	150
2	7.5	67.5	75	150
6	22.5	52.5	75	150
10	37.5	37.5	75	150
14	52.5	22.5	75	150
18	67.5	7.5	75	150

Los estándares se realizan por triplicado en placa de 96 pozos. Después de mezclar bien esperar 5 minutos y leer absorbancia a 600 nm en el lector de ELISA BIORAD IMARK

Los datos fueron graficados en Excel, donde el eje de las abscisas (eje x) corresponde a la concentración y el de las ordenadas (eje y) a la absorbancia.

Calcular la concentración final de las muestras a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración.

### PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA PARA SDS-PAGE

Para preparar 2 mini geles de 6x8cm se mezclan los siguientes reactivos:

#### Gel Separador (10%)

REACTIVO	VOLUMEN
Agua destilada	4.0 ml
Buffer Tris 1.5M pH= 8.8	2.5 ml
Poliacrilamida	3.3 ml
SDS 10%	0.1 ml
PSA	0.1 ml
TEMED	4 µl
<b>Vol. Final</b>	10.004 ml

#### Gel concentrador (5%)

REACTIVO	VOLUMEN
Agua destilada	2.1 ml
Buffer Tris 1M pH= 6.8	0.38 ml
Poliacrilamida	0.5 ml
SDS 10%	0.03 ml
TEMED	0.03 ml
PSA	3 µl
<b>Vol. Final</b>	3.043 ml

#### Buffer de muestra 4x:

REACTIVO	VOLUMEN
----------	---------

Mercaptoetanol	1 ml
SDS	1 g
Tris-HCl 0.5M	25 ml
sacarosa	5 g
Azul de bromofenol	5 mg

## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA WESTERN BLOT

### Soluciones:

#### Buffer de Transferencia 5x:

Reactivo	Concentración	Pesar
Glicina	0.29 %	14.5 g
Tris Base	0.58 %	29 g
Metanol	20 %	200 ml

Para preparar 1 l de buffer, pesar las cantidades correspondientes y aforar a 1 l con agua y almacenar a 4°C

#### PBS 10x:

Reactivo	Concentración	Pesar
NaCl	8 %	80 g
KCl	0.2 %	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 %	14.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 %	2.4 g

Ajustar pH= 7.4 con HCl y aforar a 1 l con agua.

#### Buffer de Bloqueo:

Reactivo	Concentración	Pesar
Leche descremada en polvo (BioRad)	3 %	15 g
PBS 10x	1x	50 ml
Tritón x-100 (100%)	0.5 %	2.5 ml

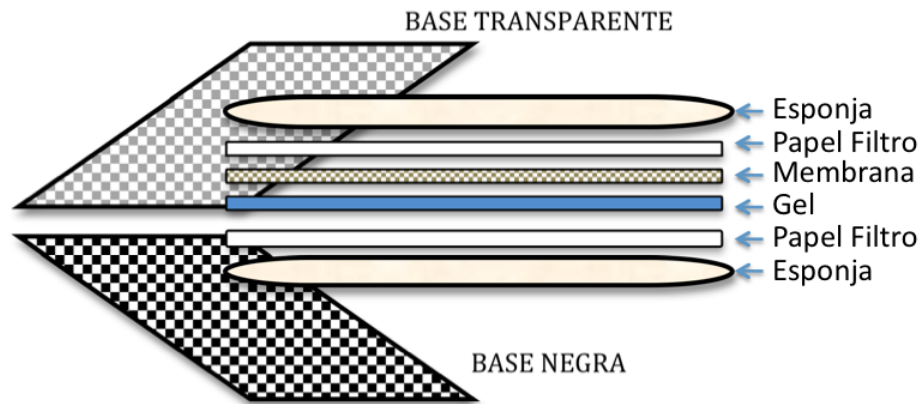
Para preparar 500 ml de buffer, pesar las cantidades correspondientes y aforar a 500 ml con agua.

#### Buffer de dilución para el anticuerpo:

Reactivo	Concentración	Medir (500 mL Vf)	Medir (50 mL Vf)
Leche descremada en polvo	5 %	25 g	2.5g
PBS 10x	1x	50 ml	5 ml
Tritón x-100 (100 %)	0.5 %	2.5 ml	0.25 g

Para preparar 50 ml de buffer, pesar las cantidades correspondientes y aforar a 50 ml con agua.

Para colocar el gel y la membrana antes de la electrotransferencia seguir el siguiente esquema:



Membranas completas de Western blot

## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA INMUNOFLUORESCENCIA

### -Solución Permeable

Tritón X-100 al 0.2% (0.2 ml) en 100 ml de PBS  
 Conservar a 4°C

### -Solución Bloqueadora

ASB al 0.1% (0.1g) en 100 ml de PBS  
 Conservar a 4°C

## RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Pilar del Carmen Morales San Claudio

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Inmunología

Tesis: “IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES DEL VHS-1 EN PACIENTES CON INFECCIÓN ACTIVA Y SU COMPARACIÓN EN LA INFECCIÓN LATENTE *IN VITRO*”

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

### Biografía:

Datos Personales: Nacida en San Nicolás de los Garza, N.L., el 9 de Noviembre de 1982, hija de Rafael Morales Leal y Ma. Magdalena San Claudio Moreno.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Químico Farmacéutico Biólogo en el 2003 en la Facultad de Ciencias Químicas. Grado obtenido de Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunología en el 2008 en la Facultad de Medicina.

Experiencia Profesional: Personal Profesional no docente en el laboratorio de Inmuno-Infectología de 2004 a 2009 en el departamentos de Inmunología. Personal Profesional no docente de agosto 2012 a enero 2013 en el Laboratorio de Infectología Molecular en el departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Profesor por horas en el Instituto de Estudios Superiores AME A.C. desde 2012.