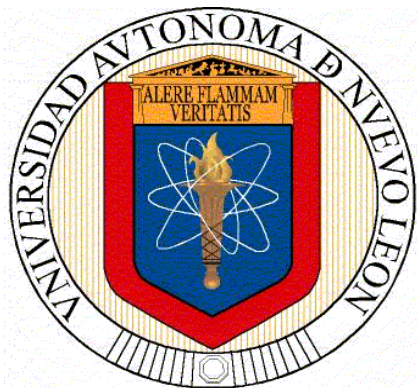


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“ESTUDIO DEL PATRÓN DE VIRULENCIA DE AISLADOS
CLÍNICOS DE PACIENTES CON INFECCIÓN ACTIVA POR HERPES
SIMPLEX VIRUS, EN DOS MODELOS EXPERIMENTALES”**

Tesis que presenta:

CYNTHIA MENDOZA RODRIGUEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN MEDICINA

OCTUBRE 2020

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



“Estudio del patrón de virulencia de aislados clínicos de pacientes con infección activa por Herpes Simplex Virus, en dos modelos experimentales”

Por:

DRA. CYNTHIA MENDOZA RODRIGUEZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO EN DOCTOR EN
MEDICINA**

OCTUBRE 2020

“Estudio del patrón de virulencia de aislados clínicos de pacientes con infección activa por Herpes Simplex Virus, en dos modelos experimentales”

Aprobación de la Tesis:

DR. en C. ERNESTO TORRES LÓPEZ
Director de Tesis

DR. MED. JORGE OCAMPO CANDIANI
MIEMBRO

DR. MED. OLIVERIO WELSH LOZANO
MIEMBRO

DR. MED. OSVALDO VAZQUEZ MARTINEZ
MIEMBRO

DRA. en C. VERONICA M. RIVAS GALINDO
MIEMBRO

DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTINEZ
Subdirector de Estudios de Posgrado

“Estudio del patrón de virulencia de aislados clínicos de pacientes con infección activa por Herpes Simplex Virus, en dos modelos experimentales”

Presentado por:

Dra. Cynthia Mendoza Rodríguez

Este trabajo de tesis fue realizado en el servicio de Dermatología y en el laboratorio de Inmunovirología del servicio de Inmunología, Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Ernesto Torres López y la co-dirección del Dr. Jorge Ocampo Candiani.

Este trabajo cuenta con la aprobación del comité de ética con número de registro IN15-001 y PI15-0012.

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con mucho cariño y amor a ti Dios porque me diste la oportunidad de vivir, con todas las virtudes y capacidades. Además me regalaste una hermosa familia.

A mi esposo Francisco por ser mi compañero de vida y de aventuras, por confiar y siempre creer en mí. Gracias por dar lo mejor de ti cada día para nuestra familia, te amo infinitamente.

A mi hija Andrea que llego a este mundo para enseñarme el verdadero amor incondicional y por ser el motor de todos mis días. Gracias por ser la estrella de nuestras vidas. Te amo.

Con mucho amor y admiración a mis padres, por que creyeron en mí, porque en todo momento han estado a mi lado, siempre para hacer de mi vida un lugar mejor. Su apoyo incondicional, paciencia y cariño me han dado la fuerza en los momentos más difíciles tanto de mi carrera como de mi vida.

A mi mamá por ser la guía y fuente de mucha admiración, porque siempre estas para mí cuando te necesito, siempre estas para un abrazo, un consejo un cariño. Por ser el pilar en mi vida, te amo inmensamente.

A mi papá por ser la alegría en mi vida, por el vivo ejemplo de hombre bueno y tierno que has hecho que mi existencia sea más feliz y placentera. Gracias papi por las sonrisas que me sacas y por todo el amor que me has enseñado a dar a los demás. Te amo infinitamente.

A mi hermana Paty, que ha sido mi cómplice desde que nací, mi compañera, amiga y socia de la vida. Gracias por enseñarme lo hermoso que es tener a un ser humano radiante y pleno a mi lado. Te admiro enormemente pero te amo aún más.

A mí cuñado Oscar, porque desde que me conoces has creído en mí como persona y como médico. Porque en ti veo a un hombre dedicado, inteligente y que ha hecho feliz a mi hermana y porque nos regalaste dos pedacitos de cielo, Sofi y André. Gracias por siempre estar ahí para nosotros. Te quiero muchísimo y siempre contarás conmigo.

A mis sobrinos Sofi y André que cuando puedan leer estas palabras sabrán que tienen a una tía inmensamente orgullosa de ustedes, que el solo ver sus caritas y su sonrisa hacen que mis días sean mejores y que han sacado lo mejor de mí. Los adoro mis hermosos sobrinos y siempre, no importa que pase, ni lo que hagan, siempre los voy a amar y a cuidar.

A mis abuelos: Ángel, Esperanza, Amelia y Salvador por darme unos papas extraordinarios. Mil palabras no bastarían para agradecerles todo su apoyo, cariño, comprensión y consejos, aquí en la tierra y en el cielo siempre los recordare.

A mis maestros de la carrera y de la vida:

Dr. Enrique Caro Osorio, por toda su sabiduría, experiencia y cariño. Gracias por dejarme conocer a un ser humano maravilloso, un verdadero amigo.

Dr. Jorge Ocampo Candiani gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de ser mejores en la vida. Gracias por ser mi apoyo incondicional durante la especialidad. Mi admiración y cariño siempre

Dr. Ernesto Torres López por su paciencia, alegría y experiencia durante mis años de formación, sin usted a mi lado no lo hubiera

logrado, con toda mi alma agradezco que sea parte de mi vida hoy y siempre.

Dr. Julio Salas Alanís por ser siempre tan alegre y optimista, por siempre ayudarme y apoyarme para ser mejor alumna y mejor ser humano. Gracias por siempre hacerme sonreír.

Dr. Osvaldo Vázquez por sus consejos, comprensión y enseñanza. Gracias por compartirnos tus tesoros dermatológicos, mi admiración siempre.

Mi vida es mejor gracias a ustedes, espero siempre hacer que estén orgullosos de mí.

A Pilar Morales por ser una gran amiga, un ser humano fascinante lleno de virtudes y por enseñarme el verdadero valor de la amistad. Mi admiración y cariño siempre.

Por último pero no menos importantes a mis queridos amigos: Lorena Tamez, Alejandra González, Liliana Acuña, Eduardo Pérez, Arturo Regalado, Angelina Espino Barros, Carolina Ramírez, Padre Juan de Dios, Yessica Salazar, Yanira Leon. Todos ustedes han hecho que mi vida valga la pena, por los buenos y malos momentos, por las risas, por las lágrimas y porque siempre han estado ahí para mí.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I

Página

1. RESÚMEN.	1
------------------	---

Capítulo II

2. INTRODUCCIÓN.	4
-----------------------	---

Capítulo III

3. OBJETIVOS.	31
--------------------	----

Capítulo IV

4. HIPOTESIS.	32
--------------------	----

Capítulo V

5. MATERIAL Y MÉTODOS.	34
-----------------------------	----

Capítulo VI

6. RESULTADOS.....	51
--------------------	----

Capítulo VII

7. DISCUSIÓN.....	93
-------------------	----

Capítulo VIII

8. CONCLUSIÓN.....	98
--------------------	----

Capítulo IX

9. ANEXOS.....	100
9.1 Carta consentimiento informado.....	100
9.2 Carta aceptación de comité de ética e investigación.....	101

Capítulo X

10. BIBLIOGRAFÍA.....	102
-----------------------	-----

Capítulo XI

11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO..... 106

INDICE DE TABLAS

Tabla

	Página
1. Escala clínica de infección ocular (HSV-1)	46
2. Escala clínica de infección vaginal (HSV-2)	49
3. Características de los pacientes.	52

INDICE DE FIGURAS

Figura

	Página
1. Lesiones herpéticas en cavidad oral	17
2. Lesiones herpéticas en labios	18
3. Lesiones vesiculares sobre base eritematosa	18
4. Lesiones herpéticas exulceradas en glande	19
5. Lesiones vesiculares sobre base eritematosa	19
6. Lesiones exulceradas	20
7. Esquema de la metodología para el modelo experimental	41
8. Laboratorio de Inmunología	43
9. Manipulación correcta de los ratones	43
10. Esquema modelo experimental de queratoconjuntivitis	45
11. Esquema de trabajo para el modelo experimental vaginal	48
12. Valoración clínica diaria del área genital de los ratones infectados . .	50
13. Concentrado de aislados de HSV-1 por escala clínica y días.	69
14. Concentrado de aislados de HSV-2 por escala clínica y días.	70
15. Duración de la supervivencia de los ratones (ocular).	77
16. Duración de la supervivencia de los ratones (vaginal)	78
17. Virulencia entre cepas	79
18. Iconografías de los aislados clínicos de VHS-1 y supervivencia	80
19. Iconografías de los aislados clínicos de VHS-1 y supervivencia	81
20. Iconografías de los aislados clínicos de VHS-2 y supervivencia	85
21. Datos descriptivos del tipo de herpes encontrado en pacientes	86
22. Análisis estadístico muestra número de infecciones	87

23. Análisis estadístico muestra tratamientos previos.	88
24. Descripción de los medicamentos consumidos	89
25. Análisis estadístico muestra comorbilidades	90
26. Análisis estadístico muestra títulos virales	92

LISTA DE ABREVIATURAS

VHS: Virus de Herpes Simplex

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VVZ: Virus de Varicela Zoster

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

LCR: Líquido cefalorraquídeo

ACV: Aciclovir

FMV: Famciclovir

TK: timidincinasa

LLA: Leucemia Linfocítica Aguda

PTI: Púrpura Trombocitopénica Idiopática

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

SNC: Sistema Nervioso Central

CPE: Citopatogenicidad

CAPITULO I

RESUMEN

Cynthia Mendoza Rodríguez

Fecha de obtención de grado

Octubre 2020

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

“Estudio del patrón de virulencia de aislados clínicos de pacientes con infección activa por Herpes Simplex Virus, en dos modelos experimentales”

Candidato para obtener el grado de

Doctor en Medicina

Área de estudio: Dermatología

RESUMEN

Introducción: Las infecciones virales como el herpes simplex virus son de importancia médica y representan un desafío para los médicos, manteniéndose al mismo tiempo como prioridades de trabajo en el campo científico.

Objetivo: Este estudio se realizó para evaluar el desarrollo del efecto de virulencia de aislados clínicos de pacientes con infección activa por herpes virus en dos modelos experimentales.

Materiales y métodos: Con un diseño experimental, observacional, comparativo. La población de estudio fueron pacientes que acudieron a la consulta de Dermatología del Hospital Universitario de Monterrey, Nuevo León en un periodo de 1 año. Los aislados se obtuvieron por muestreo de las lesiones dérmicas usando hisopos de alicate y colocándose en solución amortiguadora. Las partículas virales fueron aisladas en un cultivo de infección celular usando células Vero, los cultivos positivos a la infección fueron confirmados por PCR para ambos virus. Se obtuvieron concentrado virales y se realizó la infección ocular y vaginal en ratones BALB/c, realizándose la evaluación clínica diaria por medio de escalas clínicas ya establecidas comparándose con las cepas control KOS y G.

Resultados: Durante el periodo de estudio se revisaron 10 aislados clínicos de VHS-1 y 2 aislados clínicos para VHS-2. Se obtuvieron 4 cepas de VHS-1

altamente virulentas, pero sensibles a Aciclovir (ACV) y ningún aislado de VHS-2 virulento aunque sensible a ACV.

Conclusiones: En este estudio se muestra la existencia de aislados clínicos virulentos para VHS-1 pero no virulentos para VHS-2. Esta investigación es la primera en su clase en nuestro país, abriendo la pauta a estudios en otras zonas regionales en el país.

Palabras claves: Herpes simplex virus, virulencia, modelo experimental, estudio epidemiológico

CAPITULO II

INTRODUCCION

CARACTERISTICAS GENERALES

La historia de la familia *Herpesviridae* se remonta aproximadamente 2,000 años cuando el médico romano Herodotus describió una erupción “herpética” que aparecía alrededor de la boca y se relacionaba a crisis febriles (1). Sin embargo el término propio de “herpes” aparece por primera vez 2,500 años a.C. y viene del griego que significa “reptar” por las clásicas manifestaciones clínicas de esta entidad (2). Ya en 1736 los médicos franceses describían el herpes genital y en 1893 se identifica por primera vez como una enfermedad de transmisión sexual y es solo hasta 1968 que se distingue entre el Virus Herpes Simplex 1 (VHS-1) y el Virus Herpes Simplex 2 (VHS-2) por sus bases antigénicas y sus características biológicas (1).

La familia Herpesviridae se divide en tres subgrupos:

1. Los alfa herpesvirus, son neurotrópicos de rápida replicación y de amplia infección (VHS-1, VHS-2 y virus de la Varicela-Zoster)

2. Los beta herpes virus se replican lentamente (Citomegalovirus)
3. Los gamma herpesvirus son linfotrópicos (virus del Epstein Barr) (3)

Los herpesvirus se encuentran ampliamente diseminados en la naturaleza y han evolucionado para lograr una efectiva adaptación al ser humano. Estos virus se caracterizan de otros de su familia por tener un ciclo de replicación corto, una eficiente destrucción de las células infectadas (ciclo lítico) y una capacidad de establecer latencia (ciclo de latencia), principalmente en los ganglios sensoriales (2).

Los virus VHS-1 y VHS-2 de la familia alfa son especialmente identificados por ser viriones grandes (150-250nm) además por su núcleo que contiene doble cadena lineal de ADN, una cápsula icosaédrica de 110nm aproximadamente de diámetro, una matriz proteica formada por glicoproteínas la cual es su cubierta externa derivada de porciones de membranas nucleares y citoplasmáticas de las células previamente infectadas, las cuales aparecen proyectadas hacia el exterior de su cubierta (4). El VHS codifica 11 glicoproteínas y cada una de ellas tiene una serie de funciones importantes para la patogénesis de la infección, por ejemplo las glicoproteínas 6,D,H y L son responsables de la unión y penetración de las partículas víricas en las células. Otras como las glicoproteínas E son receptoras Fc, y las glicoproteínas C tienen actividad de unión al fragmento C3b del complemento. La porción Fc de la inmunoglobulina G se une al

complejo gE/gI, camuflando así al virus y a las células infectadas por este, reduciendo de esta manera la efectividad de los anticuerpos (1).

El genoma completo de ambos virus es lineal y consiste en dos regiones de secuencia única, cada una de las cuales está unida por elementos pares repetitivos. Codifica cerca de 75 a 80 proteínas, entre ellas se encuentran proteínas de unión de ADN para la transcripción y replicación. También codifica enzimas necesarias para suministrar sustratos para la replicación del genoma vírico (5).

Al diferenciar los dos tipos de virus herpes 1 y herpes 2 se sabe que comparten cerca del 50% de homología genética, tropismo tisular y sintomatología de enfermedad, además ambos son capaces de persistir de manera latente. Se cree por esto que ambos virus provienen de un ancestro común (proto-herpes) ocho millones de años atrás. También es importante establecer que ambos virus pueden causar tanto herpes oral como genital, la diferencia está en que VHS-1 establece latencia en ganglio trigeminal y clínicamente recurre en labios o cara, mientras que VHS-2 generalmente reside en los ganglios sacros por lo tanto recurrirá en área genital. Este último virus cobra importancia al identificarse como factor predisponente para contraer VIH-SIDA (1)(6).

Por otro lado una de las mayores diferencias entre VHS-1 y VHS-2 es que la encefalitis por VHS-2 es extremadamente rara por lo que es más probable que VHS-1 cause encefalitis herpética, excepto en neonatos e inmunosuprimidos. Cuando esta condición se presenta en neonatos es

consecuencia de una transmisión perinatal y representa una enfermedad devastadora y fatal (7).

El ciclo biológico del herpes virus inicia con la primoinfección, la cual es el primer contacto con el hospedero. Generalmente se produce de manera asintomática, aunque en algunas situaciones pueden generarse lesiones típicas vesiculares en los lugares de la primoinfección, estas manifestaciones cuando ocurren suelen ser más intensas en síntomas que las infecciones ya recurrentes debido a que el organismo monta una respuesta inflamatoria mayor (1).

Habitualmente durante el primer contacto el virus infecta a través de una ruta neural, donde entra en contacto con superficies mucosas o heridas de la piel. En esta fase el virión se une a la superficie de la célula fundiéndose en su membrana y penetrando en la misma con el ingreso de la nucleocápside que migra hacia el poro nuclear. Posteriormente se libera el ADN viral en el nucleoplasma, la permanencia y preservación de este ADN viral se debe en gran parte a la inhibición de las macromoléculas celulares (3).

La transcripción del genoma viral ocurre a través de una ARN-polimerasa II pero participan en todo momento factores virales de replicación. El ADN viral consiste en dos secuencias una L y una S ambos pueden invertirse por lo que este ADN consistiría en 4 segmentos. La transcripción completa ocurre en tres fases iniciando con los genes inmediatos-tempranos, tempranos y tardíos, uno seguido de otro. La mayoría de estas proteínas

están involucradas en el metabolismo de nucleótidos y en la síntesis del ADN viral. Los productos de la síntesis de los genes tardíos son básicamente proteínas estructurales que incluyen cápside, glicoproteínas y proteínas del tegumento (3).

Posteriormente el ensamblaje del virión tiene lugar en el núcleo gracias a una cápside preformada y por último la liberación se realiza a partir de la migración de viriones del espacio perinuclear hacia el espacio extracelular ya sea por fagocitosis reversa o por disrupción de la membrana plasmática (1).

Una característica de la infección por virus del herpes es que la célula infectada no sobrevive, debido a que desde el comienzo del ciclo reproductivo viral, ocurren alteraciones bioquímicas y estructurales que conducen irremediablemente a la lisis celular (6).

La importancia biológica del VHS es su habilidad para infectar neuronas de esta manera adquiere su potencial de recurrencia. Las propiedades que confieren al virus su capacidad de infección y virulencia son:

- Neuroinvasión: es la habilidad del virus para invadir neuronas cerebrales
- Neurovirulencia: es la habilidad de replicarse y destruir las células neuronales el cerebro
- Latencia: habilidad del virus para permanecer en una forma no replicativa en las neuronas de los ganglios dorsales y en el sistema nervioso autónomo.

Después de la inoculación de la piel o mucosas el virus pasa por el proceso de replicación antes de entrar a los ganglios dorsales de las neuronas sensoriales. De aquí es transportado de los nervios terminales a través de los axones en una dirección retrograda hacia el cuerpo celular neuronal, en donde establece su fase de latencia de por vida. 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 mucosas (8).

Los productos genómicos expresados durante la fase de latencia son los llamados transcritos asociados de latencia (LATs), existen tres formas: 8.3 kb, 2.0 kb y 1.5 kb.

La última fase biológica del virus lo constituye la reactivación, existen una gran variedad de estímulos que pueden inducir cambios en el estado fisiológico de la neurona y así reactivar una infección latente:

1. Afección primaria de la neurona ganglionar como lo serían los traumatismos neuronales, neurectomía o alteraciones en el entorno celular
2. Acción sobre el epitelio inervado, como sería el efecto de rayos ultravioletas, sol, laser ablativo, quimioexfoliación o incluso abrasiones cutáneas.

3. Intervención sistémica en situaciones como pre-menstruación, medicamentos inmunosupresores e incluso alteraciones emocionales como ansiedad, estrés o depresión.

Las infecciones recurrentes se caracterizan por ser menos graves, más localizadas y de menor duración que los episodios primarios, esto se debe a que el huésped ya genero respuesta inmunitaria de memoria (5).

En cuanto a la virulencia del VHS se puede identificar muy claramente un efecto de evasión inmune, esto debido a que el virus provoca una respuesta inmunológica del huésped mediada por el sistema inmune humoral, a nivel de los anticuerpos circulantes y también por la respuesta inmune celular, incluyendo linfocitos T citotóxicos, T ayudadores y células T de memoria. El valor de cada uno de ellos depende en gran medida de la ruta de infección utilizada por el virus. Como parte del proceso entre el huésped y el virus, el VHS ha desarrollado una serie de mecanismos para escapar o evadir de la vigilancia del sistema inmune, lo que explica por qué existe tanta prevalencia del virus en la población. Los linfocitos T CD8 se encargan de reconocer las células infectadas a través de los antígenos virales expuestos por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I). El VHS inhibe el transporte de estas moléculas a la superficie celular mediante la unión de polipéptidos virales ICP47, evitando así la activación de los linfocitos T sobre las células ya infectadas (4).

Por otra parte las células B juegan un papel importante en la defensa humoral con la producción de anticuerpos contra VHS, además de participar

en la respuesta humoral adquirida al funcionar como células presentadoras y activar a los linfocitos CD4+. El VHS bloquea la formación del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, de esta manera interfiere con la habilidad de las células B para presentación del antígeno viral y activar las células linfoides CD4+, provocando una evasión inmune humoral de especial relevancia en las infecciones primarias. Además se ha descrito que inhibe el complemento y el dominio Fc de las IgG mediante las glicoproteínas E y C. Este virus ha desarrollado, de manera aditiva, mecanismos para evitar la respuesta inmune innata que se presenta en las primeras etapas de la replicación viral, ya que interfiere con la activación de las células natural killer durante la infección viral, además genera la supresión del reciclado de las moléculas CD1 (9).

Existen varias regiones del genoma del VHS que están relacionadas con la virulencia del virus. Estas regiones incluyen las que contienen el gen de la timidín-quinasa(*tk*), el gen de la ADN polimerasa(*pol*), secuencias dentro de las repeticiones internas y secuencias entre las unidades mápicas 0.25 y 0.53. Un transcrito en las repeticiones largas, neural específico LAT, asociado a la latencia y la proteína ICP34.5 del VHS-1 la cual es esencial para la virulencia de este tipo de herpes. En las células infectadas esta proteína previene el arresto en la translación y la activación de los interferones regulatorios del factor 3 y las vías de señalización de las citocinas. Además de bloquear la maduración de las células dendríticas que iniciarían la respuesta adaptativa inmune (10).

EPIDEMIOLOGIA

El virus del herpes simplex es la primera causa de úlceras genitales en países en desarrollo y subdesarrollados. Se calcula que existen cerca de 20 millones de casos en el mundo. La prevalencia se reportan para VHS-2, en Estocolmo de 30.9%, mientras que en Inglaterra en un 22.7%; se estima que en la población general las cifras van de 7.6% en hombres y 12.4% en mujeres. Estadísticas de los Estados Unidos revelan un porcentaje del 22% en la población adulta, mientras que en España se reporta un 4% en la población general y hasta un 25% en las clínicas de atención a enfermedades de transmisión sexual (11). Las tendencias significativas epidemiológicas apuntan a una clara repetición periódica en especial en los reportes de los Estados Unidos, esto se refleja en cifras de una década de investigación en donde para los años 80 se demostraba un fuerte crecimiento de la epidemia, mientras que a finales de la década de los 90 se demostró una disminución de la seroprevalencia de VHS-2 sobre todo en grupos de menores de edad, pasando de un 21% en 1988 a un 17% en 1999. En cuanto al VHS-1 también se observó un ligero descenso pasando de un 62% hasta un 57.7% en los mismo periodos (12).

Sin embargo y a pesar de los múltiples programas a nivel mundial sobre prevención de las enfermedades de transmisión sexual, en diversos reportes se ha podido constatar la tendencia en aumento del VHS. Así por ejemplo se reporta que la prevalencia en la población general adulta en África Sub-Sahariana va desde el 30% al 80% en las mujeres y del 10% al

50% en los hombres. En esta región del mundo en donde la prevalencia ha ido en aumento y es fundamental en los programas de prevención, se han hecho múltiples esfuerzos para documentar el movimiento en las estadísticas del herpes, es por esto que en Nigeria se realizó un estudio en donde se recolectaron muestras serológicas de individuos que acudían a la consulta de enfermedades de transmisión sexual en un Hospital Universitario, encontrándose una prevalencia del 87% , estas cifras coinciden con lo reportado en estudios multicéntricos de 4 ciudades Africanas: 90% en Cotonu, República de Benin, 84.1% en Yaounde, Camerún, 93.9% en Kisumu, Kenia y 87.7% en Ndola, Zambia (13). Estas estadísticas demuestran que la prevalencia en especial de VHS-2 y de úlceras genitales ha ido en aumento en las últimas 2 décadas, haciendo de este tema una de las preocupaciones de salud más importantes en países en donde el VIH se ha reportado de mayor adquisición al tener antecedentes de infecciones por VHS. Por otra lado es importante resaltar que no todas las estadísticas demuestran este aumento exponencial, reportes como los de India en un estudio realizado en mujeres embarazadas que acudían a la consulta de obstetricia del Hospital Gubernamental de Jammu, se demostró una seroprevalencia del 7.5%, compatible con otros estudios del mismo país en donde se encontraron cifras entre 11.3% y 13.3%, muy inferiores a las reportadas en países Asiáticos (10%-30%) y en aquellos Africanos ya mencionados (14).

Otro estudio en población estudiantil de la universidad de Kazeroun en Irán se demostró una seroprevalencia para VHS-1 de 79.2% y para VHS-2 del

23.3% , estas cifras fueron mayor en mujeres con un 29% que en hombres con un 17.5% para VHS-2 (15).

En América los reportes en poblaciones latinas son pocos y existe aún escasa estadística sobre el comportamiento de este virus. En Cuba por ejemplo un estudio realizado a pacientes de la unidad de hemodiálisis en el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, se observó una seroprevalencia del VHS en un 95% en esta población (16).

En México se realizó el primer estudio en esta materia en tres poblaciones de la ciudad capital, el primer grupo fue de mujeres con cáncer de mama, el segundo grupo mujeres con cáncer cervical y el tercero mujeres de la población general; obteniéndose los siguientes resultados: en el primer grupo se mostró una prevalencia del 22.6%, el segundo de 46.8% y el tercero de 29.3%. Se demostró además que las variables asociadas a la seropositividad eran la edad creciente, aumento en el número de parejas sexuales y tener cáncer cervical, además del inicio de actividad sexual antes de los 21 años (17). A la par se realizó un estudio en dos hospitales Mexicanos de pacientes que acudían a la consulta general de Ginecología, en el primer hospital se reportó una seroprevalencia para VHS-2 de 28.3% y para el segundo hospital de 18.1% (18). Esto demuestra que en México se tienen cifras por debajo de las encontradas en África o Estados Unidos, sin embargo es necesario actualizar estos datos e incluir más estados de la república. Para nuestro país, al igual que en el resto del mundo, las infecciones como el herpes han cobrado importancia ya que se sugiere que

la presencia de lesiones causadas por el virus del herpes tipo 2 facilita la transmisión del VIH. Y ya que el VIH/SIDA se ha convertido en un serio problema de salud ya sea como una vía de acceso y susceptibilidad para contraer esta infección o como una mera cuestión oportunista con todas sus complicaciones que esto genera, el herpes virus es un tema relevante para los programas de prevención y tratamiento de ambas enfermedades (19).

Por ultimo en Chile se obtuvieron cifras de seroprevalencia en un 43% de las pacientes clínicamente diagnosticadas con herpes genital en el año de 2003 (20).

MANIFESTACIONES CLINICAS

Las manifestaciones por VHS dependen mucho del sitio de infección y como se mencionó anteriormente también depende de la inmunidad del huésped. Se describe que la primoinfección es generalmente asintomática, aunque también se pueden presentar casos en donde es más severa y frecuentemente tiene síntomas sistémicos con mayores datos de complicaciones que las recurrencias. La primoinfección por VHS-1 es generalmente asintomática pero puede presentarse como gingivoestomatitis y faringitis, la cual es muy frecuente en niños menores de 5 años y en algunos adultos. El periodo de incubación oscila entre los 2 y 12 días después del contacto infectante, posteriormente se desarrolla fiebre y dolor faríngeo, se pueden observar incluso edema y eritema en el área. Poco tiempo después de describen las clásicas vesículas sobre base eritematosa en mucosa oral y faríngea (Figuras 1, 2 y 3), rápidamente se ulceran y

crecen de tamaño, es frecuente que involucren paladar blando, mucosa bucal, lengua y piso de la boca (Figura 2). Las lesiones se pueden extender a labios y resto de boca. El paciente refiere siempre un dolor intenso y odinofagia con asociación de alitosis. Es también muy frecuente encontrar adenopatías cervicales. En esta fase se debe hacer el diagnóstico diferencial de otras faringitis como las estreptocócicas, herpangina en niños, estomatitis aftosa, síndrome de Stevens-Johnson o Mononucleosis Infecciosa, en donde la fiebre tiende a ceder en 3 a 5 días y la resolución total del cuadro es en 2 semanas (1).

La infección por VHS-2 es usualmente una enfermedad de transmisión sexual. Y tanto el VHS-1 como el VHS-2 pueden ser la causa del herpes genital y esto dependerá mucho de las prácticas sexuales de los individuos afectados, sin embargo se describe mucho más frecuente el tipo 2 en esta enfermedad. Como en el caso del VHS-1 las primoinfecciones son asintomáticas, sin embargo cuando se presentan las lesiones típicamente son vesículas claras sobre una base eritematosa que en la literatura se describen como una gota de rocío sobre un pétalo de rosa (Figuras 4, 5 y 6). Son lesiones que tienden a la diseminación y son muy dolorosas en especial en genitales internos o externos. El curso natural de la infección es siempre hacia la ulceración y formación de costras con síntomas locales intensos y prolongados asociados a malestar general. Las lesiones se encuentran con mayor frecuencia en glande y prepucio. La resolución se alcanza a las 2 semanas. En hombres homosexuales las lesiones de herpes son comunes en área perianal y se pueden extender hasta conducto

rectal. Las úlceras pueden ser crónicas en pacientes VIH+. En las mujeres las lesiones clínicas son similares y ocurren en genitales externos, mucosa vulvar y cérvix. El dolor y la disuria son frecuentes. El primer episodio de herpes genital suele ser más prolongado y grave en mujeres que en hombres. Las complicaciones locales varían desde infecciones bacterianas sobre-agregadas, fimosis, adhesiones labiales, parestesias y retención urinaria (21).



Figura 1. Lesiones herpéticas en cavidad oral, se observa lesión exulcerativa y base eritematosa

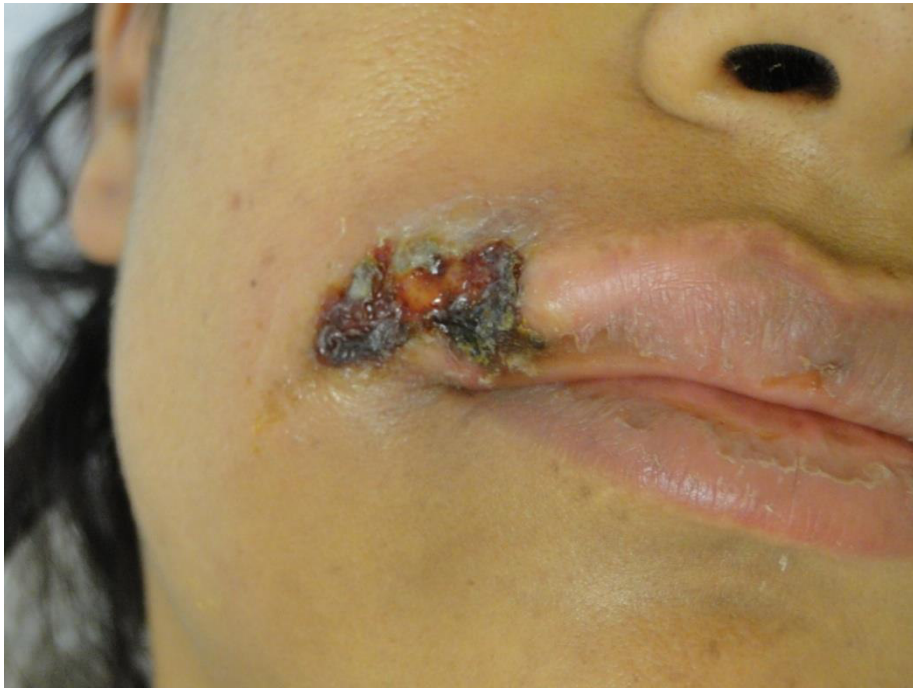


Figura 2. Lesiones herpéticas en labios.



Figura 3. Lesiones vesiculares sobre base eritematosa



Figura 4. Lesiones herpéticas exulceradas en glande



Figura 5. Lesiones vesiculares sobre base eritematosa



Figura 6. Lesiones exulceradas sobre base eritematosa

La transmisión del herpes genital se puede dar de 2 maneras: la directa que es fundamentalmente por contacto sexual ya sea genital a genital, oral a genital, genital a anal o bucal a anal. Se describe que con mayor frecuencia cuando la persona fuente de infección esta asintomática. La otra forma es la indirecta y esta es por medio de la auto-inoculación de las lesiones de una zona infectada a otra zona sana. Por ultimo puede suceder durante el paso del bebe por el canal de parto originando un herpes neonatal cuya mortalidad sin tratamiento adecuado es hasta del 80% cuando se presenta una infección diseminada al SNC, caracterizada por letargia, crisis convulsivas, distrés respiratorio, hepato-esplenomegalia con hepatitis y

trombocitopenia. Aun con tratamiento el herpes neonatal recurre con frecuencia (1)(22).

La importancia de los programas para la prevención del herpes genital están basados en los estudios que justifican inequívocamente que el VHS y el VIH pueden potencialmente interactuar de dos formas, una desde el punto de vista en donde el VIH ha dañado el sistema inmunológico y los virus herpes latentes ya no tienen esa contención por lo que se activan y reactivan causando una enfermedad oportunista. Por otro lado se postula que el herpes por sí mismo interactúa a nivel molecular para acelerar el efecto deletéreo inmunológico del VIH. Estas enfermedades son más extensas y graves que en aquellas personas sin infección por VIH o herpes (6).

Por último existe otra forma de presentación clínica: la querato-conjuntivitis la cual cuando es primoinfección causa una conjuntivitis severa y purulenta con opacidad y ulceración superficial de la córnea (21).

Las complicaciones del VHS se describen desde cefaleas con meningismo afectando el 36% de las mujeres y el 11% de los hombres hasta radiculopatías vistas en las primoinfecciones ano-genitales con retención urinaria y constipación. Las infecciones diseminadas o sistémicas son más frecuentes en pacientes inmunosuprimidos siendo la encefalitis la más frecuente y mortal (21).

Las infecciones recurrentes cuando es herpes labial está casi siempre precedido por síntomas como dolor, sensación quemante y prurito, estos

duran aproximadamente entre 24 y 48 horas antes de la aparición de las clásicas vesículas que suelen aparecer en el borde externo del labio y son muy dolorosas. Las lesiones evolucionan a vesículas, costras y curan sin dejar cicatriz. La infección ocular puede recurrir como una queratitis o como querato-conjuntivitis, unilateral, con ulceración dendrítica o con involucro estromal y pérdida de la sensibilidad corneal. Con frecuentes recidivas se puede producir una pérdida gradual de la visión es por esto que todo paciente debe ser visto por un oftalmólogo en cada caso. Las lesiones genitales cuando son recurrentes se asocian a sintomatología menos severa y con menores cuadros clínicos. Al igual que en otras áreas afectadas previo al brote de vesículas existe dolor local, prurito y sensación urente en el área genital, en las mujeres las lesiones se encuentran en labios mayores, menores y periné; en los varones las lesiones están más en glande y prepucio. La curación es de 10 días aproximadamente (3).

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la infección por VHS se basa en un buen interrogatorio, observación de las lesiones clásicas y el uso de varias técnicas diagnósticas. Entre ellas se encuentra la citología o prueba de Tzanc, la cual se usa para observar las células obtenidas de la base de las vesículas, se tiñen con colorantes de Wright o Giemsa y se observa al microscopio obteniéndose las típicas células con abalonamiento citoplasmático y las inclusiones intracelulares tipo Cowdry A, este método tiene una sensibilidad

de solo el 50 a 70% comparada con otras técnicas. Además se puede establecer con relativa rapidez la presencia de VHS mediante la demostración de antígenos ya sea por inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa o se puede obtener ADN del virus en la biopsia o en la extensión de Tzanc para hibridación *in situ* (23).

Otra forma de diagnóstico es por medio de la serología de anticuerpos de tipo IgM específicos para la infección activa que presenta lesiones vesiculares clásicas, esta IgM desaparece a los 3 o 6 meses. La serología para IgG específicos persistirá elevada toda la vida del individuo y esto indicara que la persona ha sido infectada. La serología no es útil para diagnosticar una infección recurrente ya que esta suele cursar con escaso aumento de los títulos de anticuerpos. Para esto se puede utilizar técnicas como ELISA, reacción de neutralización, enzimoimmunoanálisis indirecto, test de aglutinación o Western Blot (4).

El aislamiento del virus en cultivo celular es el método estándar y más sensible para detectar por laboratorio la infección por VHS, de la misma manera el tener el agente causal aislado permite realizar tipificación y sensibilidades *in vitro*. El VHS tiene un efecto citopático en una gran variedad de líneas celulares embrionarias humanas y líneas diploides humanas. Otras líneas celulares son las Hep-2 y Vero las cuales son muy utilizadas por su comodidad y fácil acceso, además de ser permisivas para la infección de virus herpes. El efecto citopático del virus se observara dependiendo de la carga viral, al cabo de uno o tres días en las células

infectadas provocando una granulación citoplasmática con aumento del tamaño de las células, separándose de la monocapa y destruyéndose (24).

Otra forma de demostrar la infección herpética es por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a través de la detección del genoma viral, mediante la cual pequeñas cantidades de ADN viral se amplifica de manera enzimática, esta forma es muy sensible y altamente específica, superando incluso el cultivo viral. Por último la tipificación de los aislados de herpes virus se puede realizar con endonucleasas de restricción del ADN las cuales son únicas para VHS-1 y VHS-2 (4).

TRATAMIENTO

En la actualidad existen varios fármacos antivirales para tratar el VHS y la indicación para el uso de cada uno de ellos dependerá del sitio, severidad, cuadro clínico, patologías asociadas y resistencias. Entre los fármacos usados con actividad antiherpética están el Aciclovir, Valaciclovir y Famciclovir, los cuales son análogos de nucleósidos que interfieren con la síntesis del ADN. También se cuenta con el Foscanet, el cual es análogo orgánico del pirofosfato inorgánico el cual inhibe la replicación de todos los herpesvirus in vitro (1).

El Aciclovir es el fármaco de elección en el manejo de las infecciones por herpes virus en especial en pacientes con lesiones genitales y en inmunosuprimidos en donde el cuadro clínico suele ser severo y si no se

trata a tiempo el curso es mortal. El tratamiento con este medicamento ha demostrado ser efectivo en las recurrencias y la supresión de la infección acelerando la resolución de las lesiones activas y reduciendo considerablemente el dolor. Sin embargo el Aciclovir no modifica la fase de latencia, ni modifica la respuesta inmune. Es por esto que en algunos pacientes graves se decide el uso de Aciclovir indefinidamente ya que su efecto curativo se mantendrá mientras se siga administrando este fármaco.

La dosis recomendada para las primoinfecciones es de 200mg 5 veces al día por 5 a 7 días, la posología intravenosa es de 5mg/kg en infusión de 8 horas y hasta doblar la dosis en casos de herpes neonatal (60mg/kg/día dividida en tres dosis por 2 o 3 semanas). En caso de recurrencias frecuentes se recomienda 400mg 2 veces al día por 3 a 6 meses observándose una buena reducción en las recaídas y la cronicidad. Es un fármaco muy estable ya que solo se activa en las células infectadas por lo que se puede usar con fines profilácticos. En cuanto a su presentación tópica es recomendada en queratitis herpética, en erupciones recurrentes de herpes labial e incluso en la primoinfección de herpes genital, sin embargo su acción no es tan efectiva como lo es por vía oral y en algunos estudios su acción se ha visto poco efectiva (21).

El Famciclovir es un análogo de la guanosina y pro-fármaco del Penciclovir, el cual es estructuralmente similar al Aciclovir. Una vez que se ha absorbido se transforma rápidamente en Penciclovir en el hígado e intestino, su mayor utilidad está en el tratamiento de las infecciones por herpes que sean

recurrentes y en la supresión de las infecciones crónicas recurrentes. La dosis para supresión es de 125mg tres veces al día o 250mg dos veces al día.

El Valaciclovir también es un fármaco usado para las recurrencias o en la profilaxis para evitar la reactivación y diseminación en pacientes que se van a someter a procedimientos quirúrgicos o estéticos, especialmente en cara. La dosis recomendada es de 500mg dos veces al día, gradualmente reducida hasta encontrar la dosis mínima efectiva para cada caso en particular (1).

Por último el Foscarnet se introdujo en el arsenal terapéutico para el tratamiento de las infecciones por citomegalovirus pero también se ha demostrado su utilidad en el tratamiento de VHS y varicela-zoster especialmente en aquellas infecciones resistentes a Aciclovir. Este fármaco es exclusivamente administrado por vía intravenosa y es altamente toxico a nivel renal, por lo que su uso es restringido (21).

Uno de los temas abordados con frecuencia es la resistencia actual de estos antivirales lo cual es un problema potencial y un claro nicho en el mercado de los nuevos agentes antivirales. El tema de la resistencia a los antivirales ya era un tema conocido desde la década de los 80, en donde se mostraba las implicaciones que podían tener las infecciones herpéticas resistentes en pacientes con VIH/SIDA. Se demostró por lo tanto el aislamiento de cepas resistentes a Aciclovir y se identificó que estas no estaban relacionadas con pacientes inmunocompetentes (25).

Se describen dos formas de resistencia: la primera es relacionada a la Timidincinasa (TK) viral alterada o deficiente y la segunda asociada a una alteración en el DNA polimerasa. De esta manera los aislados resistentes a Aciclovir por este primer mecanismo lo serian también a Ganciclovir, pero in vitro se muestran sensibles frente a Vidarabina y Foscarnet. Sin embargo, solo se muestra eficacia in vivo con el Foscarnet. En nuestro país recientemente se realizó un estudio en donde se valoraron cepas del noreste de México para identificar la existencia de resistencia a fármacos anti herpéticos, no encontrándose aislados de pacientes con infección herpética resistentes a Aciclovir, tomando un valor de referencia de $IC_{50} > 3 \mu\text{g/ml}$ (26).

Por otro lado la creciente prevalencia de la infección por herpes virus ha llevado al desarrollo de vacunas que previenen y atenúan la enfermedad, sin embargo no previenen la infección. La meta de las nuevas investigaciones en la vacuna contra el herpes es la de inducir una respuesta inmune que sea equivalente a la inducida por el organismo durante la fase de recuperación de la infección, la cual ofrece protección a largo plazo.

La vacuna *d15-29* contra el virus herpes simplex 2 (VHS-2), responsable del herpes genital, y desarrollada por un equipo del departamento de Microbiología y Genética Molecular de la Harvard Medical School, de Boston (Estados Unidos), ha obtenido resultados superiores a los de las otras dos candidatas (una de las cuales ya había sido probada en humanos). Estos resultados son lo suficientemente llamativos como para

trasladar la experimentación con la *d15-29* a humanos. La *d15-29* es especialmente prometedora porque resuelve el problema que hizo fracasar a las candidatas previas. En los últimos 20 años los prototipos de vacunas frente al VHS-2 se basaban en la administración de una o dos glucoproteínas de la capa externa del virus que producían una respuesta humoral. Sin embargo, el desarrollo de anticuerpos no resultó suficientemente protector de la infección del VHS-2. Por el contrario, la *d15-29* está basada en una cepa viva y mutante de la VHS-2 que carece de los dos genes necesarios para replicarse, lo que origina que las proteínas expresadas induzcan respuesta inmune pero, sin embargo, que el virus no pueda replicarse, pero si induce una respuesta protectora contra la infección por VHS-1 y VHS-2 respectivamente. Actualmente se continúa esta misma línea de investigación esperando en un futuro cercano tener la vacuna para su uso en humanos. (27).

IMPORTANCIA Y ORIGINALIDAD

Identificar los virus herpes simplex en el noreste de México causantes de dermatosis, en el caso de VHS-1 lesiones dermo-faciales y en el caso de VHS-2 lesiones en genitales, en donde se ha identificado su incidencia como un factor de alto riesgo para contraer la infección por VIH y causar SIDA ya que las manifestaciones clínicas de esta infección favorecen la transmisión de VIH. Además de identificar el comportamiento de la virulencia de las cepas en el noreste de México, estableciendo la primera pauta en la línea de investigación a nivel nacional para poder facilitar en un futuro cercano la evaluación de nuevas vacunas recombinantes lo cual representara el desarrollando de nuevas alternativas preventivas para estas infecciones virales. En el caso de las mujeres embarazadas se podrá vacunar a estas para evitar el daño, en algunos casos fatales, a los neonatos.

Los factores de virulencia pueden dividirse en tres categorías: sustancias que dañan las células tisulares, productos que inducen a las células a liberar moléculas biológicamente activas y mediadores que afectan la matriz extracelular como la interleucina1 β , prostaglandinas, factor de necrosis tumoral, interleucina 8 y factores quimiotácticos. Cabe destacar que algunos

de estos factores presentan una actividad pleiotrópica; es decir, producen más de una respuesta, ya sea inhibiendo la respuesta protectora de las células involucradas en los mecanismos de defensa, o produciendo daño directo a los tejidos.

Nuestra línea de investigación fue encaminada a determinar esta virulencia a partir de:

- 1. Supervivencia a la infección por VHS-1 en un modelo experimental de infección ocular.**
- 2. Supervivencia a la infección por VHS-2 en un modelo experimental de infección vaginal.**

A la fecha no existen reportes de la incidencia y patrón de comportamiento de las infecciones por virus herpes simplex en el noreste de México, no se tienen estadísticas ni se sabe con seguridad que tan virulentas son estas cepas en comparación con las de otras regiones. Por la misma falta de información al respecto no se ha podido evaluar vacunas recombinantes que puedan ayudar a prevenir estas enfermedades y sus complicaciones por lo que este estudio aportara nuevo conocimiento en esta línea de investigación.

CAPITULO III

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el desarrollo del efecto de virulencia de aislados clínicos de pacientes con infección activa por herpes virus en dos modelos experimentales

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Reclutamiento de pacientes con infección activa de Herpes facial y/o genital, obtención de muestras
2. Aislamiento y amplificación de partículas virales VHS-1 y VHS-2 en un modelo de infección in vitro.
4. Evaluación del efecto de virulencia del VHS-1 en un modelo experimental murino de infección ocular.
5. Evaluación del efecto de virulencia del VHS-2 en un modelo experimental murino de infección vagina

I

CAPITULO IV

HIPOTESIS DE TRABAJO

Las cepas de VHS aisladas de pacientes con infección herpética activa en el periodo del 2010 al 2011, son altamente virulentas en un modelo de infección in vivo

HIPOTESIS NULA

Las cepas de VHS aisladas de pacientes con infección herpética activa en el periodo del 2010 al 2011, **no** son altamente virulentas en un modelo de infección in vivo

POBLACION DE ESTUDIO

- Criterios de inclusión:
 - Pacientes con infección activa del virus herpes simplex 1 y herpes simplex 2, pacientes VIH positivo.
- Criterios de exclusión:
 - Mujeres embarazadas, pacientes en tratamiento con Aciclovir al momento de la toma de muestra.
- Pacientes que asistan al servicio de Dermatología del Hospital Universitario para su atención.
- Firma de carta de consentimiento informado (Anexo).
- Muestra por periodo de tiempo (2010-2011)

TIPO DE ESTUDIO

Estudio experimental, observacional, comparativo.

CAPITULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCION DE MUESTRAS

La obtención de las muestras se realizó en el servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de los pacientes que acudían a la consulta con sospecha de infección por virus del herpes y que cumplieran con los criterios de inclusión. Se les comentaba el objetivo del estudio, la forma de obtención de la muestra y se firmaba un consentimiento informado.

Se realizó la publicidad gráfica en periódicos de mayor circulación para invitar a los pacientes que tuvieran alguna sospecha de una infección herpética, que acudieran a la consulta de Dermatología.

OBTENCION DE AISLADOS CLINICOS

Posteriormente se realizó asepsia del área, rompiéndose la vesícula con aguja estéril número 25 y se realizó un raspado en la base de la lesión con

un hisopo de alginato de calcio (Fisherbrand Calcium Alginate Swabs, 14-959-77). Se colocó el hisopo impregnado del líquido de la vesícula en un criovial con solución PBS-Glucosa al 1% a 4°C. Se tomó además una muestra de sangre periférica por medio de punción venosa. Se etiquetó el vial y el tubo de suero con las iniciales del paciente y la fecha de la toma y se transportó en cadena de frío al laboratorio de Inmunología del Hospital Universitario, almacenándose a -80°C para los viales con partículas virales. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos, para separar el suero y realizarse alícuotas del mismo para almacenarlos a -20°C.

IDENTIFICACION DEL HERPES VIRUS

El siguiente paso fue la determinación de IgG e IgM anti VHS-1 y 2 por ELISA, para identificar y cuantificar la presencia de estos anticuerpos por medio del kit de ELISA semi-cuantitativo DiagMex (DiagnosticAutomation, Inc.). Se realizaron diluciones de los sueros y de los estándares según las guías del fabricante, colocándose en placa de 98 pozos. Las muestras y estándares fueron incubados a temperatura ambiente por 30 minutos, realizándose 3 lavados con solución de lavado estándar. El anticuerpo secundario anti IgG o IgM conjugado con peroxidasa fue adicionado e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron 3 lavados, se agregó el sustrato y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente, la

reacción fue detenida adicionando H_2SO_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).

CULTIVOS CELULARES

Para el cultivo celular se trabajó con la siguiente línea celular:

- Células Vero (línea celular de riñón de mono verde africano, ATCC CCL-81)

Esta línea celular se utilizó para realizar las infecciones con los aislados del virus herpes. Las células Vero fueron colocadas en frascos de 25mm^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 estreptomicina (GIBCO) y 2% de suero bovino fetal (SBF, CELLGRO), se dejaron incubando a 37°C con 5% de CO_2 y 95% de humedad relativa. Se realizó un concentrado celular en alícuotas de 1 ml mantenidas a -80°C para su uso.

En este estudio se trabajó a partir de los viales congelados y no mayor de P15 (pasaje celular 15), para ambas líneas celulares, los pasajes de las

células se realizaron a partir de un cultivo celular en frasco T-25 confluyente (aproximadamente 3×10^6 cel), posteriormente 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) a temperatura de 37°C en baño de agua.

Se incubó por 10 minutos a 37°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 tomaron 0.1ml de la suspensión celular y se realizó 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 re-suspendió en 1ml de medio, se tomó una alícuota de 10 μ l más 10 μ L de azul triptano y 60 μ L de A-DMEM en un micro tubo, la mezcla fue homogenizada y se tomó 10 μ L de esta suspensión para realizar el conteo de células con un hematocitómetro calculándose el número de células [No. de células por ml = (Células en promedio) (Factor de dilución [8]) (10,000)]. De acuerdo al conteo de células se realizaron los cálculos y el pasaje, incubando a 37°C con 5% de CO₂.

OBTENCION DEL CONCENTRADO VIRAL (STOCK VIRAL)

De esta manera se realizó el stock de las líneas celulares para posteriormente utilizarlas en nuestros modelos de infección.

Las células fueron amplificadas en frascos de 175 mm² (T-175), ya confluentes fueron cosechadas y se re-suspendieron en medio A-DMEM con 5% de DMSO, fueron ajustadas a 2×10^6 cel./ml/criovial. Se etiquetaron adecuadamente y se almacenaron a -80°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 minutos. Las células fueron re-suspendidas en 3 ml de A-DMEM para colocarlas en un frasco de cultivo T-25mm², se incubó bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas observando periódicamente el crecimiento de la mono-capa celular.

Para la obtención y aislamiento de las partículas virales a partir de los aislados clínicos, se utilizaron frascos de cultivo T-25 los cuales fueron preparados conteniendo una monocapa de células Vero en 3ml de medio A-DMEM suplementado, se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa hasta alcanzar una confluencia celular del 90%.

Posteriormente se descongelaron los crioviales que contenían las muestras clínicas obtenidas de los pacientes con sospecha de VHS, 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.

El efecto de citopatogenicidad (CPE) 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.

Para generar el concentrado viral (stock viral), que serviría para realizar los modelos experimentales se utilizó un frasco T-25 en donde se realizaron pasajes para tener un frasco de cultivo T-175 con células Vero confluentes. Al estar ya 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 y el VHS-2 cepa G como virus de referencia.

La cuantificación de las partículas virales 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 las cepas de referencia respectivamente. Se homogenizaron y 1ml fue transferido con pipeta serológica estéril a una placa de cultivo de 6 pozos con células Vero (aproximadamente 5×10^5 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 CO₂ por cuatro días. Finalizada la incubación, se realizó una tinción con Giemsa (se desechó el medio, se adicionó metanol por 5 minutos para fijar las células, posteriormente fue decantado y se agregó Giemsa por 10 minutos).

Se contaron las zonas líticas, 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.

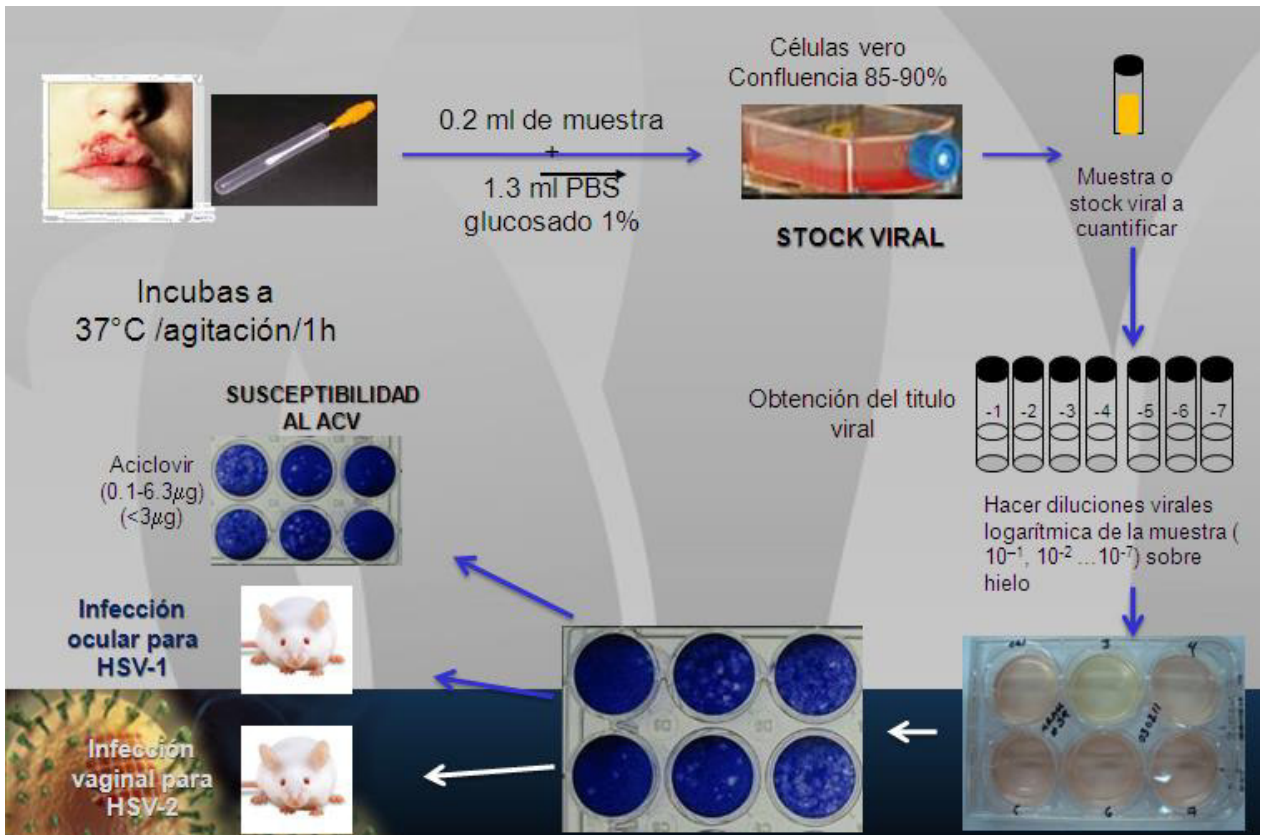


Figura 7. Esquema de la metodología para el modelo experimental en ratones

MODELO EXPERIMENTAL EN RATONES

Los modelos animales se utilizan para el estudio de la infección por VHS, sobre todo para el desarrollo de vacunas y agentes antivirales; la aproximación de estos modelos a la patogénesis en humanos presenta diferencias, sin embargo dichos modelos son sistemas únicos y válidos para el estudio de la infección por el herpes virus (30).

Las principales especies utilizadas para el análisis de la infección por el virus herpes es el ratón. Para mimetizar las rutas de infección en humanos se han desarrollado modelos de infección ocular y vaginal. En el ratón la infección sigue un curso temporal que se divide en dos fases:

- Una fase aguda: que ocurre en los primeros 10 días tras la infección
- Una fase de latencia: la cual se establece a partir de los 21 días después de la infección

Desde la fase aguda se considera que el virus tiene capacidad de virulencia e infección al producir las lesiones esperadas a nivel ocular y vaginal (31).



Figura 8. Laboratorio de Inmunología en donde se realizaron los experimentos murinos.

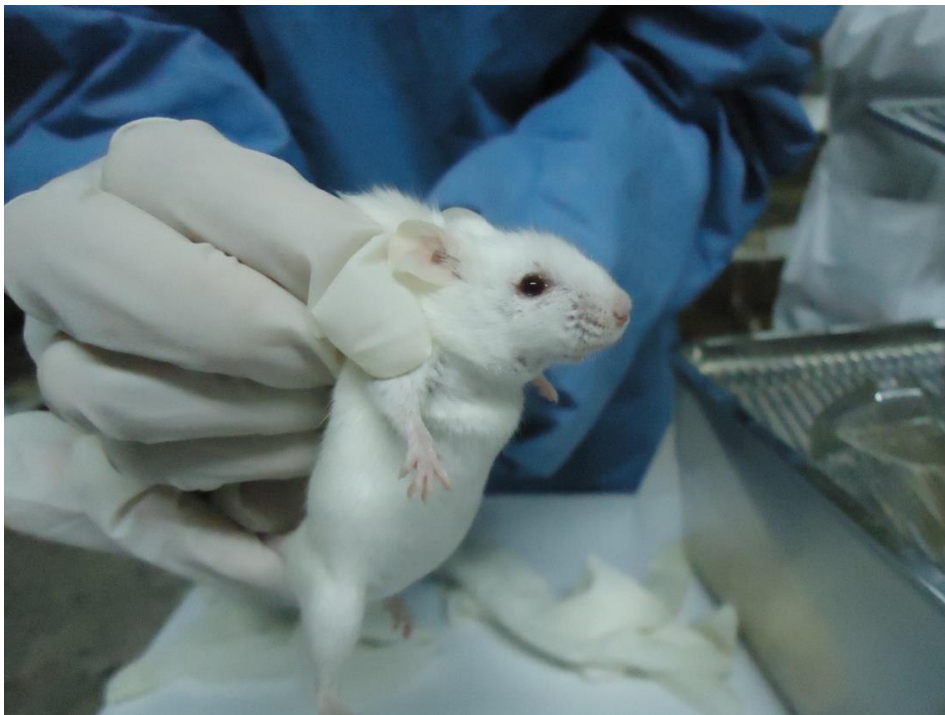


Figura 9. Manipulación correcta de los ratones.

MODELO ESPERIMENTAL DE QUERATOCONJUNTIVITUS HERPÉTICA

Todos los experimentos se realizaron según los métodos descritos en la guía para el cuidado y el uso de animales de laboratorio NIH (32).

Los animales fueron manipulados y alojados bajo las condiciones de esta norma con ciclos de luz y oscuridad alternados cada 12 horas, con agua y alimentos estándar.

Para este modelo de infección se utilizaron ratones hembra BALB/c de 6 semanas de edad y de 25 gr. cada uno, del Centro de Inmunología del Hospital Universitario de Monterrey. La cepa de ratón BALB/c se seleccionó debido a su descrita susceptibilidad a formar lesiones de queratitis (33).

Se formaron 4 grupos con 4 ratones en cada uno de ellos para cada aislado clínico a probar. Además de contar con un grupo control el cual sería infectado con la cepa KOS.

Previo a la inoculación viral, los ratones fueron anestesiados vía intraperitoneal con Xylazine (7mg/kg) y Ketamina (100mg/kg).

Posteriormente se realiza la escarificación de las corneas de ambos ojos de los ratones con una aguja de 26G y se aplica 10 µl del stock viral de los aislados clínicos positivos para VHS-1.

Se deja en observación al ratón hasta que se recupera de la anestesia y no muestras datos de complicación por la misma.

Modelo experimental de queratoconjuntivitis herpética

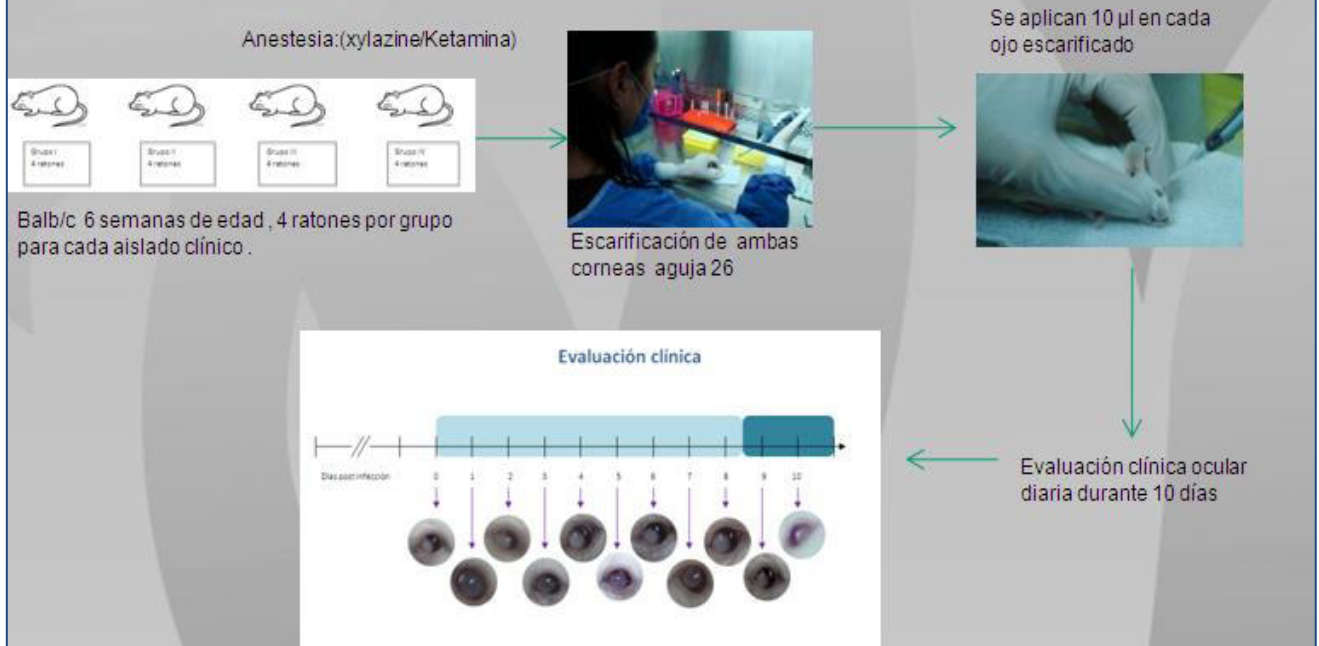


Figura 10. Esquema de trabajo para el modelo experimental de queratoconjuntivitis.

A partir de la infección ocular se llevó un registro diario mediante la observación clínica y la evaluación de las lesiones mediante la escala de queratitis ocular (28):

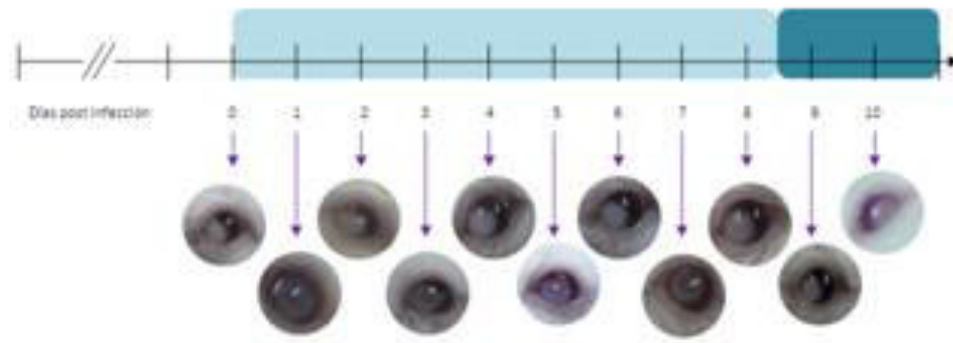
Los ojos de los ratones se evaluaron con lupa de aumento con el objetivo de encontrar datos de blefaritis o queratitis, si alguno de los ratones tenía alguna sospecha de infección se evaluaba posteriormente con oftalmoscopio.

Cada ojo recibió por separado una escala de severidad (escala de 0 a 4) como se muestra a continuación:

Tabla 1. Escala clínica de infección ocular (VHS-1)

0 = cornea normal
0.5 = lesiones puntatas
1.0 = lesiones dendríticas
1.5 = edema estromal con lesiones geográficas
2.0 = involucro estromal, pupilas e iris visible
3.0= involucro estromal, pupilas e iris invisible
4.0= queratitis severa, pupilas e iris invisible

Evaluación clínica



MODELO EXPERIMENTAL DE INFECCIÓN HERPÉTICA VAGINAL

Todos los experimentos se realizaron según los métodos descritos en la guía para el cuidado y el uso de animales de laboratorio NIH (32).

Los animales fueron manipulados y alojados bajo las condiciones de esta norma con ciclos de luz y oscuridad alternados cada 12 horas, con agua y alimentos estándar.

Para este modelo de infección se utilizaron ratones hembra BALB/c de 6 semanas de edad y 25 gr. cada uno, del Centro de Inmunología del Hospital Universitario de Monterrey.

Se formaron 4 grupos con 4 ratones en cada uno de ellos para cada aislado clínico a probar. Además de contar con un grupo control el cual sería infectado con la cepa G.

Una semana previa a la infección vaginal cada ratón fue inyectado de manera subcutánea en una de sus patas con 3mg de Medroxiprogesterona

(Depo-Provera, Pfizer) en 100 μ l de volumen. Posteriormente un día previo a la infección se repetía la dosis de Medroxiprogesterona, de esta manera se creaba el ambiente hormonal intravaginal ideal para la inoculación del herpes virus.

El día de la infección se inmovilizaba manualmente al ratón exponiendo el área vaginal y con un swab de alginato de calcio se rompía la membrana mucosa de la vagina para posteriormente inocular el virus con 5 μ l del stock viral de los aislados clínicos positivos para VHS-2.



Figura 11. Esquema de trabajo para el modelo experimental vaginal.

A partir de la infección vaginal se llevó un registro diario mediante la observación clínica y la evaluación de las lesiones mediante la escala clínica de infección vaginal (29):

El área genital de los ratones se evaluó con lupa de aumento con el objetivo de encontrar datos de lesión cutánea o datos del comportamiento del animal que indicaran infección sistémica.

La escala de severidad clínica se evaluó (escala de 0 a 5) como se muestra a continuación:

Tabla 2. Escala clínica de infección vaginal (VHS-2)

0	Ningún signo
1	Ligero edema y eritema genital
2	Inflamación genital moderada
3	Lesión genital purulenta
4	Parálisis de caderas
5	Muerte



Figura 12. Valoración clínica diaria del área genital de los ratones infectados

CAPITULO VI

RESULTADOS

DESCRIPCION DE LOS PACIENTES

Durante el periodo de recolección de aislados clínicos (2010-2011) se obtuvieron un total de 50 pacientes que acudieron al servicio de Dermatología del Hospital Universitario, con sospecha de infección por virus herpes simplex.

De cada paciente se recolecto edad, genero, tipo de herpes con su correspondiente localización, número de infecciones previas, tratamientos previos, medicamentos actuales y comorbilidades (tabla 3).

DESCRIPCION DE LOS AISLADOS CLÍNICOS

Los aislados clínicos que fueron positivos para herpes tipo 1 o herpes tipo 2 se muestran en la (tabla 3) con color verde, de cada uno de estos aislados se identificó el título viral y el IC₅₀ al Aciclovir reportado con anterioridad por el grupo de investigadores Garza V y Torres E.

Tabla 3. Características de los pacientes

Paciente	Edad	Escolaridad	Diagnóstico Probable	Infecciones Previas	Infecciones por año	Tratamientos Previos	Medicamento Actual	Comorbilidades	Título Viral
1	33	Contador Publico	HSV-1	HSV-1	1	Aciclovir Topico	Negado	Negadas	3x105 UFP/ml
4	34	Ingeniero	HSV-1	HSV-1 en 1 ocasión	0	Negado	Negado	Negadas	
5	57	Preparatoria	HSV-1	HSV-1	12	Aciclovir	Negado	Negadas	
7	27	Medico	HSV-1	HSV-1	1	Negado	Negado	Negadas	
9	32		HSV-1	HSV-1	4	Negado	Negado	Negadas	8x106 UFP/ml
10	54	Enfermera	HSV-1	HSV-1	3	Negado	Negado	Colecistectomia hace 20 años	
11	44	Enfermera	HSV-1	HSV-1	2	Aciclovir en crena	Negado	ninguna	
13	35	Comercio	HSV-1	HSV-1	2	Aciclovir Topico	Aciclovir tópico	Dermatitis Atópica	4.3x105UFP/ml
14	16	Preparatoria	HSV-1	HSV-1	12	Aciclovir Topico	Negado	Fiebre reumática	
15	24	Licenciatura Danza	HSV-1	Negadas	0	Negado	Negado	Negados	
17	29	Secundaria	HSV-1	HSV-1	3	Aciclovir Topico	Aciclovir tópico	Condilomatososis	5x106UFP/ml
18	30	Medico	HSV-1	HSV-1	2	Aciclovir Topico	Negado	Negados	7.5x105UFP/ml
24	17	Secundaria	HSV-1	HSV-1	1	Aciclovir Oral	Negado	Negados	
25	10	Primaria incompleta	HSV-1	HSV-1	0	Negado	Negado	Negados	
26	51	Quimico Clinico	HSV-1	HSV-1 Oftalmico	4	Aciclovir Oral y Tópico	Negado	Negados	7.25x106UFP/ml
27	14	Secundaria Incompleta	HSV-1	HSV-1	1	Aciclovir Oral	Aciclovir Oral	LLA	5.5x106UFP/ml
28	23	Enfermera	HSV-1	HSV-1	3	Aciclovir	Aciclovir tópico	Negados	7x105UFP/ml
29	24	Arquitectura	HSV-1	HSV-1	2	Aciclovir Topico	Aciclovir Sistémico	Negados	
34	63	Arquitectura	HSV-1	HSV-1	12	Aciclovir Sistémico	Negado	Negadas	
39	40	Licenciatura	HSV-1	HSV-1	1	Negado	Negado	Negadas	1.1x105UFP/ml
40	26	Comercio	HSV-1	HSV-1	1	Aciclovir Tópico	Aciclovir tópico	Negadas	
42	17	Preparatoria	HSV-1	HSV-1	15	Aciclovir Sistémico	Negado	Negadas	3x106UFP/ml
44	22	Licenciatura	HSV-1	HSV-1	10	Aciclovir Sistémico	Negado	Negadas	
6	36	Ingeniero	HSV-1	HSV-1	3	Negado	Aciclovir	PTI	
48	35	Secundaria	HSV-1	Negadas	0	Negado	Negado	LES+PDN+DM2+HTA	
3	32	Ingeniero	HSV-2	HSV-2	4	Aciclovir Oral 500mg qd	Aciclovir	Asma Bronquial	6x105UFP/ml
38	23	primaria completa	HSV-2	Negadas	0	Negado	Aciclovir Sistémico	DM2	
51			HSV-2			Negado	Negado	Negadas	18x106UFP/ml
2	54	Comercio	HZ	Herpes zoster	0	Negado	Aciclovir	Asma Bronquial	
8	64	Analfabeta	HZ	Negadas	0	Negado	Negado	Carcinoma Uterino	
12	24	Secundaria	HZ	Negadas	0	Negado	Negado	LES	
16	70	Primaria incompleta	HZ	Negadas	0	Negado	Negado	Negados	
19	6	Primaria incompleta	HZ	Negadas	0	Negado	Negado	Negados	
20	34	Psicología	HZ	Negadas	0	Negado	Negado	Negados	
21	54	Secundaria Completa	HZ	Negadas	0	Negado	Negado	Carcinoma de colon	
22	42	Secundaria	HZ	Negadas	0	Aciclovir	Aciclovir	Enfermedad fibroquística mama	
23	28	Medico	HZ	HSV-1	0	Aciclovir Topico	Negado	Negados	
30	63	Profesional	HZ	Negadas	1	Negado	Negado	DM2/HTA	
31	10	Estudiante	HZ	HSV-1	1	Aciclovir Sistémico	Aciclovir Sistémico	LLA	
32	28	Ninguna	HZ	DESCONOCE	DESCONOCE	Negado	Negado	SIDA+VDRL+	
33	65	Licenciatura	HZ	HSV-1	1	Negado	Negado	Antecedente Ca Recto	
35	49	Enfermera	HZ			Negado	Negado	CA mama+dermatomiositis	
36			HZ			Negado	Negado	Negado	
37	70	Dentista	HZ	DESCONOCE	0	Aciclovir Sistémico	Negado	Negados	
41	65	Tecnico	HZ	HSV-1	0	Negado	Aciclovir Sistémico	HTA	
43	78	Primaria	HZ	Negadas	0	Negado	Negado	DM2	
45	18	Secundaria	HZ	HSV-1	3/MES de HSV-1	Negado	Aciclovir Sistémico	LES	
46	35	Secundaria	HZ	HZ Y HSV	3/AÑO de HSV-1	Dudoso	Aciclovir Sistémico	Negadas	
47	5	Kinder	HZ	Negadas	0	Negado	Negado	LLA	
49	76	Secundaria	HZ	Desconoce	Desconoce	Negado	Aciclovir	LNH+PDN+CFM+Rituximab	
50	52	Arquitectura	HZ	Negadas	Negadas	Negado	Negado	Negadas	

Se obtienen de esta tabla el número total de 10 aislados clínicos positivos para VHS-1 y 2 aislados clínicos positivos para VHS-2.

La edad de nuestros pacientes fue de 14 años a 62 años, la media fue de 37.5 años representando un 56% de mujeres y un 44% de hombres.

De cada paciente se identificó tipo de herpes, número de infecciones previas, tratamientos previos, medicamentos actuales y comorbilidades.

Mientras que de cada aislado se identificó el título viral y el IC50 aciclovir.

A continuación se detallan los resultados de cada uno de los aislados clínicos durante el modelo experimental en ratones, se puede observar el número de días de la evaluación clínica, con su escala numérica según lo observado, además de las iconografías en los días más representativos de la infección.

Resultados de evaluación de virulencia e historia clínica por aislados clínicos de Herpes Simplex 1

“Modelo experimental de queratoconjuntivitis herpética”

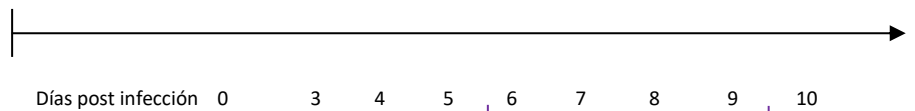
I. Evaluación de la cepa de referencia en ratones BALB/c

Cepa de Referencia KOS (VHS-1)

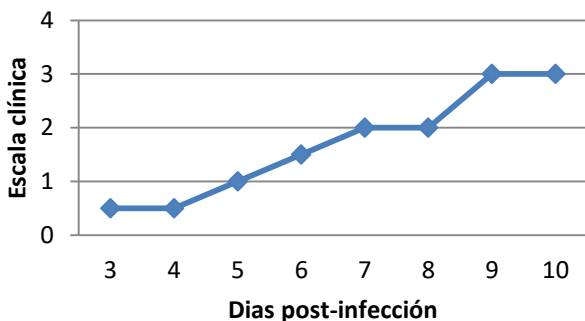
Cepa	Tiempo (días)	Escala clínica
KOS	3	0.5
	4	0.5
	5	1
	6	1.5
	7	2
	8	2
	9	3
	10	3

Tabla tiempo -escala clínica en donde se observa la evaluación clínica a través de los días.

Historia clínica



Cepa de referencia KOS



Curva escala-días en donde se observa gráficamente la progresión de la infección en la escala clínica

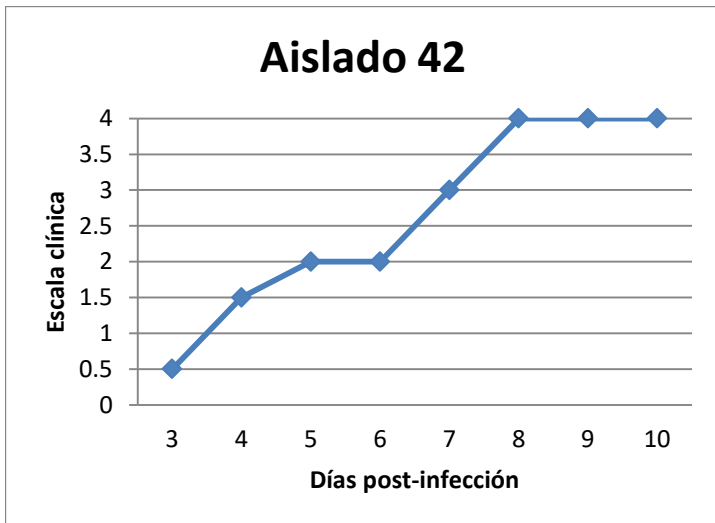
Se muestran las iconografías de los ratones afectados más significativamente en los días post-infección

Resultados Aislado clínico 42

Aislado clínico	Tiempo (días)	Escala clínica
42	3	0.5
	4	1.5
	5	2
	6	2
	7	3
	8	4
	9	4
	10	4

Tabla tiempo -escala clínica en donde se observa la evaluación clínica a través de los días.

Historia clínica



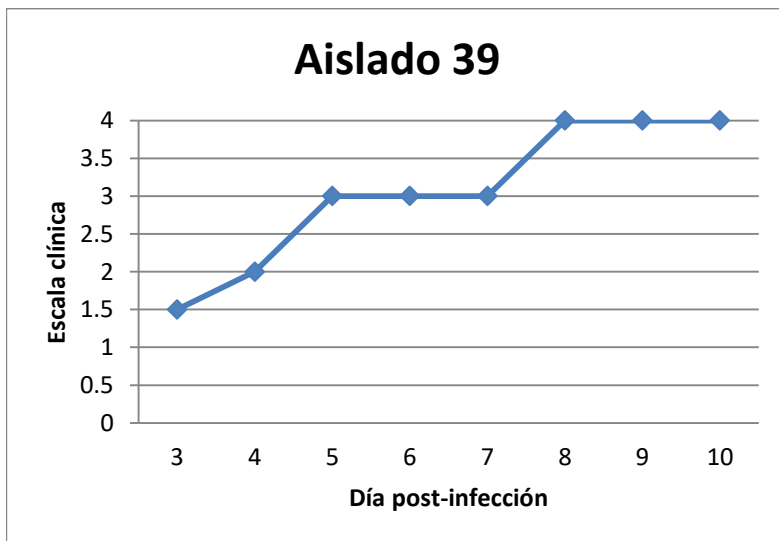
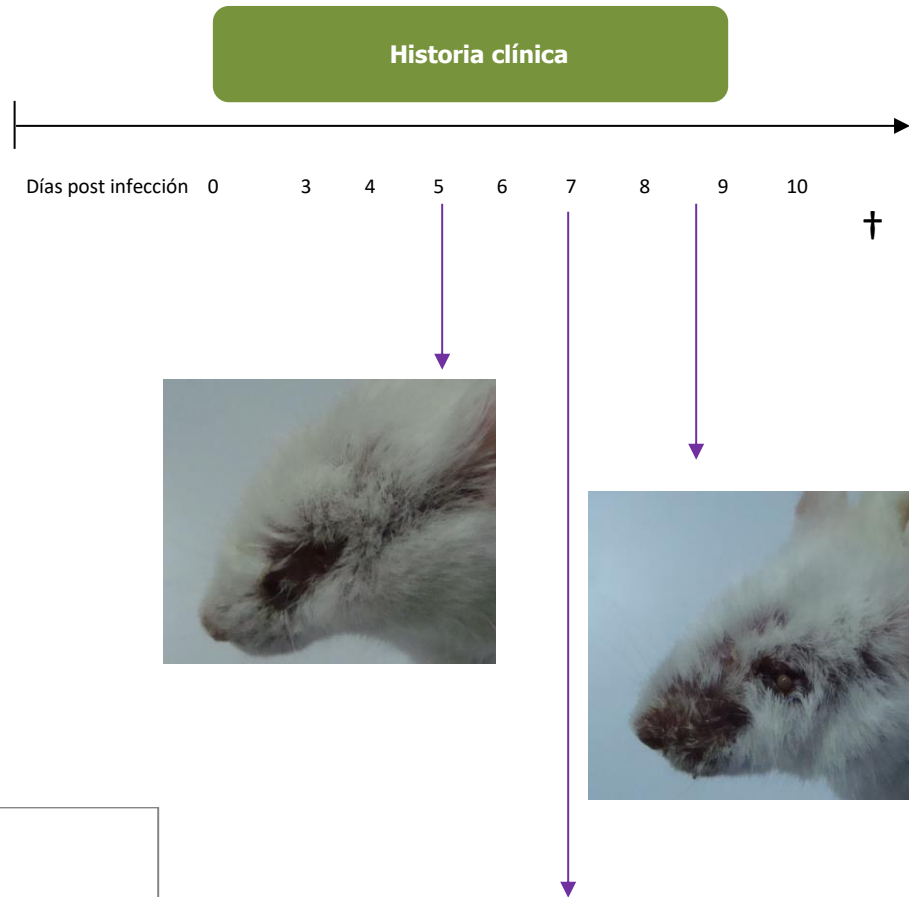
Se muestran las iconografías de los ratones afectados más significativamente en los días post-infección. En este aislado en particular se produjo la muerte de los ratones al día 10 post-infección

Curva escala-días en donde se observa gráficamente la progresión de la infección en la escala clínica

Resultados Aislado clínico 39

Aislado clínico	Tiempo (días)	Escala clínica
39	3	1.5
	4	2
	5	3
	6	3
	7	3
	8	4
	9	4
	10	4

Tabla tiempo -escala clínica en donde se observa la evaluación clínica a través de los días.



Curva escala-días en donde se observa gráficamente la progresión de la infección en la escala clínica

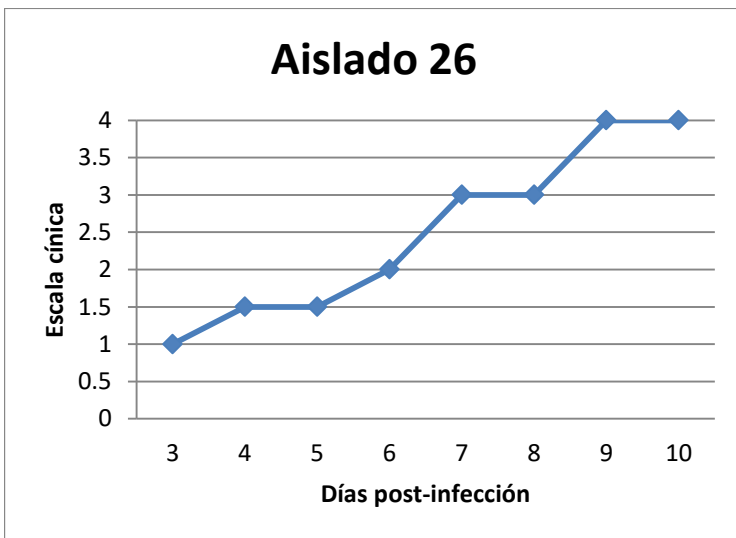
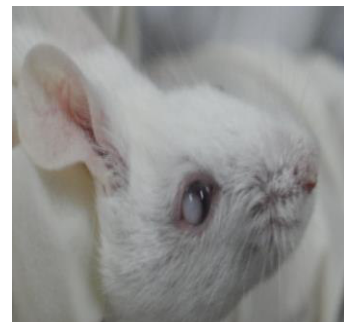
Se muestran las iconografías de los ratones afectados más significativamente en los días post-infección. En este aislado en particular se produjo la muerte de los ratones al día 11 post-infección

Resultados Aislado clínico 26

Aislado clínico	Tiempo (días)	Escala clínica
26	3	1
	4	1.5
	5	1.5
	6	2
	7	3
	8	3
	9	4
	10	4

Tabla tiempo -escala clínica en donde se observa la evaluación clínica a través de los días.

Historia clínica



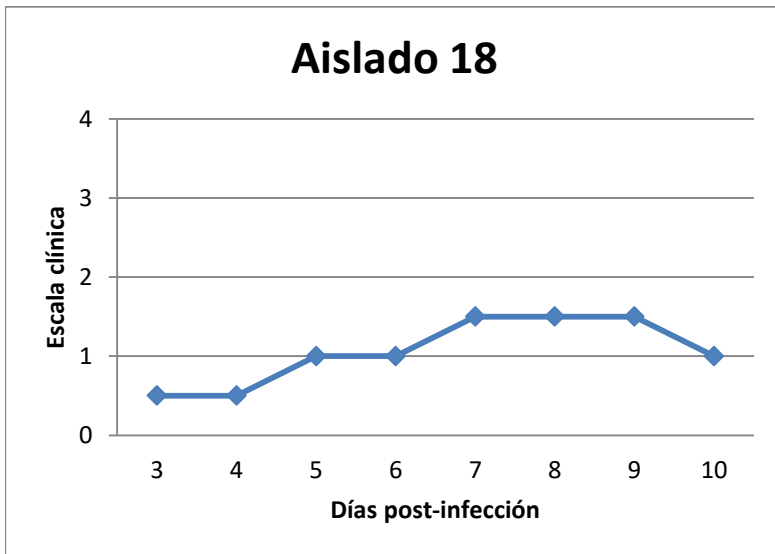
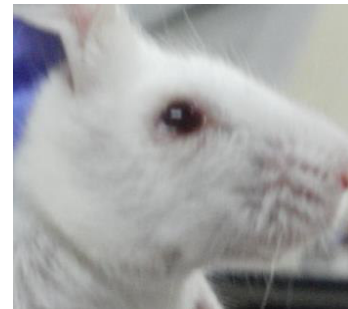
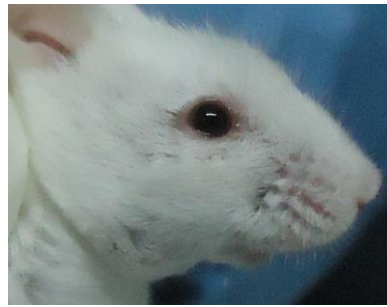
Curva escala-días en donde se observa gráficamente la progresión de la infección en la escala clínica

Se muestran las iconografías de los ratones afectados más significativamente en los días post-infección. En este aislado en particular se produjo la muerte de los ratones al día 10 post-infección

Resultados Aislado clínico 18

Aislado clínico	Tiempo (días)	Escala clínica
18	3	0.5
	4	0.5
	5	1
	6	1
	7	1.5
	8	1.5
	9	1.5
	10	1

Tabla tiempo -escala clínica en donde se observa la evaluación clínica a través de los días.



Se muestran las iconografías de los ratones afectados más significativamente en los días post-infección

Curva escala-días en donde se observa gráficamente la progresión de la infección en la escala clínica

Resultados Aislado clínico 28

Historia clínica

Aislado clínico	Tiempo (días)	Escala clínica
28	3	0.5
	4	1
	5	1.5
	6	2
	7	3
	8	3
	9	3
	10	2

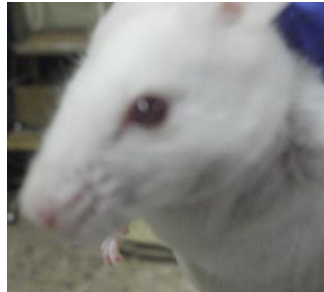
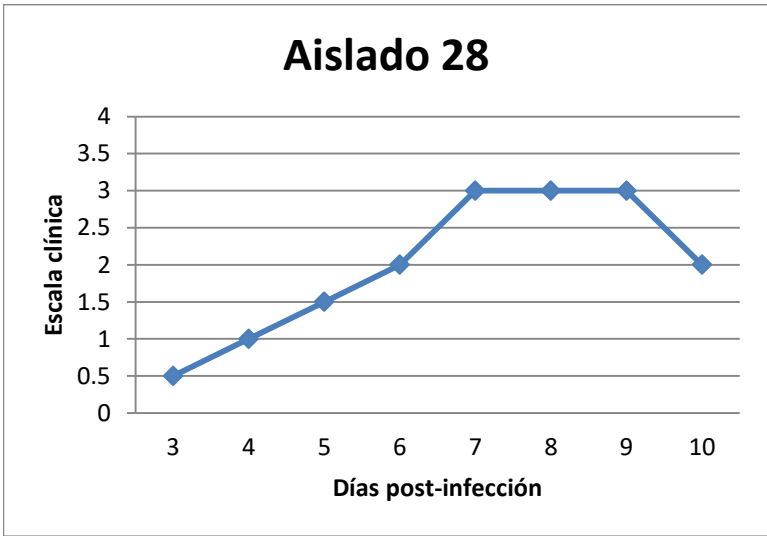


Tabla tiempo –escala clínica en donde se observa la evaluación clínica a través de los días.



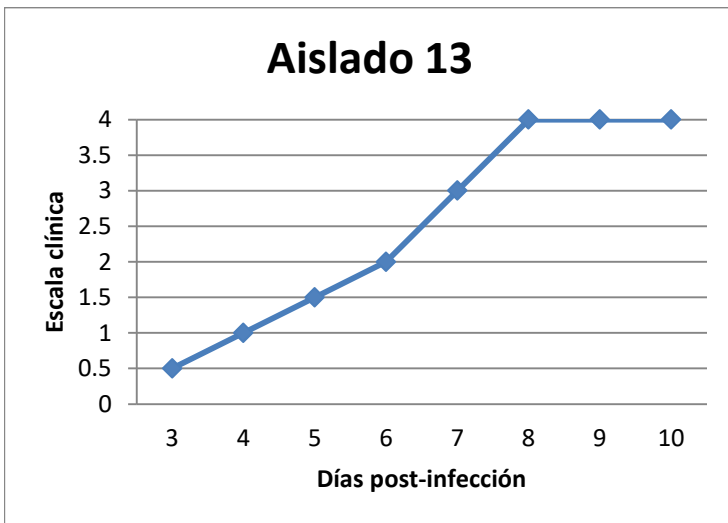
Curva escala-días en donde se observa gráficamente la progresión de la infección en la escala clínica, se puede ver una mejoría en la escala al día 9 post-infección

Se muestran las iconografías de los ratones afectados más significativamente en los días post-infección

Resultados Aislado clínico 13

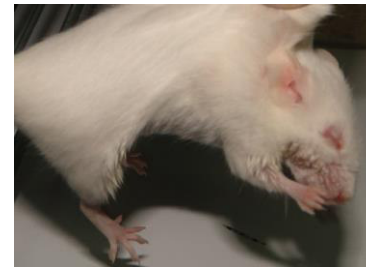
Aislado clínico	Tiempo (días)	Escala clínica
13	3	0.5
	4	1
	5	1.5
	6	2
	7	3
	8	4
	9	4
	10	4

Tabla tiempo -escala clínica en donde se observa la evaluación clínica a través de los días.



Curva escala-días en donde se observa gráficamente la progresión de la infección en la escala clínica

Historia clínica



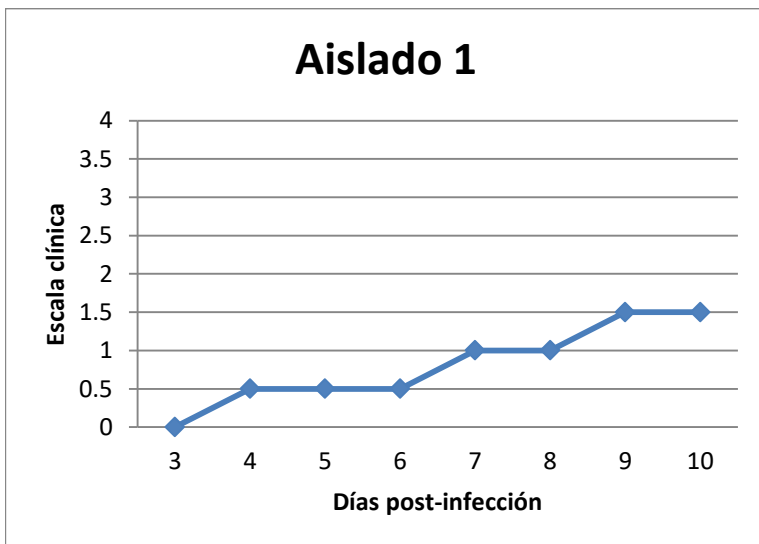
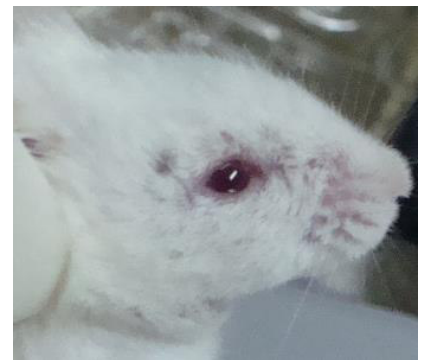
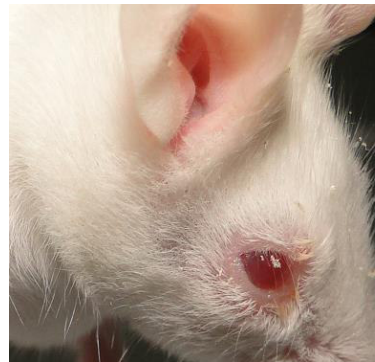
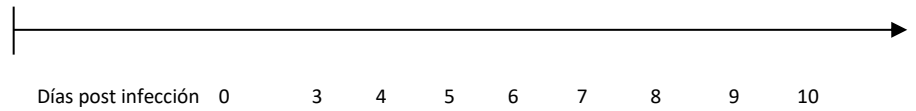
Se muestran las iconografías de los ratones afectados más significativamente en los días post-infección. En este aislado en particular se produjo la muerte de los ratones al día 9 post-infección

Resultados Aislado clínico 1

Aislado clínico	Tiempo (días)	Escala clínica
1	3	0
	4	0.5
	5	0.5
	6	0.5
	7	1
	8	1
	9	1.5
	10	1.5

Tabla tiempo -escala clínica en donde se observa la evaluación clínica a través de los días.

Historia clínica



Curva escala-días en donde se observa gráficamente la progresión de la infección en la escala clínica

Se muestran las iconografías de los ratones afectados más significativamente en los días post-infección

Resultados Aislado clínico 9

Historia clínica

Aislado clínico	Tiempo (días)	Escala clínica
9	3	0.5
	4	1
	5	1.5
	6	1.5
	7	1.5
	8	3
	9	3
	10	2

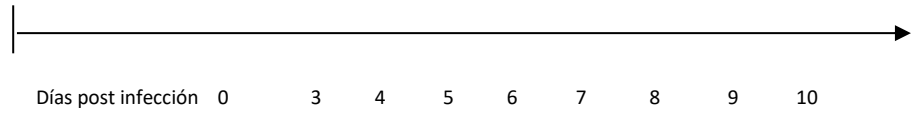
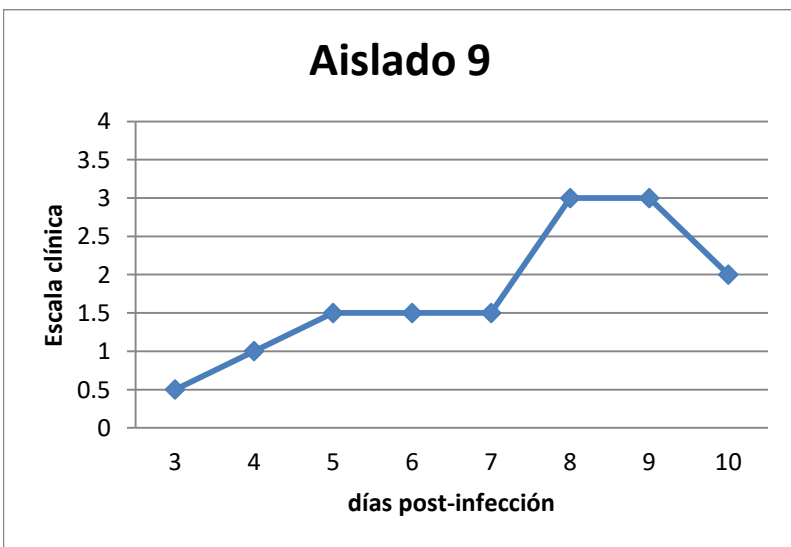


Tabla tiempo -escala clínica en donde se observa la evaluación clínica a través de los días.



Curva escala-días en donde se observa gráficamente la progresión de la infección en la escala clínica

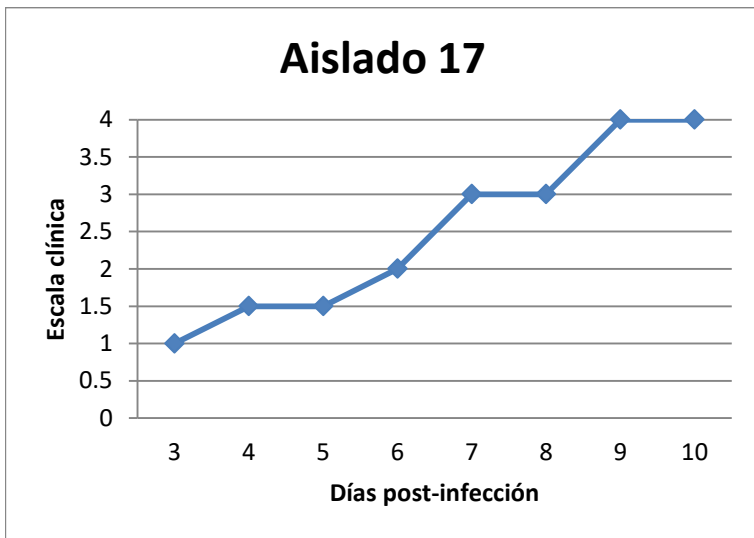
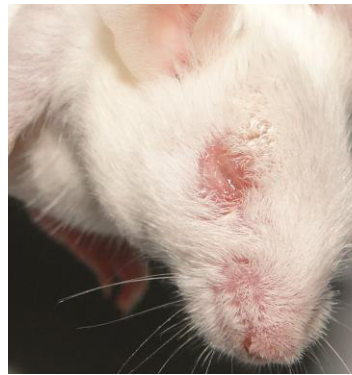
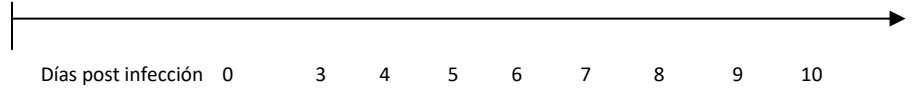
Se muestran las iconografías de los ratones afectados más significativamente en los días post-infección

Resultados Aislado clínico 17

Aislado clínico	Tiempo (días)	Escala clínica
17	3	1
	4	1.5
	5	1.5
	6	2
	7	3
	8	3
	9	4
	10	4

Tabla tiempo -escala clínica en donde se observa la evaluación clínica a través de los días.

Historia clínica



Curva escala-días en donde se observa gráficamente la progresión de la infección en la escala clínica

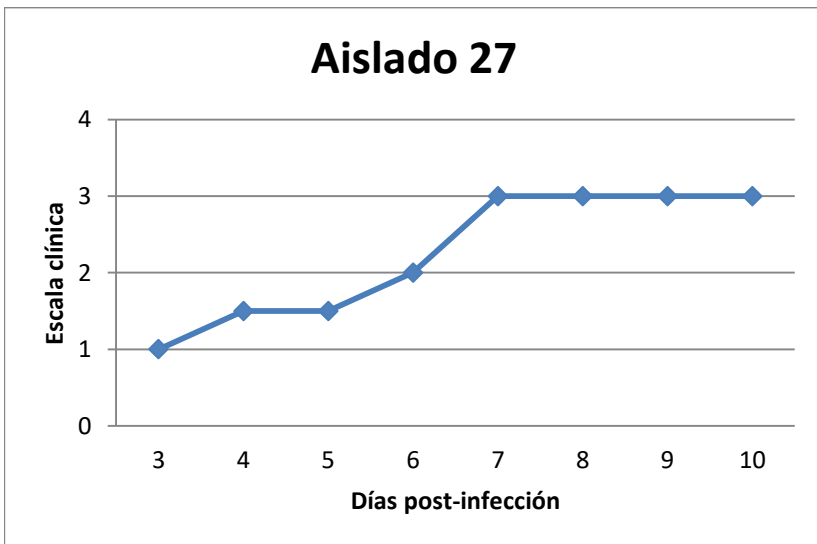
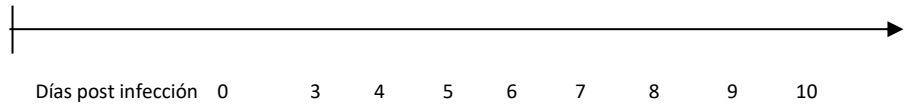
Se muestran las iconografías de los ratones afectados más significativamente en los días post-infección

Resultados Aislado clínico 27

Aislado clínico	Tiempo (días)	Escala clínica
27	3	1
	4	1.5
	5	1.5
	6	2
	7	3
	8	3
	9	3
	10	3

Tabla tiempo -escala clínica en donde se observa la evaluación clínica a través de los días.

Historia clínica



Curva escala-días en donde se observa gráficamente la progresión de la infección en la escala clínica

Se muestran las iconografías de los ratones afectados más significativamente en los días post-infección

Resultados de evaluación de virulencia e historia clínica por aislados clínicos de Herpes Simplex 2

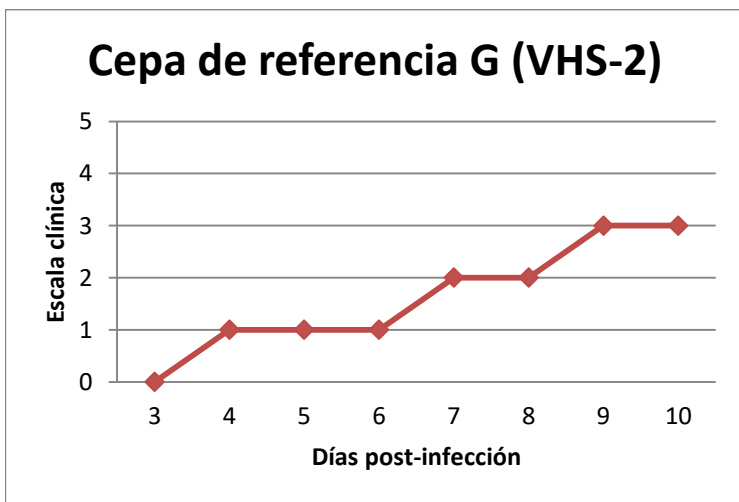
“Modelo experimental de infección herpética vaginal”

II. Evaluación de la cepa de referencia en ratones BALB/c

Cepa de Referencia G (VHS-2)

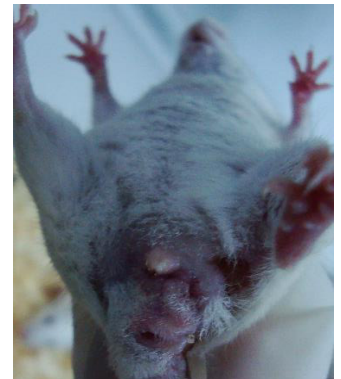
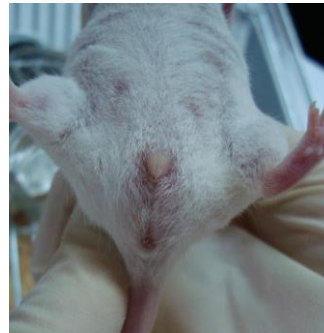
Cepa	Tiempo (días)	Escala clínica
G	3	0
	4	1
	5	1
	6	1
	7	2
	8	2
	9	3
	10	3

Tabla tiempo -escala clínica en donde se observa la evaluación clínica a través de los días.



Curva escala-días en donde se observa gráficamente la progresión de la infección en la escala clínica

Historia clínica



Se muestran las iconografías de los ratones afectados más significativamente en los días post-infección

Resultados Aislado clínico 3

Aislado clínico	Tiempo (días)	Escala clínica
3	3	0
	4	0
	5	0
	6	0
	7	0
	8	1
	9	1
	10	1

Tabla tiempo –escala clínica en donde se observa la evaluación clínica a través de los días.



Curva escala-días en donde se observa gráficamente la progresión de la infección en la escala clínica

Historia clínica



Se muestran las iconografías de los ratones afectados más significativamente en los días post-infección

Resultados Aislado clínico 2

Aislado clínico 2

Aislado clínico	Tiempo (días)	Escala clínica
2	3	0
	4	0
	5	0
	6	1
	7	1
	8	0
	9	0
	10	0

Tabla tiempo -escala clínica en donde se observa la evaluación clínica a través de los días.

Historia clínica



Curva escala-días en donde se observa gráficamente la progresión de la infección en la escala clínica

Se muestran las iconografías de los ratones afectados más significativamente en los días post-infección

Del modelo experimental de queratoconjuntivitis podemos observar que la cepa de referencia KOS genera lesiones al sexto día de infección en una escala de 1.5 (edema estromal con lesiones geográficas).

En base a esta referencia podemos observar que se tuvieron 4 cepas de los aislados clínicos de pacientes, altamente virulentas:

- Cepa 42 la cual tuvo una escala de 4 (queratitis severa, pupilas e iris invisible) al octavo día. Con un 50% de mortalidad en los ratones al día 10 de infección.
- Cepa 39 la cual tuvo una escala de 4 (queratitis severa, pupilas e iris invisible) al octavo día. Con un 100% de mortalidad en los ratones al día 10 de infección.
- Cepa 26 la cual tuvo una escala de 4 (queratitis severa, pupilas e iris invisible) al noveno día. Con un 50% de mortalidad en los ratones al día 10 de infección.
- Cepa 13 la cual tuvo una escala de 4 (queratitis severa, pupilas e iris invisible) al octavo día. Con un 100% de mortalidad en los ratones al día 10 de infección.

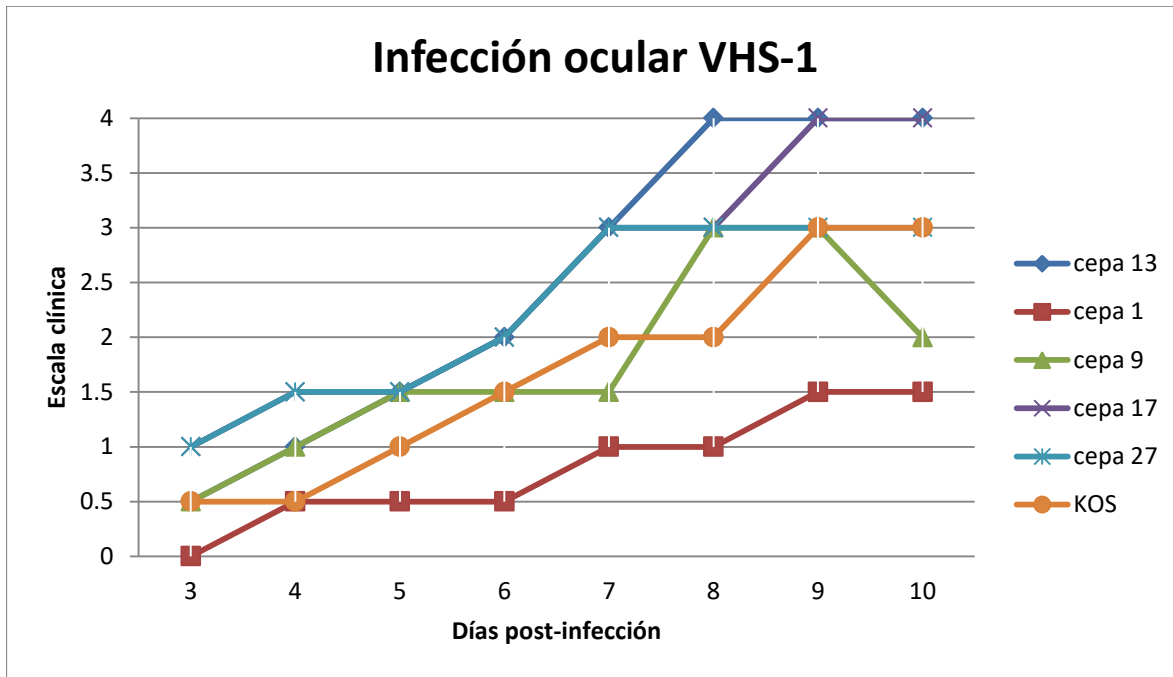
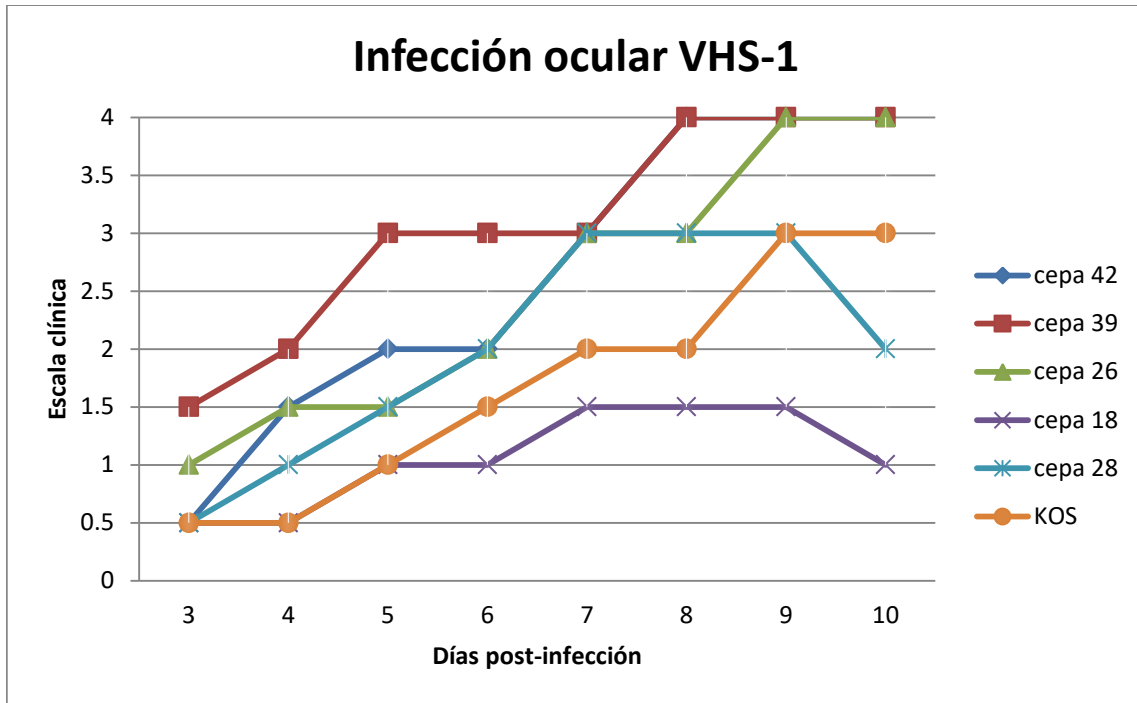


Figura 13. Concentrado de aislados clínicos de VHS-1.

Del modelo experimental de infección herpética vaginal podemos observar que la cepa de referencia G, genera lesiones al noveno día de infección en una escala de 3 (lesión genital purulenta).

En base a esta referencia podemos observar que ninguna de nuestras cepas de aislados clínicos de VHS-2 fue altamente virulenta, mostrando incluso solo una escala de infección clínica de 1 (ligero edema y eritema genital).

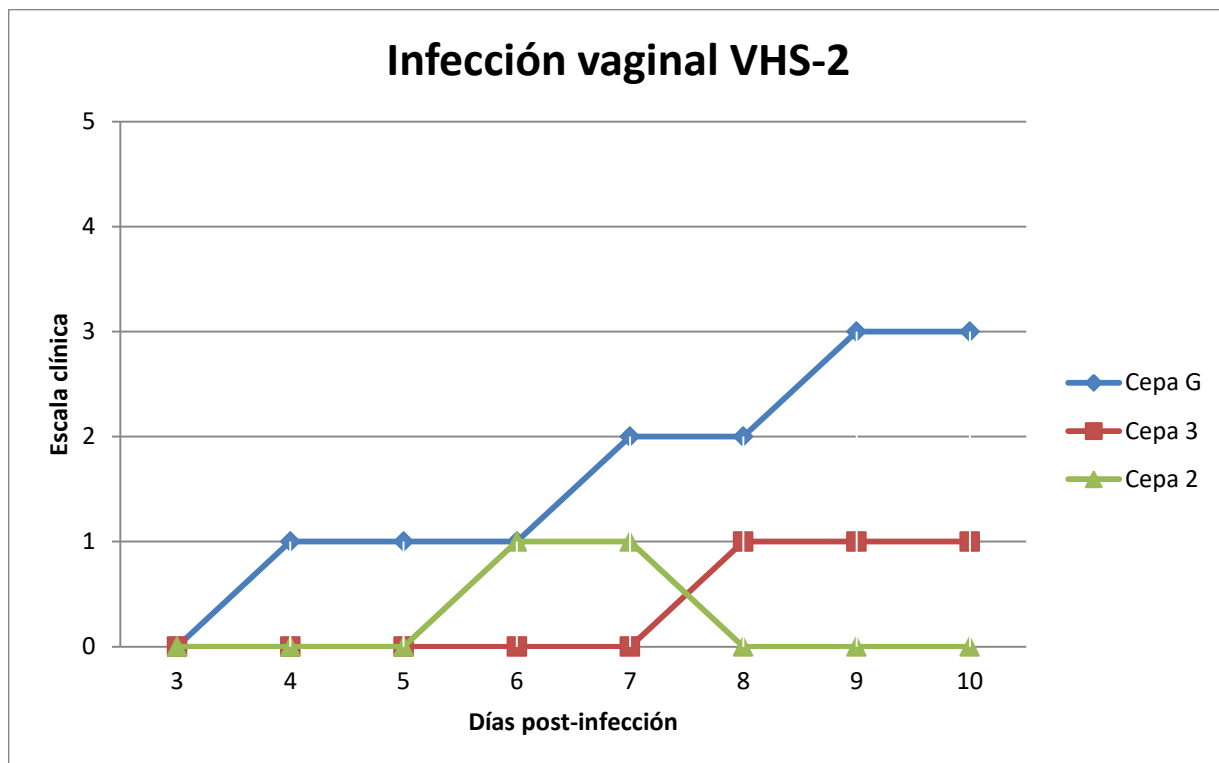


Figura 14. Concentrado de aislados clínicos de VHS-2.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos entre los grupos fueron analizados utilizando el test de la Chi-cuadrada y la correlación de Pearson (especificado en casa caso).

Todos los valores descriptivos de la población estudiada fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM).

Los datos considerados significativos se indican en cada tabla con el p-valor correspondiente.

La información de cada aislado y la escala clínica desarrollada en los modelos experimentales por día, se analizó con la prueba de Chi-cuadrada obteniéndose lo siguiente:

Chi-Square Tests

dia		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
0	Pearson Chi-Square	. ^a		
	N of Valid Cases	56		
1	Pearson Chi-Square	. ^a		
	N of Valid Cases	56		
2	Pearson Chi-Square	47.444 ^b	39	.166
	Likelihood Ratio	37.507	39	.538
	Linear-by-Linear Association	15.601	1	.000
	N of Valid Cases	56		
3	Pearson Chi-Square	65.282 ^c	39	.005
	Likelihood Ratio	63.950	39	.007
	Linear-by-Linear Association	15.643	1	.000
	N of Valid Cases	56		
4	Pearson Chi-Square	84.634 ^d	52	.003
	Likelihood Ratio	80.202	52	.007
	Linear-by-Linear Association	10.466	1	.001
	N of Valid Cases	56		
5	Pearson Chi-Square	107.927 ^e	65	.001
	Likelihood Ratio	95.444	65	.008
	Linear-by-Linear Association	11.762	1	.001
	N of Valid Cases	56		
6	Pearson Chi-Square	84.632 ^f	65	.051
	Likelihood Ratio	83.640	65	.060
	Linear-by-Linear Association	9.372	1	.002
	N of Valid Cases	56		
7	Pearson Chi-Square	76.029 ^g	78	.542
	Likelihood Ratio	76.125	78	.539
	Linear-by-Linear Association	5.330	1	.021
	N of Valid Cases	56		
co8	Pearson Chi-Square	67.973 ^h	78	.784
	Likelihood Ratio	70.978	78	.701

Continua				
	Linear-by-Linear Association	4.609	1	.032
	N of Valid Cases	56		
9	Pearson Chi-Square	87.606 ⁱ	78	.214
	Likelihood Ratio	92.993	78	.118
	Linear-by-Linear Association	3.563	1	.059
	N of Valid Cases	56		
10	Pearson Chi-Square	96.833 ⁱ	78	.073
	Likelihood Ratio	100.286	78	.045
	Linear-by-Linear Association	3.782	1	.052

Este resultado nos muestra una dependencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los días 3, 4, 5 y 6, entre la cepa y el tipo de lesión generado en el modelo murino experimental.

Para validar que los aislados clínicos producían un tipo de lesión clínica en los modelos experimentales se utilizó la siguiente estadística:

Symmetric Measures

dia		Value	Asymp. Std. Error ^b	Approx. T ^c	Approx. Sig.
0	IntervalbyInterval Pearson's R	. ^a			
	N of Valid Cases	56			
1	IntervalbyInterval Pearson's R	. ^a			
	N of Valid Cases	56			
2	IntervalbyInterval Pearson's R	.533	.095	4.624	.000 ^d
	Ordinal by Ordinal SpearmanCorrelation	.490	.105	4.128	.000 ^d
	N of Valid Cases	56			
3	IntervalbyInterval Pearson's R	.533	.101	4.633	.000 ^d
	Ordinal by Ordinal SpearmanCorrelation	.494	.104	4.174	.000 ^d
	N of Valid Cases	56			
4	IntervalbyInterval Pearson's R	.436	.120	3.562	.001 ^d
	Ordinal by Ordinal SpearmanCorrelation	.400	.123	3.204	.002 ^d
	N of Valid Cases	56			
5	IntervalbyInterval Pearson's R	.462	.122	3.833	.000 ^d
	Ordinal by Ordinal SpearmanCorrelation	.433	.124	3.535	.001 ^d
	N of Valid Cases	56			
6	IntervalbyInterval Pearson's R	.413	.138	3.330	.002 ^d
	Ordinal by Ordinal SpearmanCorrelation	.369	.132	2.914	.005 ^d
	N of Valid Cases	56			
	IntervalbyInterval Pearson's R	.311	.133	2.407	.020 ^d

Continua						
	Ordinal by Ordinal	SpearmanCorrelation	.275	.130	2.103	.040 ^d
	N of Valid Cases		56			
8	IntervalbyInterval	Pearson's R	.289	.127	2.222	.030 ^d
	Ordinal by Ordinal	SpearmanCorrelation	.287	.131	2.203	.032 ^d
	N of Valid Cases		56			
9	IntervalbyInterval	Pearson's R	.255	.129	1.934	.058 ^d
	Ordinal by Ordinal	SpearmanCorrelation	.252	.133	1.914	.061 ^d
	N of Valid Cases		56			
10	IntervalbyInterval	Pearson's R	.262	.128	1.997	.051 ^d
	Ordinal by Ordinal	SpearmanCorrelation	.264	.132	2.010	.049 ^d
	N of Valid Cases		56			
Total	IntervalbyInterval	Pearson's R	.223	.039	5.662	.000 ^d
	Ordinal by Ordinal	SpearmanCorrelation	.220	.039	5.594	.000 ^d
	N of Valid Cases		616			

Estos resultados muestran que existe una correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la cepa utilizada para la infección y el tipo de lesión producida en el modelo murino experimental desde el día 2 post-infección hasta el día 10 de observación clínica.

PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA DEL MODELO ESPERIMENTAL DE QUERATOCONJUNTIVITIS

Cepa 42 la cual tuvo una escala de 4 (queratitis severa, pupilas e iris invisible) al octavo día. Con un 50% de mortalidad en los ratones al día 10 de infección.

Cepa 39 la cual tuvo una escala de 4 (queratitis severa, pupilas e iris invisible) al octavo día. Con un 100% de mortalidad en los ratones al día 10 de infección.

Cepa 26 la cual tuvo una escala de 4 (queratitis severa, pupilas e iris invisible) al noveno día. Con un 50% de mortalidad en los ratones al día 10 de infección.

Cepa 13 la cual tuvo una escala de 4 (queratitis severa, pupilas e iris invisible) al octavo día. Con un 100% de mortalidad en los ratones al día 10 de infección.

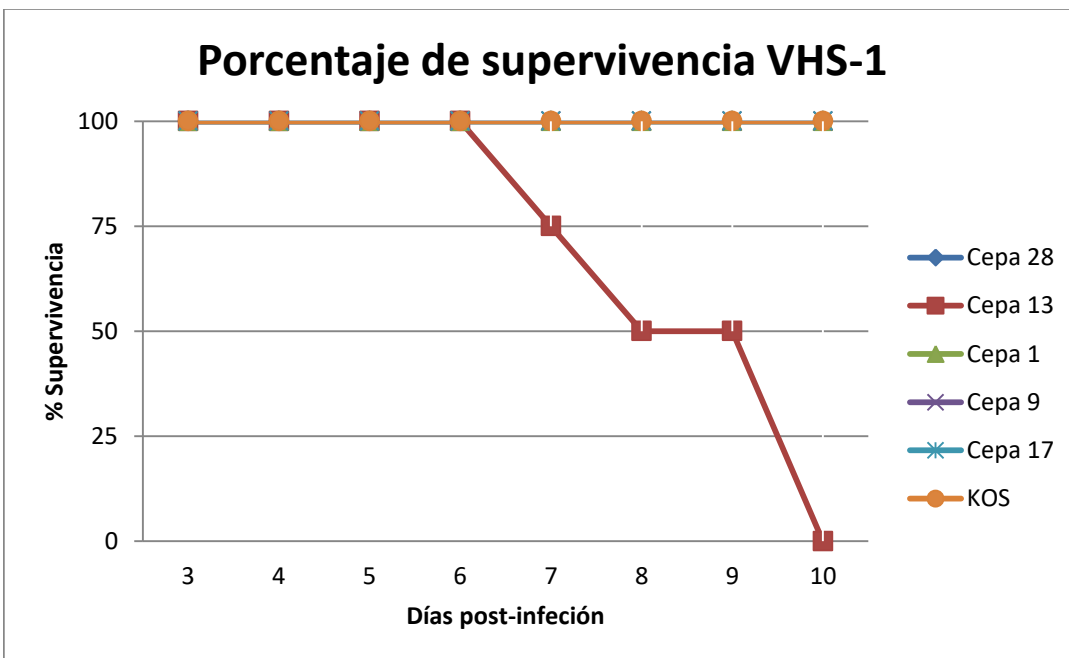
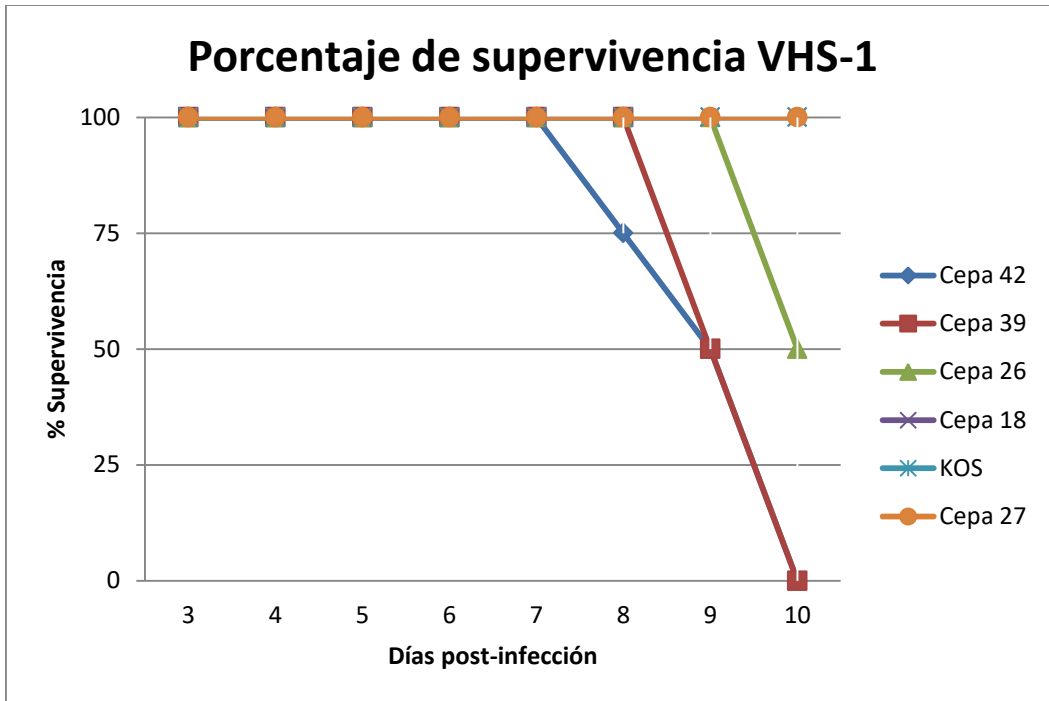


Figura 15. Duración de la supervivencia de los ratones

PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA DEL MODELO EXPERIMENTAL DE QUERATOCONJUNTIVITIS

Por otro lado se observa que en el grupo del VHS-2, ambas cepas de aislados clínicos mostraron un 100% de supervivencia en el modelo experimental.

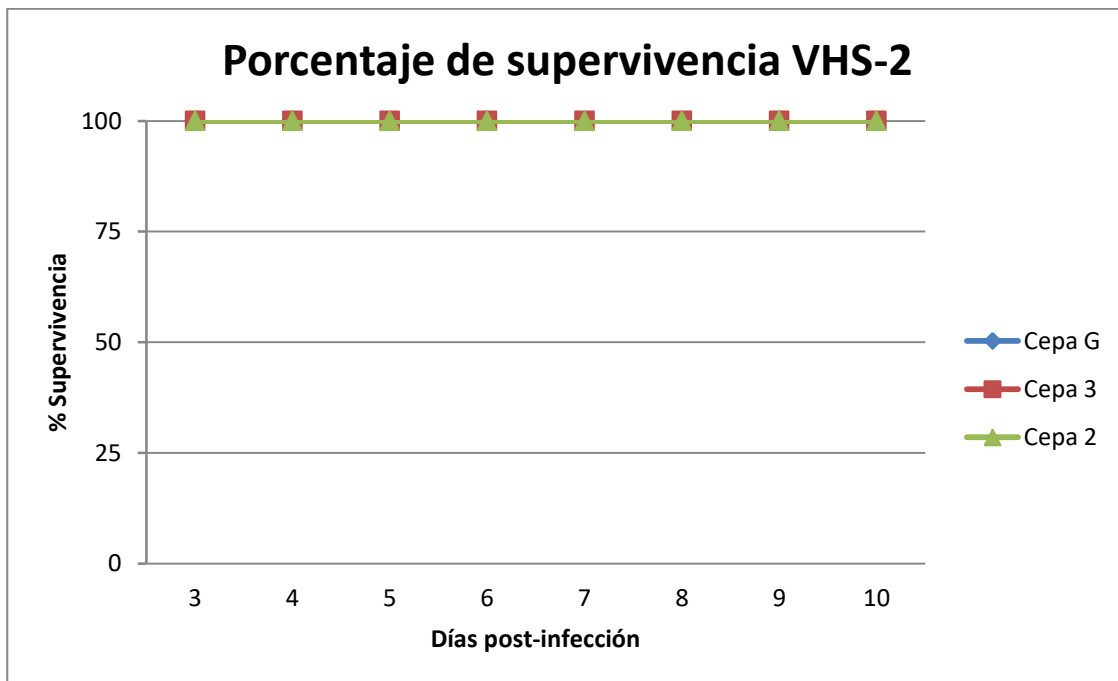


Figura 16. Duración de la supervivencia de los ratones

Comparación entre aislados clínicos de VHS-2 del noreste y cepa sudafricana SD90

Un tema fascinante dentro de la investigación del herpes virus tipo 2 es la relación estrecha que se ha encontrado entre este y el VIH, aumentado significativamente el riesgo de transmisión del virus por inmunodeficiencia en aquellos pacientes con infecciones herpéticas. Esto ha llevado a múltiples investigaciones por su potencial efecto en la reducción de la susceptibilidad y consecuente transmisión del SIDA.

En un estudio reciente se muestra que las cepas de aislados Africanos son más virulentas que las cepas aisladas en los Estados Unidos, de la misma manera podemos observar que los aislados del noreste de México presentan títulos virales más altos que la cepa SD90 (figura 7), sin embargo en el modelo experimental murino no desarrollaron lesiones clínicamente evaluables. Mientras que la cepa SD90 a títulos más bajos incluso que la cepa de referencia G fue altamente virulenta en los modelos murinos (27).

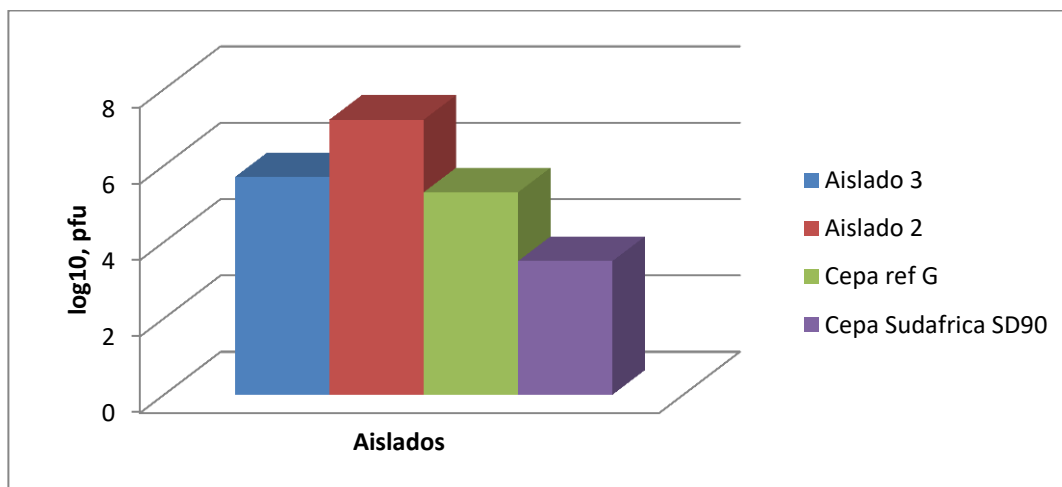


Figura 17. Virulencia entre cepas

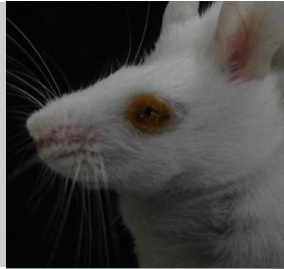






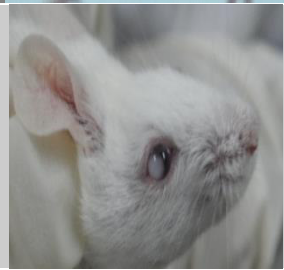
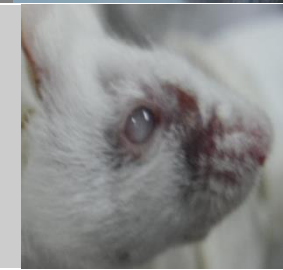
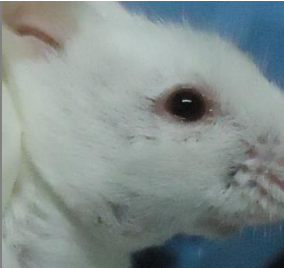
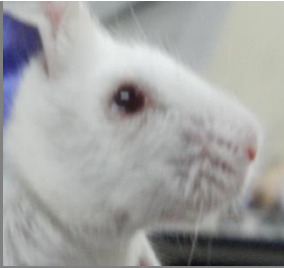


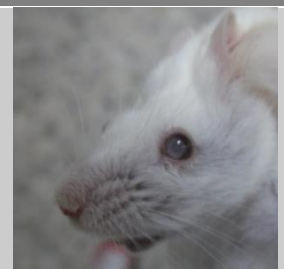



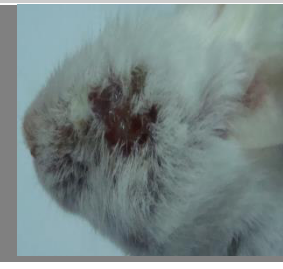
	Historia clínica						Supervivencia	
	Día	5	6	7	8	9		10
Cepa Ref KOS								100%
Aislado 39								0%
Aislado 26								50%
Aislado 18								100%
Aislado 28								100%
Aislado 42								50%

Figura 18. Iconografías de los aislados clínicos de VHS-1 y supervivencia

	Historia clínica						Supervivencia	
	Día	5	6	7	8	9		10
Cepa de Ref KOS								100%
Aislado 13								0%
Aislado 1								100%
Aislado 9								100%
Aislado 17								100%
Aislado 27								100%

Figura 19. Iconografías de los aislados clínicos de VHS-1 v supervivencia

Tabla de contingencia cepa * supervivencia

		Supervivencia		Total
		1.00	2.00	
cepa	13.0 0	0	16	16
	26.0 0	8	8	16
	39.0 0	0	16	16
	42.0 0	8	8	16
Total		16	48	64

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	21.333(a)	3	.000
Razón de verosimilitudes	27.617	3	.000
Asociación lineal por lineal	2.536	1	.111
N de casos válidos	64		

Recuento a 4 casillas (50.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 4.00.

Medidas simétricas

		Valor	Sig. aproximada
Intervalo por intervalo	R de Pearson	-.201	.112(c)
Ordinal por ordinal	Correlación de Spearman	-.258	.039(c)
N de casos válidos		64	

a Asumiendo la hipótesis alternativa.

b Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

c Basada en la aproximación normal.

En estos resultados se puede observar que si hay una dependencia y una correlación estadísticamente significativa entre el aislado clínico y la mortalidad en los modelos experimentales murinos.

Aislado clínico	Vivos	Muertos	Infecciones x año	IC50
42	8	8	15	0.764
39	0	16	4	0.307
26	8	8	4	0.181
13	0	16	2	0.016

An $IC_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$ indicated susceptibility to acyclovir, $IC_{50} 1-2 \mu\text{g/ml}$ was intermediate susceptibility to acyclovir and a value of $IC_{50} > 2 \mu\text{g/ml}$ denoted resistance

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el modelo murino se puede observar que existe una dependencia de la mortalidad de los ratones con el aislado clínico. Además podemos identificar que aquellos aislados en donde la infección se manifestó clínicamente más agresiva en el modelo murino, también corresponde a los pacientes que tuvieron mayor cantidad de recurrencias de lesiones en el año. Sin embargo no encontramos diferencia entre las lesiones manifestadas en el modelo experimental, las recurrencias en los pacientes y la susceptibilidad al Aciclovir. Aunque es de importancia señalar que el aislado que tuvo un IC50 de 0.764 corresponde con el paciente que mayor cantidad de recurrencias al año tuvo (15).



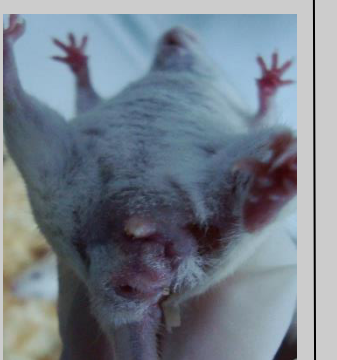
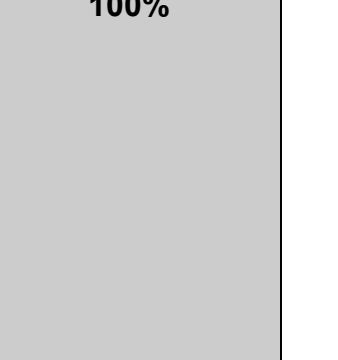



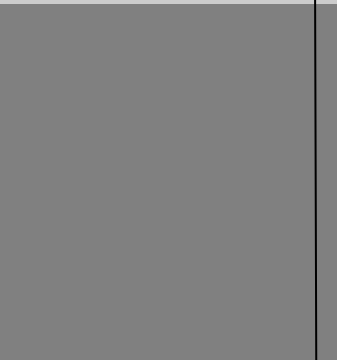
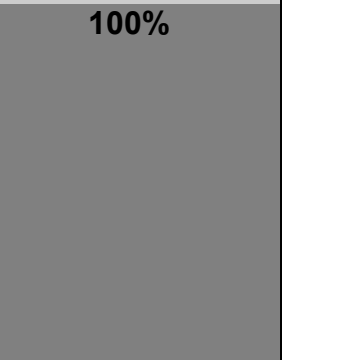




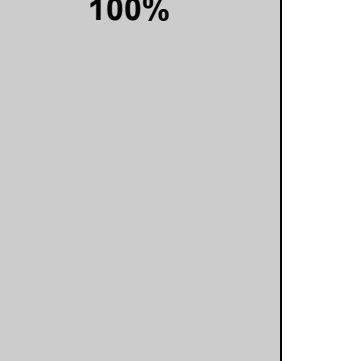

	Historia clínica										Supervivencia	
	Día	3	4	5	6	7	8	9	10			
Cepa de Ref G												100%
Aislado 3												100%
Aislado 2												100%

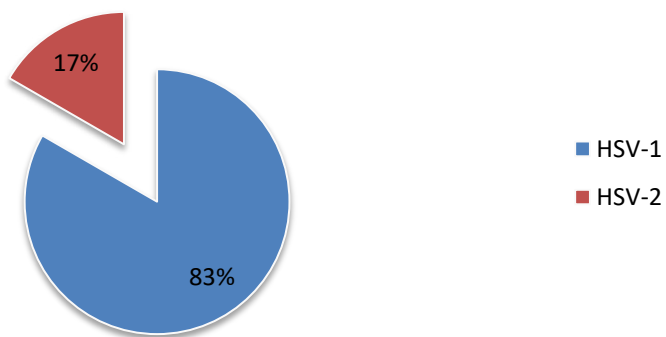
Figura 20. Iconografías de los aislados clínicos de VHS-2 y supervivencia

Datos descriptivos de los pacientes y los aislados clínicos

TIPO DE HERPES

	Frecuencia	Percent	ValidPercent	Cumulative Percent
Valid 1	10	83.3	83.3	83.3
2	2	16.7	16.7	100.0
Total	12	100.0	100.0	

Tipo de Herpes



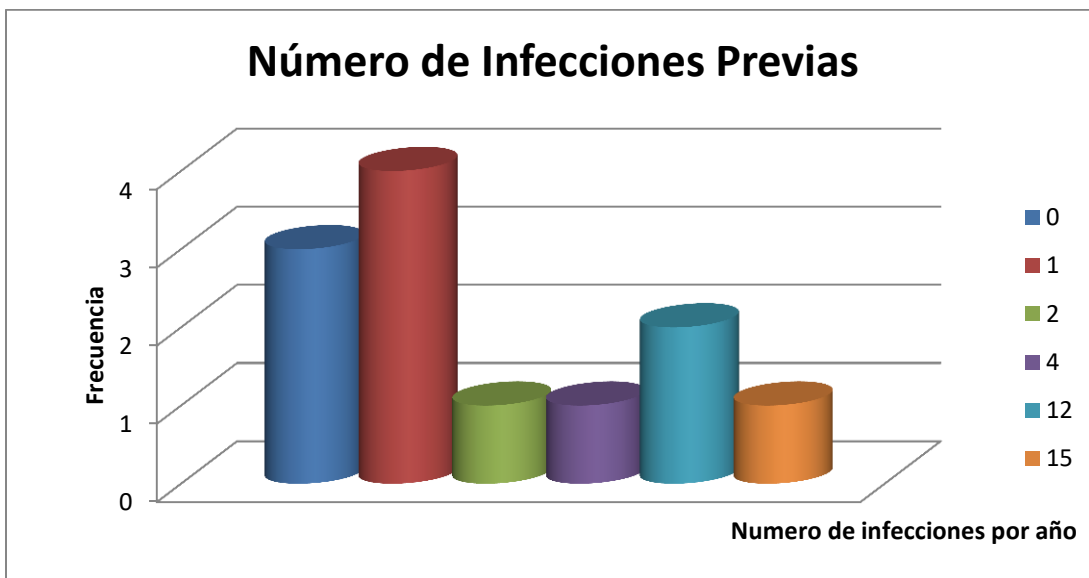
LOCALIZACION

	Frecuencia	Percent	ValidPercent	Cumulative Percent
Valid ORAL	10	83.3	83.3	83.3
GENITAL	2	16.7	16.7	100.0
Total	12	100.0	100.0	

Figura 21. Datos descriptivos del tipo de herpes encontrado

NUMERO DE INFECCIONES PREVIAS

	Frecuencia	Percent	ValidPercent	Cumulative Percent
Valid 0	3	25.0	25.0	25.0
1	4	33.3	33.3	58.3
2	1	8.3	8.3	66.7
4	1	8.3	8.3	75.0
12	2	16.7	16.7	91.7
15	1	8.3	8.3	100.0
Total	12	100.0	100.0	



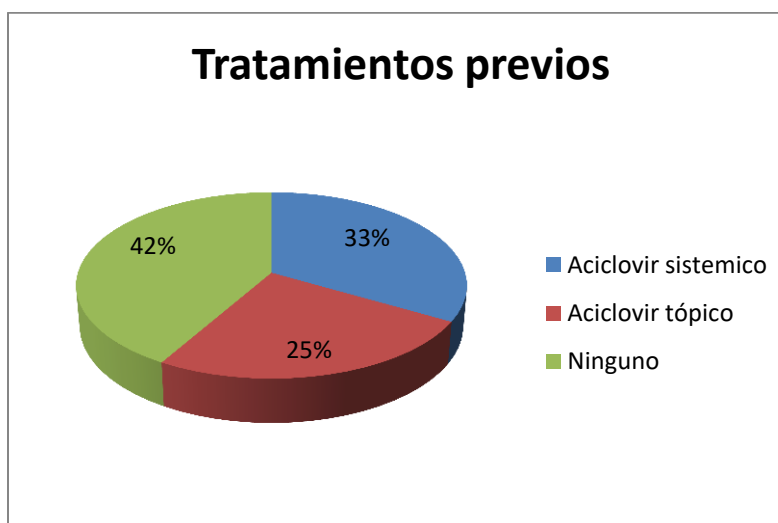
Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	7.200 ^a	5	.206
Likelihood Ratio	6.994	5	.221
Linear-by-Linear Association	1.307	1	.253
N of Valid Cases	12		

Figura 22. El análisis estadístico muestra que no existe dependencia significativa

TRATAMIENTOS PREVIOS

	Frecuencia	Percent	ValidPercent	Cumulative Percent
Valid 1	4	33.3	33.3	33.3
2	3	25.0	25.0	58.3
3	5	41.7	41.7	100.0
Total	12	100.0	100.0	



Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	3.360 ^a	2	.186
Likelihood Ratio	4.083	2	.130
Linear-by-Linear Association	2.488	1	.115
N of Valid Cases	12		

Figura 23. El análisis estadístico muestra que no existe dependencia

MEDICAMENTO ACTUAL

	Frecuencia	Percent	ValidPercent	Cumulative Percent
Valid 1	2	16.7	16.7	16.7
2	3	25.0	25.0	41.7
3	7	58.3	58.3	100.0
Total	12	100.0	100.0	

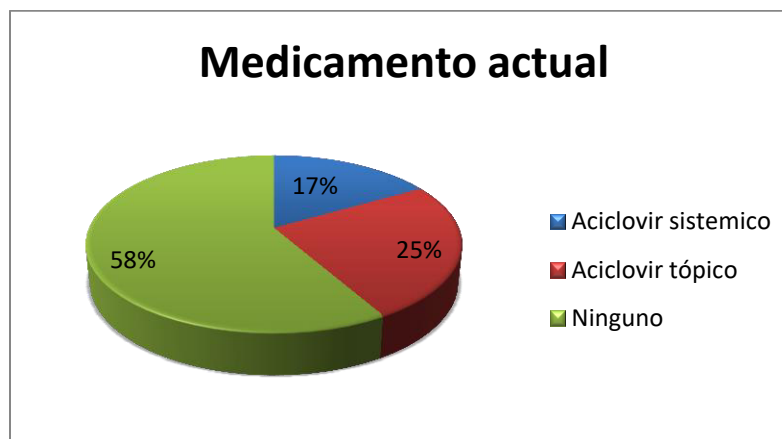
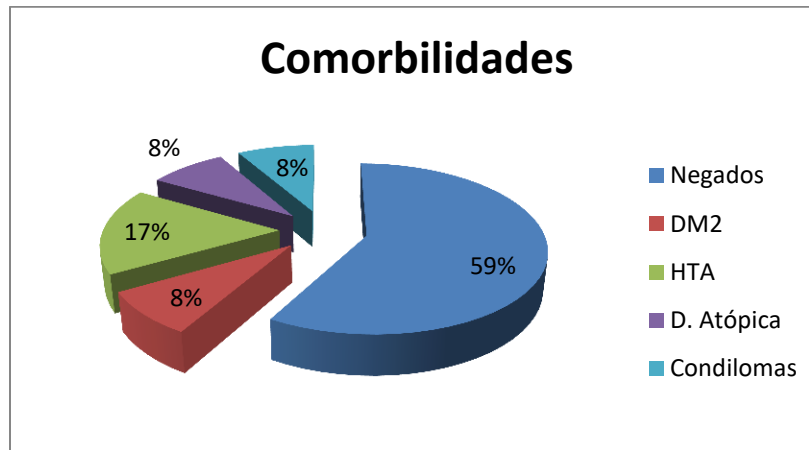


Figura 24. Descripción de los medicamentos consumidos

COMORBILIDAD

	Frecuencia	Percent	ValidPercent	Cumulative Percent
Valid 1	7	58.3	58.3	58.3
3	1	8.3	8.3	66.7
4	2	16.7	16.7	83.3
6	1	8.3	8.3	91.7
7	1	8.3	8.3	100.0
Total	12	100.0	100.0	



Chi-SquareTests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	5.829 ^a	4	.212
Likelihood Ratio	5.072	4	.280
Linear-by-Linear Association	.170	1	.680
N of Valid Cases	12		

Figura 25. El análisis estadístico muestra que no existe dependencia significativa

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
EDAD DEL PACIENTE	12	14	51	30.50	2.827	9.793
TITULO VIRAL (log10)	12	5.40	7.20	6.1667	.16982	.58827
IC50	12	0	1	.36	.130	.451
Valid N (listwise)	12					

Group Statistics

	TIPO DE HERPES	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
TITULO VIRAL (log10)	1	10	6.1100	.52589	.16630
	2	2	6.4500	1.06066	.75000
IC50	1	10	.35	.479	.151
	2	2	.41	.414	.293

Independent Samples Test "t"

		Sig. (2-tailed)
TITULO VIRAL (log10)	Equal variances assumed	.482
IC50	Equal variances assumed	.873

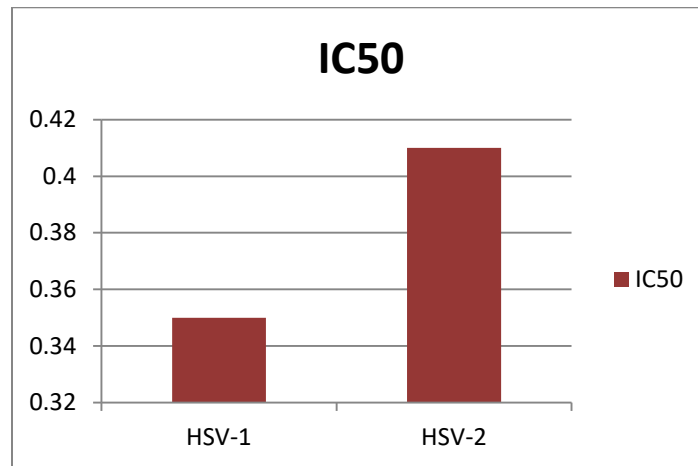
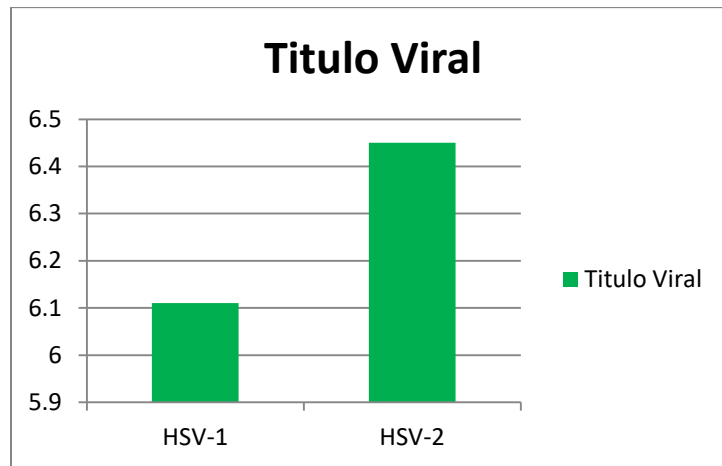


Figura 26. El análisis estadístico relacionado a las medias de los títulos virales y IC50

CAPITULO VII

DISCUSION

El presente trabajo constituye el primero de su tipo realizado en México, motivo por el cual los datos obtenidos son de gran aporte al programa nacional en contra de las Enfermedades de Transmisión Sexual y para futuros programas para la vigilancia, control y prevención de la infección por el VIH/SIDA.

Además de proporcionar estadísticas recientes sobre el comportamiento de la infección por virus del herpes en nuestro país. Se estudiaron un total de 50 pacientes que acudieron a la consulta de Dermatología del Hospital Universitario de Monterrey, por presentar una patología clínicamente diagnosticada como herpes oral o genital.

Se obtuvieron 10 muestras para VHS-1, mientras que para VHS-2 solo 2 muestras, estos resultados en el grupo de herpes tipo 2 pudieron ser debido a diferentes factores como:

- Diagnóstico clínico erróneo, por la aparente baja frecuencia y la poca afluencia de los pacientes en busca de asistencia médica.
- Tipo de lesión presentada al momento de la toma de la muestra. Para el aislamiento viral en cultivo celular las muestras más representativas eran las vesículas, sin embargo muchos pacientes acudían con las lesiones ya en fase de pústula, ulcera o costra.

- Tiempo transcurrido entre el inicio de síntomas y la toma de la muestra. Esto significa que a mayor número de días transcurridos es menor la posibilidad de aislar el virus.
- Pacientes que hayan estado con terapia antiviral previa a la toma de la muestra

El virus del herpes simple es un patógeno humano habitual que puede provocar gran morbilidad y mortalidad en las personas infectadas, especialmente en los jóvenes o en los inmunosuprimidos. Los dos serotipos del herpes virus generan lesiones clínicas muy parecidas pero suponen características distintivas a nivel molecular e inmunológicamente que les permite diferenciarse entre sí.

Una de las características más relevantes de VHS es su capacidad para establecer infecciones latentes en el cuerpo humano, especialmente en los ganglios neurales.

Varias regiones del genoma del VHS pueden relacionarse con la virulencia y el establecimiento de la infección clínica y el escape inmunológico. Las cepas virulentas a nivel mundial son de suma importancia ya que su identificación, así como su respuesta a los antivirales de uso común nos plantean retos para las nuevas generaciones de tratamientos y medidas preventivas como lo son las vacunas contra el virus del herpes simplex.

Una cepa vírica útil en una vacuna contra VHS-1 y VHS-2 puede no ser virulenta, es decir no revertir al estado de virulencia, debe proporcionar inmunidad demostrada y ser incapaz de transformar las células del huésped. Es por esto que la investigación y caracterización de las diferentes cepas a nivel nacional y en consecuencia a nivel

mundial es vital para la realización de las nuevas vacunas en contra del herpes virus.

Una de las formas ya antes descritas para evaluar la virulencia de las cepas de aislados clínicos es la de los modelos experimentales.

A pesar de su importancia médica considerable no existen reportes en México sobre los patrones de virulencia de nuestras cepas regionales.

Este estudio revela el patrón de nuestras cepas en el Noreste de México, siendo un nicho muy importante y un precedente para futuras investigaciones.

Los modelos animales son una aproximación experimental válida que permite llevar a cabo un análisis completo de la infección por el virus del herpes. En este escenario se pueden analizar los fenómenos clínicos de la infectividad del virus así mismo como la medición clínica por medio de escalas ya validadas.

En este trabajo se ha utilizado al ratón como modelo experimental ya que es el más ampliamente trabajado puesto que existe una gran cantidad de información en la bibliografía que permite comparar los resultados obtenidos. El modelo murino utilizado y el número de animales fue suficiente para aportar valores estadísticos significativos a los resultados.

En el modelo experimental murino de queratoconjuntivitis encontramos cepas virulentas para VHS-1 en base a la cepa de referencia. Siendo estadísticamente significativas las cepas de aislados clínicos utilizadas y la infección clínica reportada.

Además se encontraron 4 cepas de VHS-1 altamente virulentas mostrando las mayores escalas de severidad clínica. Se encontró una correlación estadísticamente significativa entre estas cepas y la mortalidad de los murinos.

Es importante resaltar que aunque estas cepas de aislados clínicos fueron virulentas, se demostró en estudios anteriores de Garza V. y Torres E. que estas cepas aún son sensibles a Aciclovir, lo que representa una ventaja en el tratamiento de esta infección.

En el modelo experimental de infección herpética vaginal no encontramos cepas de aislados clínicos virulentas en base a la cepa de referencia. Siendo estadísticamente significativas las cepas de aislados clínicos utilizadas y la infección clínica reportada.

Todas las cepas de aislados clínicos para VHS-2 también fueron sensibles a Aciclovir.

Un tema fascinante dentro de la investigación del herpes virus tipo 2 es la relación estrecha que se ha encontrado entre este y el VIH, aumentado significativamente el riesgo de transmisión del virus por inmunodeficiencia en aquellos pacientes con infecciones herpéticas. Esto ha llevado a múltiples investigaciones por su potencial efecto en la reducción de la susceptibilidad y consecuente transmisión del SIDA.

Existe una gran necesidad de una vacuna para herpes genital que prevenga esta infección especialmente en regiones como África en donde existe una co-epidemia de herpes genital y VIH.

En un estudio reciente se muestra que las cepas de aislados Africanos son más virulentas que las cepas aisladas en los Estados Unidos. Mostrando menor protección contra las vacunas experimentales, que las cepas de los Estados Unidos, lo cual indica que existen diferencias entre los determinantes antigénicos protectores de las cepas virales a nivel mundial.

De la misma manera podemos observar que los aislados del noreste de México presentan títulos virales más altos que la cepa SD90, sin embargo en el modelo experimental murino no desarrollaron lesiones clínicamente evaluables. Mientras que la cepa SD90 a títulos más bajos incluso que la cepa de referencia G fue altamente virulenta en los modelos murinos (27).

Esto confirma lo antes reportado de la gran variedad entre las cepas de virus herpes a nivel mundial, siendo imprescindible su investigación y reporte para valorar el adecuado uso y funcionamiento de las vacunas contra herpes.

Los resultados de este trabajo aportan a nivel nacional valiosa información sobre el comportamiento del herpes virus en nuestra región y exhorta la necesidad de estudios más detallados sobre la patogénesis, diversidad genética y determinantes antigénicos del herpes virus a nivel mundial.

CAPITULO VIII

CONCLUSIÓN

- Los aislados clínicos del noreste de México de VHS-1 evaluados son virulentos en un modelo experimental murino de queratoconjuntivitis.
- Los aislados clínicos del noreste de México de VHS-2 evaluados no son virulentos en un modelo herpético vaginal.
- Los aislados clínicos del noreste de México de VHS-2 evaluados son igual de virulentos que las cepas de Estados Unidos pero mucho menos virulentas que las cepas Africanas.
- Esta investigación es la primera en su clase que abre la pauta a estudios en otras zonas regionales en el país.
- Nuestras cepas de VHS-2 al no ser virulentas podrían ser buenos candidatos para desarrollar una vacuna recombinante y que esta disminuya la co-infección de VIH.

- Cepas de VHS-1 son altamente virulentas pero sensibles a Aciclovir.
- Al visualizar los patrones de virulencia se podrá encontrar una vacuna adecuada contra esta enfermedad.

CAPITULO IX

ANEXOS

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Estudio de virulencia de aislados clínicos de pacientes con infección activa por Herpes Simplex Virus, en dos modelos experimentales

Este documento de asentimiento informado va dirigido a los niños participantes del Estudio de virulencia de aislados clínicos de pacientes con infección activa por Herpes Simplex Virus, en dos modelos experimentales, para que conozcan su patología y tengan capacidad de juicio para comprender los fines de la investigación biomédica. La legislación nacional vigente, en materia de autonomía del paciente, reconoce dicha capacidad de juicio a los niños de 12 o más años.

YO, [nombre y

apellidos]_____

Declaro que:

1. Me han explicado el estudio que se llevara a cabo y mi participación en el, además de darme la Información y he entendido todo.
2. Mi médico ha contestado a todas las dudas que tenía sobre el estudio.

3. Sé que puedo decidir no participar en este estudio y que no pasa nada.
4. Sé que si decido participar me sacarán sangre en una sola ocasión, además de tomar muestra por medio de raspado de mis ampollas y que esto me puede doler un poco.
5. Sé que si cuando empiece el estudio tengo alguna duda, puedo preguntar a mi médico las veces que necesite.
6. Sé que cuando empiece el estudio y en cualquier momento puedo decir que ya no quiero seguir participando y nadie me reñirá por ello.
7. Sé que si decido dejar el estudio puedo pedir que mi sangre se elimine del banco de muestras.
8. He decidido participar en el estudio.

9. Granda, A.G., 3rd, P.J. Lehner, P. Cresswell, and T. Spies. 1997. Regulation of MHC class I heterodimer stability and interaction with TAP by tapasin. *Immunogenetics*. 46:477-83.
10. Jin, H., Y. Ma, B. S. Prabhakar, Z. Feng, T. Valyi-Nagy, Z. Yan, D. Verpooten, C. Zhang, Y. Cao, and B. He. 2009. The gamma 1 34.5 protein of herpes simplex virus 1 is required to interfere with dendritic cell maturation during productive infection. *J Virol* 83:4984-94.
11. Vazquez F, et al. Actualizacion en infecciones de transmission sexual: epidemiologia, diagnostic y tratamiento. *EnfermInfeccMicrobiolClin* 2004;22(7):392-411
12. Xu F, Sternberg MR, Kottiri BJ, McQuillan GM, et al. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *JAMA*. 2006;296(8):964-73
13. Agabi Y, et al. Seroprevalence of herpes simplex virus type 2 among patients attending the sexually transmitted infections clinic in Jos, Nigeria. *J Infect Dev Ctries* 2010;4(9):572-575
14. Rathore S, Jamwal A, Gupta Vipi. Herpes simplex virus type 2: seroprevalence in antenatal women, India *J Sex Transm Dis and AIDS*. 2010;31(1):11-15
15. Tayyebi D, Sharifi S. Seroepidemiology of infection with herpes simplex types 1 and 2 among asymptomatic university students attending Islamic Azad University of Kazeroun. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases*. 2010;5(2):84-88
16. Resik S, Enamorado A, Tallo Y, Suarez C, Kouri V. Prevalencia de anticuerpos contra virus herpes simples, virus Epstein-Barr y citomegalovirus en un grupo de pacientes con hemodiálisis. *Rev Cubana Med Trop* 1999;51(3):172-6

17. Conde C, Lazcano E, Hernandez C, Juarez I, Smith J, Hernandez M. Seroprevalencia de la infección por el virus herpes simplex tipo 2 en tres grupos poblacionales de la ciudad de México en Salud Publica de México Vol. 45, suplemento 5 de 2003
18. Zamilpa L, Uribe F, Juarez L, Calderon E, Conde C. Prevalencia y factores asociados con sífilis y herpes genital en dos grupos de población femenina en Salud Publica de México Vol. 45, suplemento 5 de 2003.
19. Wald A, Link K. Risk of human immunodeficiency virus infection in herpes simplex virus type 2-seropositive persons: A meta-analysis. J Infect Dis 2002; 185:45-52
20. Martínez J.M., Navarrete N., Santander E., Garmendia M.L., Gubelin W. Seroprevalencia de la infección por virus herpes simplex tipo 2 en pacientes atendidos en centros de referencia de ETS de Santiago. Rev. méd. Chile 2005; volumen 133, número 3.
21. Burns T. 2010. Rook's Textbook of Dermatology. Wiley-Blackwell. UK
22. Tilli M. Herpes genital y embarazo. DST – J bras Doenças Sex Transm 2004; vol. 16, pag. 48-52.
23. Aurelius E, Johansson B, Skoldenberg B, Staland A, Forsgren M. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. Lancet. 1991; 337: 189.
24. Murray P., Rosenthal K., Kobayashi G., Pfaller M. Virus herpes humanos. En: Microbiología Médica; Cuarta edición. España: Mosby; 2002, pag. 468-477.
25. Field AK, Biron KK. "The end of innocence" revisited: resistance of herpesvirus to antiviral drugs. Clinical Microbiology Reviews. 1994; 7:1-13.

26. Garza V, Torres E, Ocampo J, Morales P. Susceptibility against antivirals for Herpes simplex viruses in a northeastern population in Mexico (Tesis de titulacion en prensa)
27. Dudek T, Torres E, Crumpacker C, Knipe D. Evidence for differences in Immunologic and pathogenesis properties for Herpes Simplex Virus 2 strains from the United States and South Africa. *JID* 2011.
28. Morrison LA, Knipe DM. Immunization with replication-defective mutants of herpes simplex virus type 1: sites of immune intervention in pathogenesis of challenge virus infection. *J Virol.* 1994 Feb;68(2):689-96.
29. Morrison LA, Da Costa XJ, Knipe DM. Influence of mucosal and parenteral immunization with a replication-defective mutant of HSV-2 on immune responses and protection from genital challenge. *Virology.* 1998 Mar 30;243(1):178-87.
30. Cook, M.L., and J.G. Stevens. 1973. Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence for intra-axonal transport of infection. *Infect Immun.* 7:272-88.
31. Roizman, B. 1996. *Fields Virology.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia
32. <http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-Laboratory-animals.pdf>
33. Foster, C S., I.K. Sandstrom, P.A. Wells. 1988. Genetics studies on murine susceptibility to herpes simplex keratitis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 40:3

CAPITULO XI

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

La Dra. Cynthia Mendoza realizó sus estudios de medicina en el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM), donde se graduó con mención honorífica en 2007. Realizó su estancia académica rotatoria en el Hospital de la Santa Creu I Sant Pau, Barcelona, España en el Departamento de Medicina Interna y Dermatología. Posteriormente realizó la especialidad de Dermatología en el Hospital Universitario de Monterrey, N.L. donde se entrenó en la aplicación de láser y otras tecnologías aplicadas a la piel. Además de realizar el Doctorado en Medicina trabajando de la mano del Dr. Ernesto Torres-López investigador del BioMedical Imaging Laboratory de la Universidad de Harvard. Ganadora del premio nacional para autores de artículos de revisión en Dermatología en el 2012. Siendo muy joven la Dra. Cynthia ha mostrado interés en temas sociales siendo moderadora de la Asamblea General Plenaria y directora de la UNICEF del Modelo de las Naciones Unidas en México y como delegada en el Harvard National Model United Nations.

Su inquietud por la medicina se despierta desde muy temprano en su carrera asistiendo a congresos y cursos a nivel nacional e internacional: • 17 Congreso Internacional de Medicina ITESM “Endocrinología”. ITESM Campus Monterrey, N.L. Abril 2001 • Primer Congreso Internacional de Estudiantes de Medicina. UANL. Monterrey N.L. 2001 • 1er.

Congreso Internacional de Bioética “Medicina Entre la Ciencia y la Conciencia” UDEM, Monterrey N.L. Agosto 2001 • 18 Congreso Internacional de Medicina ITESM “Reproducción Humana”. ITESM Campus Monterrey, N.L. Abril 2002 • 19 Congreso Internacional de Medicina ITESM “Trasplantes”. ITESM Campus Monterrey N.L. Abril 2003 • “Actualización en Dermatología” del XXXIV Semestre de actualización para el Médico Cirujano. UANL. Monterrey N.L. Enero 2004 • Curso de formación sobre dermatitis de contacto, sección catalana de la sociedad española de dermatología y venereología. Barcelona, España. Noviembre 2005 • IV Converses Dermatopediatríques. Serveis de pediatria I dermatologia. Hospital del Mar. Barcelona, España. • Asistencia a las reuniones de la Sociedad Catalana de Dermatología durante los meses de Septiembre – Diciembre 2005. Barcelona España. • Congreso de Micología Médica. Monterrey N.L. del 24 al 26 de Mayo 2007. • Curso de programación Neuro-lingüística. Monterrey N.L. 2 y 3 de Junio 2007 • 4to Symposium Internacional de Neurocirugía Cerebrovascular. Monterrey N.L. 7 y 8 de Marzo 2008. • Curso de Actualización en Dermatología. Facultad de Medicina UANL. Monterrey 19 de marzo 2010 • LVI Congreso Anual de Terapéutica Dermatológica. Ciudad de México 14-17 de Abril 2010. • Taller de aplicación de toxina botulínica. Facultad de Medicina UANL y Sociedad de Dermatología de Nuevo León. Monterrey 19 de Mayo 2011. • Foro: Abordaje Integral del paciente con Melanoma. Facultad de Medicina UANL y Sociedad de Dermatología de Nuevo León. Monterrey 18 de Febrero 2012. • XVI Curso internacional de Dermatoscopía. Guadalajara 1-3 de Marzo 2012. • LVIII Congreso Anual de Terapéutica Dermatológica. Ciudad de México 18-21 de Abril 2012. • Tercer encuentro de Residentes de Dermatología. Veracruz, México 1-3 de Febrero 2013.

La Dra. Cynthia ha participado en proyectos de mejora institucionales y de comunidades, además de ser ponente de casos clínico a nivel nacional e internacional: • Participación como auditora hospitalaria en el Hospital San José Tec de Monterrey. Enero 2005-Diciembre 2005 • Participación en el proyecto de mejora en sa- Participación en el proyecto de mejora en salud para comunidades rurales, en conjunto con la universidad de Stanford y el ITESM. Agosto 2006 – Julio 2007 • Participación como congresista en el XXIII Con Participación como congresista en el XXIII Congreso Mexicano de Dermatología, Guadalajara Jalisco del 19 al 23 de Agosto 2008. • Participación como ponente de casos clínicos interesantes en la Sociedad de Dermatología de Nuevo León. Marzo 2010-2012 • Participación con poster: Pigmentación macu Participación con poster: Pigmentación macular eruptiva idiopática: Un reto diagnóstico. En VII Congreso Nacional de Dermatología Pediátrica. 26-29 de Mayo 2010. • Participación con poster: Monilethrix: Thera Participación con poster: Monilethrix: Therapeutic Option with Minoxidil 2%. En 21st European Academy of Dermatology and Venereology Congress in Prague, Czech Republic from 27-30 September 2012. • Participación con poster: Síndrome de KlippelTrenaunay: A propósito de un caso asociado a angioqueratomas cutáneos. En XIX Congreso Ibero Latinoamericano de Dermatología. CILAD 19 al 22 de septiembre de 2012, Sevilla España.

Dentro de su formación doctoral la Dra. Cynthia Mendoza realizó investigación en el campo de la virología con el estudio del patrón de virulencia de aislados clínicos de pacientes con infección activa por Herpes Virus, en dos modelos experimentales. Esta investigación fue llevada a cabo en conjunto con el Dr. Ernesto Torres López del BioMedical Imaging Laboratory de la Universidad de Harvard. Además de ser parte del equipo de investigadores de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud del

Tecnológico de Monterrey en la investigación de las células madre para la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Publicaciones 1: Vázquez H. Mendoza C. Vitamina C y fotoenvejecimiento cutáneo. Dermatología CMQ 2004; 2(1): 12-14 2: Vázquez H. Mendoza C. Arenas R. Onicomycosis por *Scytalidium* sp. Revisión de infecciones por *Scytalidium* a propósito de un caso de melanoniquia. Dermatología Rev Mex 2005;49:168-73

3: Vázquez H. Mendoza C. Termogénicos y lipolíticos ¿Realidad o ficción?. Avances. 2006;3(8): 8-13 4: Caro E. Mendoza C. Vázquez H. Malformaciones congénitas del sistema nervioso central y manifestaciones cutáneas: Una revisión. Avances. 2007;4(12) 5: Caro E. Mendoza C. Aplasia cutis congénita con hemorragia del seno sagital superior: tratamiento, implicaciones neuroquirúrgicas y seguimiento de un caso a 18 años. Arch Neurocienc. 2009; 2 (14): 127-131 6: Caro E. García R. Mendoza C. Neuroendoscopia: una visión general. La experiencia en el Hospital San José Tec de Monterrey. Avances. 2010; 20 (7) 7: Mendoza C. Ocampo J. Vázquez O. Las células madre en el proceso de anti-envejecimiento cutáneo: el entendimiento de una nueva era. Dermatología DCMQ. 2012;10(1):37-45 8. Mendoza C. Eichelmann K. Welsh O. El papel de las tirosin kinasas en el campo de la Dermatología. Actualizaciones Terapéuticas Dermatológicas y Estéticas. Argentina, En prensa. 9. Mendoza C., Torres-L E., Ocampo J., Morales P., Padilla G., Vazquez O. Estudio del patrón de virulencia de aislados clínicos de pacientes con infección activa por Herpes Virus, en dos modelos experimentales. Gaceta Médica de México, En prensa.