

Detección de la presencia de antígeno y ADN de virus herpes simple tipo 1 en ganglios trigeminales humanos

Viral DNA and Antigen Detection of Type 1 Herpes Simplex Virus in Human Trigeminal Ganglia

115

Univ Odontol. 2012 Ene-Jun; 31(66): 115-123. ISSN 0120-4319

CIENCIAS BÁSICAS, BIOTECNOLOGÍA Y BIOINFORMÁTICA

Lilia Jadith Bernal Cepeda

Odontóloga, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Leidy Viviana Ávila Adarme

Odontóloga, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Lina María Marín Gallón

Odontóloga, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Jorge Alfonso Casas Martínez

Odontólogo, especialista en Odontología Forense, docente, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Magíster en Antropología Forense, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Odontólogo forense, Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Bogotá, Colombia.

Sonia del Pilar Bohórquez Ávila

Odontóloga, profesora asistente, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Magistra en Patología Bucal, Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Silvia Barrientos Sánchez

Odontóloga, docente, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Especialista en Estomatología, magistra de Microbiología, directora de Departamento del Sistema Bucal, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Jaime E. Castellanos

Odontólogo, magíster en Ciencias Farmacológicas, doctorado en Ciencias Químicas, profesor catedrático titular, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Trabajo de investigación institucional del grupo de Patogénesis Infecciosa, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Bernal LJ, Ávila LV, Marín LM, Casas JA, Bohórquez S del P, Barrientos S, Castellanos JE. Detección de la presencia de antígeno y ADN de virus herpes simple tipo 1 en ganglios trigeminales humanos. Univ Odontol. 2012 Ene-Jun; 31(66): 115-123

Recibido para publicación: 14-02-2012
Aceptado para publicación: 31-03-2012

Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/universitasodontologica>

RESUMEN

Antecedentes: la infección por virus herpes simple tipo 1 (VHS-1) es una de las más frecuentes en la población humana; produce infecciones en mucosa oral, piel, ojos e incluso en el sistema nervioso, que causa encefalitis. Después de la infección en la región orofacial, este virus puede permanecer en estado de latencia en el ganglio trigémino y eventualmente reactivarse. **Objetivo:** determinar la presencia de VHS-1 en ganglios trigeminales humanos mediante pruebas paralelas de PCR, RT-PCR e inmunohistoquímica. **Métodos:** previa aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia y del Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses, se recolectaron dieciséis pares de ganglios trigeminales humanos, que se procesaron tanto para extracción de ácidos nucleicos como para inmunohistoquímica. **Resultados:** en seis de los ocho donantes analizados por inmunohistoquímica se encontró marcaje positivo para antígeno de VHS-1. Se halló que nueve de los donantes evaluados por PCR para VHS-1 y cinco de los diez examinados para transcritos asociados a latencia (LAT) fueron positivos. **Conclusión:** se encontraron ganglios trigeminales en los que no se detectó virus y otros con distintos estados de infección (activa y latente). En casi todos los ganglios fue evidente el infiltrado inflamatorio asociado. El presente es el primer trabajo en el que se busca sistemáticamente tanto genoma viral como proteínas y transcritos LAT en ganglios trigeminales humanos, lo cual abre puertas para la investigación tanto de la epidemiología como de los fenómenos asociados a la LAT y reactivación del VHS-1.

PALABRAS CLAVE

Virus herpes simple, ganglio trigeminal humano, infección, latencia.

ÁREAS TEMÁTICAS

Virología, genética, inmunohistoquímica.

ABSTRACT

Background: Infection by type 1 Herpes Simplex Virus (HSV-1) is the most frequent viral infection in human population being able to cause injuries in oral mucosa, skin, cornea, and even the central nervous system causing encephalitis. After mucosal infection, HSV-1 establishes a lifespan latent infection in trigeminal ganglia where it occasionally reactivates infecting primary sites again. It is little known about cell and molecular events responsible for infection reactivation and immune response in human ganglia. **Objective:** To standardize the obtaining and processing of human trigeminal ganglia to detect specific HSV antigen, DNA and RNA. **Methods:** After approval of the study by the Universidad Nacional IRB, 32 trigeminal ganglia were obtained from 16 cadavers from the Colombian Forensic Medicine Institute. **Results:** Using PCR technique to detect viral DNA, it was found that 56.3% of ganglia (9/16) amplified specific fragment and five out of ten with suitable quality RNA were positive for latency associated transcript. **Conclusion:** Some trigeminal ganglia did not show evidence of infection and some had different HSV-1 infection status (active or latent) with inflammatory cells infiltrate in almost all samples. This is the first work that detects simultaneously genome, proteins and LAT of HSV-1 in human trigeminal ganglia, leading to explore findings about the latency and reactivation process.

KEY WORDS

Herpes simplex virus, human trigeminal ganglia, infection, latency.

THEMATIC FIELDS

Virology, genetics, immunohistochemistry.

INTRODUCCIÓN

La infección causada por herpes simple virus tipo 1 (VHS-1) es de alta prevalencia. Se calcula que del 60 al 80% de la población adulta presenta anticuerpos de tipo inmunoglobulina G (IgG) asociados a exposición al virus (1). El VHS-1 es un miembro de la familia de los *Herpesviridae* que posee un ADN de doble cadena. La infección inicial, que puede ser sintomática o no, ocurre en las células epiteliales de las membranas mucosas o en la piel de la región orofacial (2,3).

El contagio sucede principalmente por el contacto directo con secreciones generadas por individuos infectados. Luego de la primoinfección, se presenta un cuadro de gingivostomatitis herpética que afecta toda la mucosa oral, el virus viaja de manera retrógrada y se establece en el ganglio trigémino (GT) en estado de latencia sin producción de virus. Después de ciertos estímulos, como exposición a luz ultravioleta, fiebre, estrés, inmunosupresión, frío intenso y otras infecciones, el virus se reactiva en algunas de las neuronas infectadas, que ensamblan nuevas partículas virales que se transportan a través de los axones y se liberan en el epitelio nuevamente, lo que se denomina infección recurrente (4). En general, los pacientes con esta condición muestran síntomas prodrómicos de hormigueo, ardor o dolor en el sitio donde aparecerán las lesiones vesiculares que se ulceran y sanan en un tiempo aproximado de una semana, sin dejar cicatriz.

Para establecer y mantener el estado de latencia es necesario que el virus limite la expresión de sus genes. De hecho, la unidad de transcripción predominante, y quizás la única producida durante la fase de latencia es LAT (transcrito asociado a la latencia), el cual es expresado y mantenido en el núcleo neuronal como un ARNm (5). Estudios previos han mostrado que el 90% de los GT humanos presentan copias de ADN viral, aunque este porcentaje es muy variable y no depende ni del sexo ni de la edad (6). Aunque otros autores, como Montani y colaboradores, en un estudio sobre 121 individuos encontraron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que solo el 61% de las muestras tenían copias de ADN viral (7); Cohrs y colaboradores, en su investigación sobre 17 sujetos, no hallaron diferencias en el número de copias de ADN viral entre los ganglios derecho e izquierdo y en ambos el virus permanece simultáneamente en latencia (8).

A pesar que se han realizado reportes sobre la prevalencia de la infección por este patógeno en el GT en humanos, resulta importante estandarizar las téc-

nicas de biología molecular necesarias para evaluar la presencia simultánea de antígeno viral, ADN, ácido ribonucleico (ARN) mensajeros y transcritos virales asociados a LAT. El objetivo general del estudio fue obtener y procesar tejido de GT humano para detectar ADN, transcritos virales, LAT y proteínas de VHS-1, por técnicas de PCR, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) e inmunohistoquímica, respectivamente, con el propósito de iniciar la caracterización básica de esta patología en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo es una serie de casos, con un diseño experimental prospectivo. Previa aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia, se obtuvieron 32 GT humanos de 16 cadáveres con no más de 24 h post mortem en el Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Bogotá. Luego de la disección, uno de los GT se almacenó en PBS frío para la extracción de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y el otro ganglio se fijó en paraformaldehído al 4% durante 48 h, se lavó con PBS y se sumergió tres días en sacarosa al 30% para la prueba de inmunohistoquímica. Estas muestras se incluyeron en medio OCT y se congelaron a -20°C , se realizaron cortes de $14\ \mu\text{m}$ en crióstato, que se pusieron en láminas previamente tratadas con una solución de gelatina al 1% (Sigma), sulfato-cromo-potasio al 0,1% (Merck) y azida de sodio al 0,1% (Merck) y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Inmunohistoquímica

Se realizó inmunohistoquímica para detectar los antígenos de VHS-1 y para neurofilamento como control positivo de la técnica. Los cortes se hidrataron con PBS por 10 min, se permeabilizaron por 30 min con Tritón X-100 al 0,1% en PBS. Posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 0,5% en PBS por 45 min. Los sitios inespecíficos se bloquearon con suero bovino de recién nacido (SBRN) al 10% en PBS por 30 min. El antígeno viral se detectó incubando por 16 h con un anticuerpo primario anti-VHS-1 (DAKO), preparado en SBRN al 5% en una cámara húmeda a 4°C .

Después de lavar el anticuerpo secundario anticonejo biotinilado (Vector BA-9200), se preparó en SBRN al 5% en PBS y se puso sobre los cortes durante 30 min a temperatura ambiente y se adicionó la estreptavidina acoplada a peroxidasa (Vector) a una concentración de $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$. La interacción de antígeno-anticuerpo primario, secundario y estreptavidina peroxidasa se

reveló con una mezcla de diaminobencidina al 0,1% en Tris-HCl 0,1 M, pH de 7,6 y H₂O₂ al 0,02% en agua destilada, a una proporción 1:1. Posteriormente se realizó una contracoloración con *hemalum* de Mayer, se lavaron con agua destilada, dejando secar los cortes y se realizó el montaje en Entellan. Los cortes se observaron, evaluaron y fotografiaron usando un microscopio Leitz Laborlux-12.

Extracción de ADN y PCR

Con la mitad del segundo GT, se extrajo ADN usando el método descrito por Sambrook y Russell con proteinasa K y fenol (9). Al ADN obtenido se le realizó PCR para la amplificación de un fragmento del gen de la polimerasa viral y un fragmento del gen de β -actina como control de calidad de la extracción y de la amplificación.

RT-PCR para ARNm de HSV-1 y LAT

La extracción de ARN de los ganglios se realizó sobre la segunda mitad del ganglio trigeminal, siguiendo la técnica de tiocianato de guanidinio/cloroformo (Gibco BRL Trizol). El ARN obtenido se resuspendió en 30 μ l de agua libre de ARNasas (DEPC 0,1%), se cuantificó por espectrofotometría ultravioleta y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

La transcripción reversa se hizo siguiendo los protocolos reportados (10), a partir de 200 ng de cada muestra de ARN usando un *primer* oligo-(dT) y amortiguador (*buffer*) de retrotranscripción (amortiguador 5X, dNTPs-10 mM, ARNsin-40 U/ μ l, enzima transcriptasa reversa M-MLV 200 U/ μ l). La reacción se realizó en termociclador durante 60 min 42 °C. El cADN sintetizado se almacenó a -20 °C hasta su uso.

La PCR para la polimerasa de VHS-1, β -actina y LAT se realizó a partir de reacciones individuales de 25 μ l que contenían: 300 ng de muestra de cADN y/o ADN, Master Mix (amortiguador de PCR 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,5 μ M, enzima Taq polimerasa 0,25 μ l, además de los *primers* específicos para cada gen) completados con agua desionizada. Un fragmento de 129 pares de bases del gen de la polimerasa de VHS-1 se amplificó usando el *primer* sentido TIA 0,5 μ M, 5' CTG CCG GAC ACC CAG GGG CG 3' y el *primer* antisentido TIB-1 0,5 μ M, 5' CCC GCC CTC CTC GCG TTC GT 3'(10).

El fragmento del gen de LAT de 115 pares de bases se amplificó usando el *primer* sentido LAT-R 0,5 μ M, 5' CAC CAG CCG GTC TTT AGT GT 3' y el *primer* antisentido LAT-L 0,5 μ M, 5' CGA GAT CCA TCC AAC ACA GA 3'. Para normalizar los datos se empleó el gen para β -actina de 101 pares de bases, cuyo *primer* sentido es el ACTB R (0,5 μ M), 5' ACT CCT GCT TGC TGA TCC AC 3' y el *primer* antisentido es el ACTB L (0,5 μ M), 5' GAT CAT TGC TCC TCC TGA GC 3'.

Las condiciones utilizadas en el termociclador (BIO RAD) para los diferentes genes de VHS-1 fueron: temperatura inicial 94 °C por tres minutos, 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 64 °C por 60 segundos, 72 °C por 60 segundos y extensión final a 72 °C por 10 minutos; LAT temperatura inicial 95 °C por cinco minutos, 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 60 segundos, 72 °C por 30 segundos, extensión final a 72 °C por 5 minutos y para amplificar β -actina las condiciones fueron temperatura inicial 95 °C por dos minutos, 30 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos, extensión final a 72 °C por 5 minutos (11).

Para determinar la presencia de los amplicones esperados como resultado de cada PCR, se realizaron electroforesis individuales para cada gen en gel de agarosa 2% en TBE con bromuro de etidio. Se prepararon 12 µl de mezcla para la electroforesis con 2 µl de amortiguador de carga (Blue/Orange 1X-xilene cyalone, azul de bromofenol, naranja de acridina) y 10 µl de muestra.

RESULTADOS

De los 16 GT humanos recolectados en PBS, se obtuvieron 16 muestras adecuadas de ADN y 10 muestras de ARN; mientras que de los 16 GT conservados en paraformaldehído solo 8 tuvieron calidad óptima para el procesamiento por inmunohistoquímica. El resumen de los hallazgos de cada una de las muestras procesadas se puede ver en la tabla 1.

TABLA 1
RESUMEN DE DATOS

Donante	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Inmunohistoquímica neurofilamento	NR	+	+	+	+	+	+	+	+	NR						
Inmunohistoquímica virus herpes	NR	+	+++	+	-	++	++	-	+++	NR						
Extracción ADN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Extracción ARN	NR	NR	+	+	+	+	NR	NR	NR	NR	+	+	+	+	+	+
PCR β-actina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PCR virus herpes	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
RT-PCR β-actina	NR	NR	-	+	-	+	NR	NR	NR	NR	+	+	+	+	+	+
RT-PCR transcritos LAT	NR	NR	-	+	-	+	NR	NR	NR	NR	-	+	+	+	-	-

NR: no realizado (deficiente calidad de la muestra).

(-): no detección, muestra negativa.

(+): muestra positiva o presencia de antígeno asociado a fibras o células satélite.

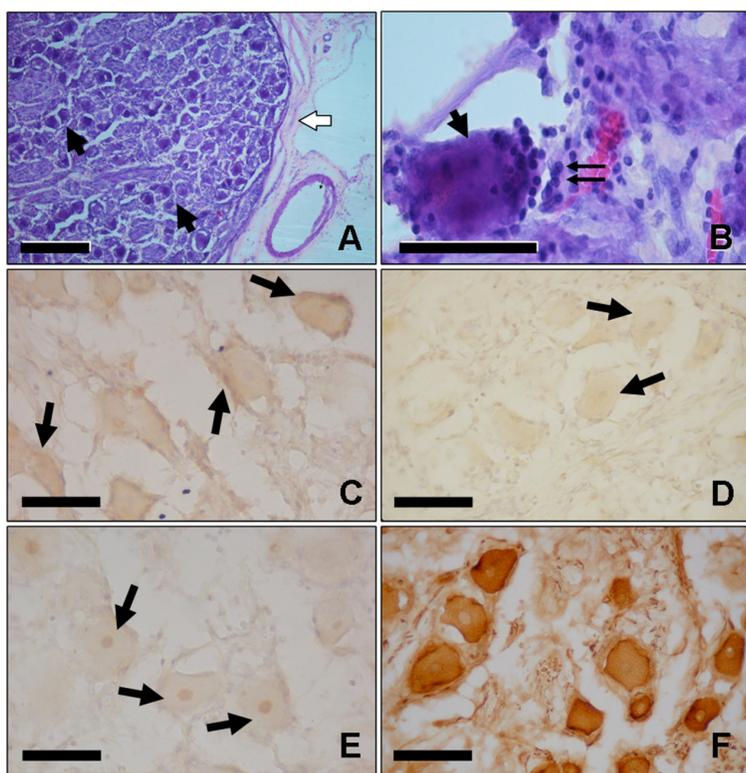
(++): antígeno en núcleo o citoplasma de neuronas (< 10 células positivas por campo).

(+++): antígeno en núcleo o citoplasma de neuronas (> 10 células positivas por campo).

Hallazgos histológicos

De la periferia hacia el centro en los GT humanos se observa la cápsula laminar de tejido conectivo denso, seguida de tejido conectivo laxo y vasos sanguíneos de diferentes calibres; se hallan neuronas pseudounipolares características de los ganglios sensoriales y los somas están rodeados abundantemente por células satélite. El núcleo de las células de Schwann es fusiforme; hay fibras nerviosas teñidas con hematoxilina que constituyen la raíz del nervio y atraviesan el ganglio antes de salir. Hay fibras colágenas y gran cantidad de fibroblastos que se tiñen con eosina. Se evidencia infiltrado inflamatorio crónico en la mayoría de los casos constituido por linfocitos y plasmocitos, principalmente. En algunos casos se observan indicios de necrosis debida a desnaturalización proteica posiblemente dada por isquemia post mórtem (figura 1).

FIGURA 1
FOTOMICROGRAFÍAS DE GANGLIOS TRIGEMINALES HUMANOS



A) Vista panorámica de un ganglio trigeminal teñido con H&E, donde se observan gran cantidad de neuronas (flechas negras) y la cápsula de tejido conjuntivo (flecha blanca). La barra corresponde a 100 mm. B) Detalle de un ganglio teñido con H&E. Se observa una neurona (flecha negra) y núcleos que son parte de un infiltrado inflamatorio (doble flecha delgada). La barra corresponde a 40 mm. C) Imagen de cortes de ganglios trigeminales humanos procesados por inmunohistoquímica para la detección del antígeno de VHS-1. En esta fotomicrografía se observa marcación positiva para el virus en neuronas y en células satélite (flechas negras). Barra 30 mm. D) Patrón de marcación débilmente positiva, en el que se observa antígeno en el citoplasma o núcleos de algunas neuronas (flechas negras). Barra 30 mm. E) Marcación en el citoplasma o núcleos de neuronas, intensamente marcados. Note los núcleos inmunorreactivos al antígeno de HSV-1 (flechas negras). Barra 30 mm. F) Procesamiento de un corte de ganglio humano para la detección de la propina neurofilamento, como un control positivo de la técnica de inmunoperoxidasa. Barra 30 mm.

Descripción de las muestras procesadas por Inmunohistoquímica

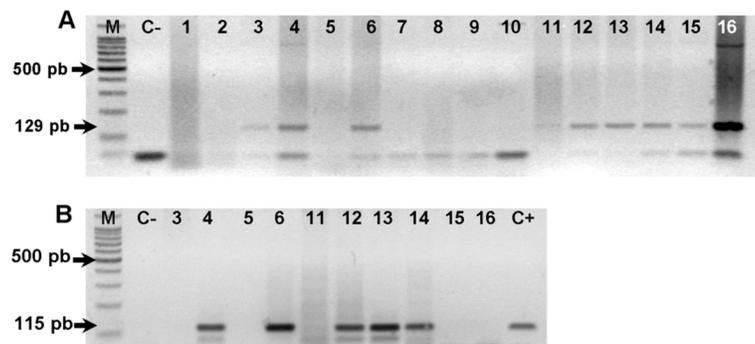
Las muestras 2 a 9 se procesaron para inmunohistoquímica, las demás (1 y 10 a 16) se descartaron por su deficiente calidad histológica. Como control positivo se realizó inmunohistoquímica para detección de neurofilamento. Luego se hizo la detección de antígeno viral de VHS-1. Según los resultados encontrados en la inmunohistoquímica para VHS-1 con el anticuerpo primario se clasificaron las muestras en cuatro grupos: no detección de Ag, Ag asociado a fibras o células satélite, Ag en núcleo o citoplasma de neuronas (<10 células positivas/campo), Ag en núcleo o citoplasma de neuronas (>10 células positivas/campo). Se encontró por inmunohistoquímica que 6 de los 8 donantes analizados para esta prueba tuvieron marcaje positivo para antígeno de VHS-1 (75%).

Hallazgos ADN y ARN viral

Las amplificaciones del ADN y cADN viral VHS-1 y para el gen reportero se realizaron a partir de tejidos de GT humano siguiendo el protocolo descrito

en la sección de “Materiales y métodos”. Se obtuvo ADN de buena calidad de los 16 donantes y solo se obtuvo ARN de 10 de los 16; las demás muestras se descartaron. Esto se evaluó realizando la amplificación del gen de β -actina; la presencia de los amplicones producto de la PCR se hizo evidente luego de la electroforesis en gel de agarosa. Según la intensidad de la banda, se clasificaron las muestras en categorías de calidad buena, regular o deficiente. Se encontró que el 87,5% de las muestras de ADN (14 de 16 muestras) amplificó correctamente β -actina, mientras que el 80% de las muestras de cADN (8 de 10) amplificaron β -actina por la RT-PCR (figura 2).

FIGURA 2
ELECTROFESIS EN GEL DE AGAROSA PARA OBSERVAR LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICOS PARA VHS-1



A) Amplificación del ADN de VHS-1 usando el protocolo descrito en la sección “Materiales y métodos”. Los números corresponden a cada uno de los donantes. Se observa una banda de 129 pb en algunos de ellos. B) Amplificación por RT-PCR de los ARN correspondientes a transcritos asociados a latencia (LAT), que muestran un amplicón de 115 pb. De los 16 donantes, se obtuvo ARN de buena calidad en 10 de ellos y de estos, 5 amplificaron el transcrito LAT.

Después de amplificar por PCR y RT-PCR el ADN y cADN obtenidos de cada muestra, usando *primers* específicos para VHS-1, se encontró que 9 de las 16 (56,3%) de las muestras de ADN procesadas mostraron el amplicón específico para VHS-1. En las muestras de los donantes 12 y 13 se obtuvo un producto inespecífico de 220 pb aproximadamente. Para descartar que estas bandas pertenecieran a transcritos de VHS-2 se realizó una PCR utilizando *primers* específicos para el virus, pero tampoco se obtuvo amplificación.

La amplificación de los ARN mensajeros de LAT se realizó a partir de tejidos de GT humano siguiendo el protocolo descrito en la sección de “Materiales y métodos”. Luego de la amplificación hecha por RT-PCR de los ARN obtenidos usando *primers* específicos para LAT se encontró que 5 de las 10 muestras procesadas (el 50%) presentaron amplicones del tamaño previsto para LAT (figura 2).

DISCUSIÓN

Todos los ganglios analizados con la tinción de hematoxilina/eosina presentaron infiltrado inflamatorio crónico con predominio de linfocitos y plasmocitos; pero no se observó pérdida de la integridad neuronal. Theil y colaboradores encontraron infiltrado inflamatorio en 30 de los 42 GT humanos analizados, únicamente en los ganglios infectados con VHS-1, lo que

demuestra que la infección latente se acompaña de un proceso inflamatorio crónico en el ganglio, pero sin causar daño neuronal (12). Los hallazgos histológicos coinciden con experimentos hechos en animales que muestran la existencia de inflamación crónica asociada a la infección por VHS-1 (13,14).

Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Pevenstein y colaboradores, quienes analizaron un ganglio de cada uno de 15 donantes y encontraron que el 53% eran positivos para VHS-1 mediante el uso de PCR (15). Cohrs y colaboradores, en un estudio con 17 individuos, mediante PCR hallaron que 11 tenían ADN de VHS-1 en ambos GT, un individuo tenía VHS-1 en un solo GT y 5 de los sujetos resultaron negativos para VHS-1 (70,6% positivo) (8).

En el trabajo de Liedtke y colaboradores se reportó que todos los 39 individuos estudiados resultaron positivos para VHS-1 mediante PCR (16). Por otra parte, en 147 individuos en los que se buscó ADN viral y se correlacionó con edad, sexo y tiempo post mórtem se concluyó que el 89,1% de los sujetos resultaron positivos para VHS-1 y no se encontró relación con la edad ni con el sexo (6). En el estudio del 2010 de Inohue y colaboradores se procesaron 414 GT humanos provenientes de 207 individuos, mediante técnica de PCR. Se detectó ADN viral en 251 de las muestras (60,6%) y en 134 de los cadáveres (64,7%). En relación con el sexo 72/124 hombres y 62/83 mujeres mostraron un resultado positivo; no se observó una diferencia significativa en los resultados positivos entre GT derecho e izquierdo, ni entre el sexo de los individuos, pero sí se encontró que la prevalencia del VHS-1 fue mayor en los sujetos de edad avanzada (17).

En el 2005, Wang y colaboradores realizaron un estudio utilizando microdissección por captura láser, hibridación in situ y PCR en tiempo real en 10 individuos, y encontraron que del 16 al 20% de las células neuronales de GT humanos analizados expresaban LAT; mientras que en el presente estudio se encontró que el 50% de los ganglios analizados, de los que se obtuvo ARN de buena calidad, amplificaron para LAT (18).

Las muestras de los donantes 4 y 6 fueron positivas para antígeno, ADN viral y se encontraron también transcritos asociados a LAT, lo que puede catalogarse como casos típicos de infección latente, en los cuales es posible que no se apague por completo la expresión viral génica y se transcribieran los genes inmediatamente tempranos ICP0 e ICP4 como se ha descrito (19). En las muestras 12, 13 y 14 se encontró ADN viral y

LAT; por lo tanto, estos individuos se pueden considerar con infección latente clásica (20). Las muestras del donante 5 fueron negativas en las tres pruebas (antígeno, ADN viral y LAT), y así se trata de un caso característico de ausencia de infección.

El donante 8 fue negativo para antígeno y ADN viral, mientras que el 1 y el 10 fueron negativos para ADN viral, de lo cual se podría pensar que también eran individuos no infectados o que el ganglio procesado no era positivo. En la muestra del donante 3 se encontró la presencia de antígeno y ADN viral, pero no de transcritos para proteínas ni LAT (debido a que el ARN de partida fue deficiente para estas pruebas). A pesar de esto, se podría pensar en un individuo con infección en fase aguda. Los donantes 11, 15 y 16 presentaron ADN viral, pero no transcritos para proteínas virales ni LAT, lo cual podría estar relacionado con que los *primers* usados para la PCR evalúan presencia de la polimerasa viral, que es un gen temprano o β ; pero no tienen en cuenta la familia de genes tardíos o β . En las muestras de los donantes 2, 7 y 9 se encontró antígeno pero no ADN viral, lo que puede deberse a la deficiente calidad de la muestra de ADN. Al realizar la PCR en las muestras de los donantes 15 y 16, no se obtuvo amplificación para β -actina, pero sí para ADN de VHS-1, por lo que puede pensarse en un mecanismo del virus que le permite evitar la degradación de su ADN antes que el ADN humano (21).

CONCLUSIÓN

En este trabajo se logró adaptar la metodología para el procesamiento simultáneo de muestras de GT humano y de esta manera establecer la prevalencia de VHS-1 en las muestras estudiadas. Este estudio reporta las condiciones para el procesamiento de muestras de GT tanto para PCR como para inmunohistoquímica, lo cual permitirá establecer los patrones de infección y latencia en GT humano e iniciar estudios acerca de la respuesta inmune localizada, que permite establecer la latencia y la reactivación del virus, sin causar daño neuronal en la mayoría de los casos.

AGRADECIMIENTOS

Al Grupo de Patogénesis Infecciosa, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia; al Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Bogotá, Colombia, y al Instituto de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

REFERENCIAS

1. Lehman I, Boehmer P. Replication of herpes simplex virus ADN. *J Biol Chem.* 1999 Oct; 274:28059-62.
2. Enquist W, Husak J, Banfield W, Smith G. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res.* 1998; 51: 237-347.
3. Roizman B, Knipe, D. Herpes simplex viruses and their replication: fundamental virology. 2001; 4: 1123-83.
4. Marozin S, Prank U, Sodeik B. Herpes simplex virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell-cell contact sites. *J Gen Virol.* 2004 Apr; 85: 775-86.
5. Stevens J, Wagner E, Devi-Rao G, Cook M, Feldman LT. RNA complementary to a herpes virus gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science.* 1987 Feb; 235: 1056-9.
6. Hill J, Ball M, Neumann D, Azcuy A, Bhattacharjee PS, Bouhanik S, Clement C, Lukiw WJ, Foster TP, Kumar M, Kaufman HE, Thompson HW. The high prevalence of herpes simplex virus type 1 ADN in human trigeminal ganglia is not a function of age or gender. *J Virol.* 2008 Aug; 82: 8230-4.
7. Motani H, Sakurada K, Ikegaya H, Akutsu T, Hayakawa M, Sato Y, Yajima D, Sato K, Kobayashi K, Iwase H. Detection of herpes simplex virus type 1 ADN in bilateral human trigeminal ganglia and optic nerves by polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 2006 Dec; 78: 1584-7.
8. Cohrs R, Randall J, Smith J, Gilden D, Dabrowski C, van Der Keyl H, Tal-Singer R. Analysis of individual human trigeminal ganglia for latent herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus nucleic acids using real-time PCR. *J Virol.* 2000 Dec; 74: 11464-71.
9. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
10. Marín L. Expresión de oligoadenilato sintetasa 1b (Oas-1b) en neuronas trigeminales infectadas con HSV-1. Bogotá: Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia; 2007.
11. Prada-Arismendy J, Castellanos JE. Genes de susceptibilidad/resistencia a flavivirus, implicaciones en la severidad de la infección. *Acta Biol Colomb.* 2006; 11: 21-30.
12. Theil D, Derfuss T, Paripovic I, Herberger S, Meinel E, Schueler O, Strupp M, Arbusow V, Brandt T. Latent herpes virus infection in human trigeminal causes chronic immune response. *Am J Pathol.* 2003 Dec; 163: 2179-84.
13. Cantin E, Hinton D, Chen J, Openshaw H. Gamma interferon expression during acute and latent nervous system infection by herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 1995 Aug; 69: 4898-4905.
14. Chen S, Graber D, Schaffer P, Knipe M, Coen DM. Persistent elevated expression of cytokine transcripts in ganglia latently infected with herpes simplex virus in the absence of ganglionic replication or reactivation. *Virology.* 2000 Dec; 278: 207-16.
15. Pevenstein S, Williams R, McChesney D, Mont E, Smialek JE, Straus SE. Quantitation of latent varicella-zoster virus and herpes simplex virus genomes in human trigeminal ganglio. *J Virol.* 1999 Dec; 73: 10514-8.
16. Liedtke W, Opalka B, Zimmermann CW, Lignitz E. Age distribution of latent herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus genome in human nervous tissue. *J Neurol Sci.* 1993 May; 116: 6-11.
17. Inoue H, Motani-Saitoh H, Sakurada K, Ikegaya H, Yajima D, Hayakawa M, Sato Y, Otsuka K, Kobayashi K, Nagasawa S, Iwase H. Detection of varicella-zoster virus ADN in 414 human trigeminal ganglia from cadavers by the polymerase chain reaction: a comparison of the detection rate of varicella-zoster virus and herpes simplex virus type 1. *J Med Virol.* 2010 Feb; 82: 345-9.
18. Wang K, Lau Y, Morales M, Mont E, Straus SE. Laser-capture microdissection: refining estimates of the quantity and distribution of latent herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus ADN in human trigeminal ganglia at the single-cell level. *J Virol.* 2005 Nov; 79: 14079-87.
19. Puga A, Notkins A. Continued expression of a Poly(A)+ transcript of herpes simplex virus type 1 in trigeminal ganglia of latently infected mice. *J Virol.* 1987 May; 61: 1700-3.
20. Nicoll MP, Proença JT, Efstathiou S. The molecular basis of herpes simplex virus latency. *Microbiol Rev.* 2012 May; 36: 684-705.
21. Sablina OV, Dymshits GM. DNA degradation of cultured mammalian cells infected with herpes simplex virus. *Tsitologia.* 1978 Jul; 20: 764-9.

CORRESPONDENCIA

Lilia Jadith Bernal Cepeda
ljbernalc@unal.edu.co

Leidy Viviana Ávila Adarme
lvavilaa@unal.edu.co

Lina María Marín Gallón
linamarin18@hotmail.com

Jorge Alfonso Casas Martínez
alfocasas57@gmail.com

Sonia del Pilar Bohórquez Ávila
spbohorqueza@unal.edu.co

Silvia Barrientos Sánchez
sbarrientoss@unal.edu.co
barrien@javeriana.edu.co

Jaime E. Castellanos
jecastellanosp@unal.edu.co