

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



MECANISMOS MOLECULARES DE EVASION INMUNE EN
LA INFECCION POR CITOMEGALOVIRUS HUMANO

TRABAJO MONOGRAFICO
DE ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
MARIA DEL ROCIO MIRANDA GARCIA

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Marisol López López
Vocal: Prof. Saturnino de León Chapa
Secretario: Prof. Rosana Pelayo Camacho
1er Suplente: Prof. Irma Ofelia Bernal Lugo
2do Suplente: Prof. Fernando García Tamayo

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

♣ Laboratorio Multidisciplinario de Investigación,
Dpto. de Inmunología, EMGS

♣ Hemeroteca de la Facultad de Medicina
(UNAM)

♣ Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas
(UNAM)

Asesor del Tema:

Rosana Pelayo
M en C. Rosana Pelayo Camacho

Sustentante:

Rocio Miranda
María del Rocío Miranda García

**"LA CIENCIA ES LA ÚNICA QUE PUEDE
CONTESTAR A ESO, AUNQUE AÚN SEA
ALGO PREMATURO HACERLO"**

MELVIN CALVIN.

A MI MADRE, GRACIAS.

A MI PADRE †

**CON PROFUNDO RESPETO Y VENERACIÓN A
LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO, ESPECIALMENTE A LA FACULTAD DE
QUÍMICA, BAJO CUYO ABRIGO Y MIRADA
EJEMPLARES TUVE EL HONOR Y LA
SATISFACCIÓN DE EDUCARME.**

**AGRADEZCO DE FORMA MUY ESPECIAL A
ROSANA PELAYO POR SU APOYO, CONFIANZA Y
DEDICACIÓN EN LA ELABORACIÓN DE ESTE
TRABAJO.**

**AGRADEZCO A LOS INTEGRANTES DEL
JURADO EL TIEMPO DEDICADO A LA REVISIÓN
PUES ELLO PERMITIÓ EL ENRIQUECIMIENTO DE
ESTE TRABAJO.**

INDICE GENERAL

Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Citomegalovirus humano: Aspectos generales	
2.1 Características estructurales del virus	6
2.2 Tropismo celular y procesos de infectividad	11
2.3 Datos epidemiológicos y transmisión	18
2.4 Infección activa	19
2.5 Infección persistente: latencia	24
2.6 Citomegalovirus y cáncer	25
2.6.1 Proteína p53	26
Capítulo 3. Inmunología de la Infección por Citomegalovirus humano	
3.1 Fundamentos de la Respuesta Inmune	30
3.2 Respuesta Inmune hacia virus	34
3.2.1 Inmunidad inespecífica	35
3.2.1.1 Células NK	35
3.2.1.2 Interferones	36
3.2.1.3 Moléculas de adhesión y citocinas	38
3.2.2 Respuesta Inmune mediada por anticuerpos	40
3.2.3 Respuesta Inmune mediada por células	41
3.2.4 Aspectos clínicos	44
Capítulo 4. Mecanismos de HCMV de evasión inmune	
4.1 Ocultamiento viral	50
4.1.1 Latencia Viral	50
4.1.2 Infección en continuidad	56
4.2 Enmascaramiento	57
4.2.1 Unión a β -2 microglobulina	57

4.2.2	Unión de Inmunoglobulina G	59
4.3	Mimetismo molecular	61
4.3.1	Homología DNA viral-DNA genómico celular	61
4.3.2	Homología a Proteína G	62
4.3.3	Homología a Quimiocinas	63
4.4	Supresión inmunológica	66
4.5	Modulación de la expresión de moléculas de clase I y II del Complejo Principal de Histocompatibilidad	70
Capítulo 5. Modulación de la expresión de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad en la Infección por HCMV		
5.1	Moléculas de clase I	72
5.1.1	Participación de proteínas virales	73
5.1.2	Alteración del transporte de MHC a la superficie celular	76
5.1.3	Degradación acelerada de la cadena alfa en espacio pre-Golgi	77
5.1.4	Reducción de la estabilidad de cadenas H	79
5.2	Moléculas de clase II	80
Capítulo 6. Conclusiones		84
Capítulo 7. Referencias bibliográficas		89

INDICE DE FIGURAS

Figura 2-1	Estructura del genoma de HCMV (AD-169)	9
Figura 2-2	Ilustración esquemática de un Herpesvirus.	10
Figura 2-3	Infección viral	16
Figura 2-4	Infección productiva de una célula por CMV humano	17
Figura 2-5	Funcionamiento de p53	28
Figura 3-1	Reconocimiento de Antígenos por linfocitos T y Respuestas Efectoras	45
Figura 3-2	Presentación de antígenos virales al sistema inmune	46
Figura 3-3	Inmunidad hacia virus	48
Figura 5-1	Presentación de antígenos a través de moléculas MHC clase I	82
Figura 5-2	Presentación de antígenos a través de moléculas MHC clase II	83

INDICE DE TABLAS

Tabla 2-1.	Relación de la expresión de receptores virales e infectividad de HCMV en diferentes líneas celulares	15
Tabla 2-3	Transmisión de los herpes virus humanos	22
Tabla 2-4	Infecciones asociados con Citomegalovirus	23
Tabla 3-1	Respuesta inmune en relación a fase de infección viral	34
Tabla 3-2	Células del sistema inmune	43
Tabla 4-1	Proteínas virales que modulan la respuesta inmune e inflamatoria	52
Tabla 4-2	Efecto de algunos virus sobre la expresión del MHC	55
Tabla 4-3	La superfamilia de las quimocinas humanas	65
Tabla 4-4	Propiedades de las moléculas de clase I y clase II del MHC	70

INDICE DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
APC	Célula Presentadora de Antígeno
ADCC	Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos
$\beta 2m$	beta-2- microglobulina
BP1	Proteína de unión-1
BP2	Proteína de unión-2
Ca ²⁺	Calcio
CMV	Citomegalovirus
CSF	Factor estimulante de colonias
CTL's	Linfocitos T citotóxicos
Con A	Concavalina A
DHPG	9-(1,3-dihidroxi-2-propoximetil)-guanina
DNA	Acido desoxirribonucleico
Da	Daltones
EBV	Virus de Epstein-Barr
FACS	Citómetro de flujo (del inglés <i>Fluorescence-activated cell sorter</i>)
Fc	Fración cristalizable
FcR	Receptor de Fc
GCR	Receptores acoplados a proteína G
HCMV	Citomegalovirus Humano
HFF	Línea celular de Fibroblastos humanos
HLA	Antígenos de leucocitos humanos (del inglés <i>Human leukocyte antigens</i>)
HSV	Virus de Herpes simplex
HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana
ICAM-1	Molécula de Adhesión intracelular - 1
IEA	Antígenos inmediatos tempranos
IFN α	Interferon alfa
IFN β	Interferon beta
IFN γ	Interferon gama
Ig A, G, M	Inmunoglobulina A, G y M
IL	Interleucina

<i>Kbp</i>	Kilopares de bases
<i>LCMV</i>	Virus de la linfoconiomeningitis
<i>Leu</i>	Leucina
<i>LFA-1</i>	Antígeno funcional de leucocitos - tipo 1
<i>LFA-3</i>	Antígeno funcional de leucocitos - tipo 3
<i>mAb's</i>	Anticuerpos monoclonales
<i>MCMV</i>	Citomegalovirus murino
<i>MHC clase I</i>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I
<i>MHC clase II</i>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II
<i>MIP</i>	Proteína inflamatoria de macrófagos
<i>MCP</i>	Proteína quimiotáctica de monocitos
<i>nm</i>	nanómetros
<i>NK</i>	Células asesinas naturales (Natural Killer cells)
<i>PHA</i>	Fitohematoglutina
<i>PMNL</i>	Leucocitos polimorfonucleares
<i>RE</i>	Reticulo endoplásmico
<i>RNA</i>	Acido ribonucleico
<i>TAP</i>	Proteínas transportadores de antígenos
<i>SIDA</i>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
<i>Tc</i>	Linfocito T citotóxico
<i>TCR</i>	Receptor de antígenos de Célula T
<i>Th</i>	Linfocito T cooperadores
<i>TNF</i>	Factor de necrosis tumoral
<i>UL</i>	Región génica única larga
<i>US</i>	Región génica única corta
<i>VZV</i>	Virus de Vancela Zoster

CAPITULO 1.

Introducción

Sin duda, la función básica del sistema inmune es la de asegurar la integridad del individuo, inclusive la protección contra microorganismos y parásitos, mediante la comunicación a través de interacciones moleculares y celulares que tienden a mantener un equilibrio dentro del reconocimiento de lo propio y lo extraño.

En un intento de control, sobrevivencia y permanencia en el organismo huésped, algunos microorganismos patógenos, dentro de los que destaca el Citomegalovirus Humano (HCMV), han desarrollado evolutivamente formas y mecanismos de evasión a la detección por el sistema de defensa para así prevenir el desencadenamiento de las fases efectoras de la respuesta inmune.

El Citomegalovirus humano, miembro de la familia de los herpes-virus, es un patógeno ubicuo que se encuentra ampliamente distribuido en la población abierta y es capaz de causar un espectro de enfermedad que va desde el establecimiento de una infección persistente pero asintomática, hasta un daño fatal; constituye una de las principales causas de morbi-mortalidad en recién nacidos e individuos inmunosuprimidos. En los últimos años las infecciones oportunistas por este virus se han multiplicado en número y complejidad con la explosión del SIDA y el incremento de otras condiciones de inmunodeficiencias naturales y/o iatrogénicas.

De las diversas ramas efectoras de la respuesta inmune, hay algunas evidencias de que la respuesta mediada por anticuerpos no es efectiva en la generación de un estado de protección, y que los linfocitos T citotóxicos CD8+

(CTLs) pueden ser de definitiva importancia en la eficiente resolución de la infección por HCMV. Por un lado, se ha observado mayor susceptibilidad al virus en individuos con deficiencias en la inmunidad celular, y se ha asociado el desarrollo de CTLs específicas en pacientes receptores de trasplantes de médula ósea y riñón con un estado de protección contra la enfermedad por HCMV, aunque por otro, se ha reportado que en la infección *in vitro* los CTLs generados tienen como blanco principal las proteínas virales inmediatas tempranas y que en etapas tardías hay un pobre reconocimiento inmune y las células infectadas son resistentes a la lisis por CTLs.

Se conocen varios mecanismos que el HCMV ha desarrollado para evadir la respuesta inmune. Su latencia y la infección en continuidad le reducen la posibilidad de ser detectado por el sistema inmune. Además, el virus puede unir a su envoltura inmunoglobulinas G a través de su región Fc y también moléculas de β -2 microglobulina, con lo que evita la lisis mediada por anticuerpos y le permite un efecto de enmascaramiento. Así mismo, su capacidad de hacer mimetismo molecular, a través de la expresión de polipéptidos que comparten secuencias con proteína G celular acoplada a receptores, y con receptores de quimiocinas, por un lado, y la inmunosupresión que induce, alterando algunas funciones de monocitos y macrófagos, no permiten el desarrollo de una adecuada respuesta inmune.

Finalmente, la disminución de la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase I y II en la superficie de células infectadas, al parecer impide que antígenos virales sean presentados a linfocitos T CD8+ (afectando la citotoxicidad celular) y a linfocitos T CD4+ (evitando la cooperación celular).

Es evidente que estos hallazgos pueden significar un drástico impacto en la eficiencia de la resolución de la infección viral, por lo que el esclarecimiento de los mecanismos moleculares intra y extracelulares involucrados darían bases y ayudarían, en gran medida, en los procesos de búsqueda y generación de tratamientos profilácticos que auxilien a organismos inmunocomprometidos a resolver o modular las infecciones por HCMV.

A través de una revisión de los eventos médico-científicos y los avances en el conocimiento reportados en la literatura, este trabajo pretende proporcionar un resumen crítico de varios aspectos de la biología y la relación huésped-parásito en la infección por Citomegalovirus humano, tratando de contribuir especialmente al entendimiento de las estrategias virales de evasión inmune.

CAPITULO 2.

Citomegalovirus Humano: Aspectos generales

2.1 Características estructurales del virus.

La familia *Herpetoviridae* está constituida por un grupo de virus muy difundidos en el reino animal. Dentro de los herpesvirus humanos se encuentran el Citomegalovirus humano (HCMV), los virus de herpes simple (HSV) 1 y 2, el virus de varicela zoster (VZV) y el virus de Epstein-Barr (EBV). Como los demás herpes virus, el HCMV persiste en forma latente o silenciosa después de una infección primaria, la cual es frecuentemente asintomática, y puede ser reactivado subsecuentemente: se encuentra ampliamente distribuido en la población abierta, infectando del 50 al 100% de adultos, dependiendo de la población particular estudiada (57)

El HCMV tiene una particular propensión a producir morbilidad severa y muerte en recién nacidos e individuos inmunosuprimidos, principalmente receptores de transplantes, de médula ósea y riñón, y pacientes con SIDA, aun cuando los tratamientos sean moderados (70,101,119).

El HCMV es el más grande de los beta herpes virus, con un genoma de DNA lineal de doble cadena de aproximadamente 235 Kbp (150×10^6 Da) (31), dividido en 2 regiones únicas: la larga (L) y la corta (S). El segmento L consiste de una región única (UL) de 174 kbp y el segmento S es una región única (US) de 35,6 kpb. Estos componentes se invierten durante la replicación viral, de tal suerte que el DNA del virión consta de 4 secuencias isómeras que difieren en la orientación de L y S (Fig 2-1) (75,114)

El DNA se encuentra en el centro entremezclado con proteína y está rodeado por una cápside proteica de estructura simétrica de forma icosaédrica, compuesto de 162 capsómeros y con diámetro de 80-100 nm. La pérdida de la envoltura de núcleo-cápside reduce mucho la infectividad del virus (24).

El tegumento está representado por una estructura de aspecto fibroso y distribución asimétrica, que conecta la cara externa de la cápside con la interna de la envoltura, la cual contiene una capa bimolecular de lípidos y proteínas, localizadas tanto en la cara interna de los lípidos como proyectadas hacia el exterior de la partícula (24).

El genoma del CMV tiene la capacidad de codificar más de 200 proteínas, de las cuales menos de una cuarta parte ha sido localizada y descrita e incluyen principalmente proteínas virales intracelulares, proteínas estructurales, glicoproteínas de la envoltura y algunas proteínas que sólo han sido identificadas a través de análisis de secuencia (Fig 2-2) (105).

La expresión de las proteínas virales intracelulares ocurre en tres fases: la fase inmediata temprana o alfa, en la que hay una replicación exhaustiva de DNA viral que codifica para proteínas primordialmente transactivadoras, las cuales se expresan 2 a 6 horas post-infección; la fase temprana, con expresión de proteínas no estructurales, involucradas también en procesos de regulación, que se lleva a cabo de 6 a 24 horas post-infección, y finalmente la tardía, que comienza después de la replicación de DNA viral (48-72 horas post-infección) (24).

La mayoría de los genes inmediatos tempranos son transcritos de una región restringida de la secuencia única larga (UL) del genoma viral. Las principales proteínas resultantes son IE-1 (75 kDa), IE-2 (expresada en muy baja concentración) e IE-3 (68 kDa). La función de estas proteínas es activar la transcripción de las proteínas tempranas virales y de promotores celulares, por lo

que se ha especulado que la alteración en la transcripción de genes de la célula hospedera puede ser parte de los efectos patogénicos de HCMV (24).

Las proteínas tempranas o beta están representadas por una proteína de unión a DNA (140 kDa), una proteína de 72 kDa y la DNA polimerasa viral, mientras que la región gama o tardía codifica para una proteína principal de unión a DNA de 51 kDa (24,75).

Las proteínas estructurales codificadas por CMV incluyen dos familias: la de proteínas involucradas en el desarrollo de viriones y virus infecciosos envueltos, y la de las proteínas asociadas con viriones extracelulares, como son las proteínas de la matriz viral, la proteína principal de la nucleocápside, la proteína estructural de 28-32 kDa, la DNAsa de 46 kDa y la protein-quinasa, entre otras (24,75).

La superficie glicopolipeptídica del HCMV (envoltura viral) existe como un complejo de alto peso molecular, que ha sido denominado gCI, gCII y gCIII. El complejo gCI se ha denominado también gB, ya que tiene homología con la glicoproteína B del virus de herpes simple (47), mientras que el complejo gCIII se conoce también como gH. Este grupo de glicoproteínas de la envoltura incluye a la gp48 y a la glicoproteína integral de membrana y en conjunto representa un concentrado de antígenos dominantes que participan en la respuesta inmune humoral, y como en otros Herpes virus, son importantes sitios para la inducción de Anticuerpos (Ac) neutralizantes (62).

Finalmente, y como se mencionó antes, se han identificado por análisis de secuencias nucleotídicas dos marcos de lectura abiertos cuyos productos representarían, por un lado, una proteína homóloga a antígenos de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), y por otro, una fosfotransferasa (8,17).

Fig. 2-1. Estructura del genoma de HCMV (AD-169).

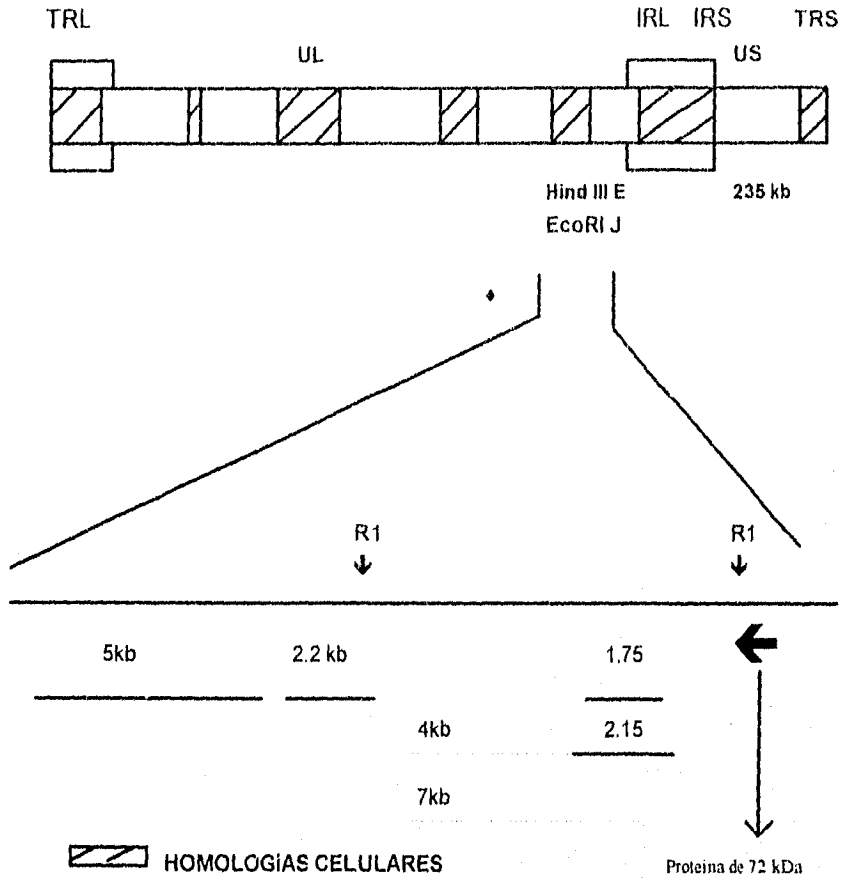
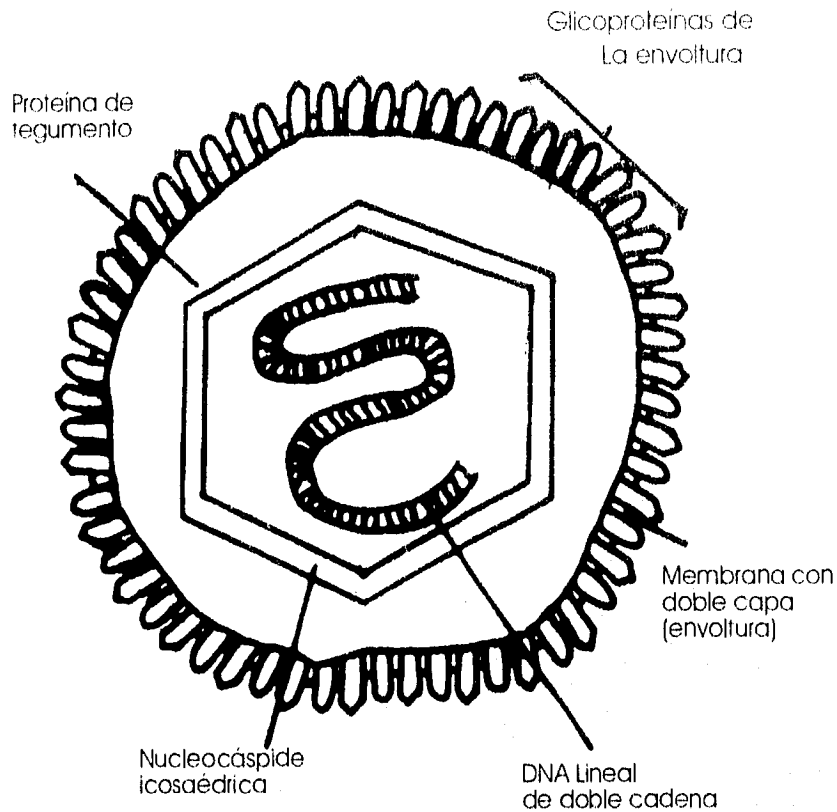


Fig. 2-1. HCMV (Ad 169) es el más grande de los herpes virus, consta de un genoma lineal de 235 kbp dividido en dos regiones, una única larga (UL) y otra única corta (US). El genoma tiene la capacidad de codificar aproximadamente 150 proteínas. La mayor parte de los genes inmediatos tempranos (IE) son transcritos en la región UL. (♦) Región principal de transcripción de IE Hind III. (Tomado de: Sissons J.G.P., Borysiewicz L.K., Rodgers B and Scott D. 1986. Cytomegalovirus: its cellular immunology and biology).

Fig. 2-2. Ilustración esquemática de un herpesvirus.



El virión consiste en un núcleo central, que contiene el DNA viral; una cápside de forma icosaédrica formada por subunidades tubulares de proteína llamados capsómeros, y una envoltura derivada de las membranas celulares. La envoltura contiene proteínas o antígenos virales. (Tomado de: Schaechter., Medoff., Einsenstein y Guerra. 1994., Microbiología, Mecanismos de las enfermedades infecciosas.)

2.2 *Tropismo celular y procesos de infectividad.*

La infección de células por patógenos intracelulares es iniciada por la unión del patógeno a receptores, los cuales pueden ser proteínas, residuos de carbohidratos o glicolípidos sobre la superficie celular; éstos son los responsables de la especificidad de la célula hospedera y del sitio de iniciación de la infección (136,137).

Los citomegalovirus muestran un alto grado de especificidad de especie. En el caso del HCMV, la única célula permisiva de ciclos de replicación completa *in vitro* es el fibroblasto. Las diferentes cepas de citomegalovirus humanos no tienen relaciones antigénicas con otros herpesvirus humanos, aunque sí tienen relación con agentes tipo CMV aislados de primates no humanos, y demuestran considerable diversidad antigénica cuando se analizan por cinética de neutralización o fijación del complemento (47,57,114).

In vivo HCMV puede ser identificado en muchas células diferentes durante la infección clínica diseminada, especialmente en células epiteliales del aparato respiratorio, glándulas salivales y túbulo renal; de este último se excretan virus durante largos períodos de tiempo después de la infección. Además, HCMV está presente con frecuencia en secreciones cervicales, sobre todo al final del embarazo; su difusión circulante por vía sanguínea se hace a través de monocitos y linfocitos (47,57,114).

La infección de la célula por HCMV comienza con la unión de las partículas virales y su internalización, eventos que pueden llevarse a cabo a través de la endocitosis de viriones solos o en grupos, probablemente después de unirse a

sus receptores específicos, o por fusión con la membrana celular a través de la envoltura (Fig 2-3) (47,57,114).

En el primer caso, las proteínas virales tienen acceso al citoplasma por fusión del virus con la membrana endosómica, lo que resulta en la completa digestión, dependiente de pH bajo, de las glicoproteínas. También es posible que dentro del fagosoma los virus fusionen con la membrana vacuolar y sean liberados en el citoplasma como cápsides desnudas, en donde reciben una especie de cubierta cuya naturaleza no ha sido determinada (137).

Si el virus tuvo acceso al interior celular por fusión envoltura-membrana celular, ahí es despojado de su envoltura y cápside y esto permite la transcripción de ácidos nucleicos virales y la síntesis de proteínas. Las cápsides desnudas parecen ser transportadas a través del citoplasma y entonces se acumulan en Golgi o regiones perinucleares. Hoy en día una serie de estudios se dirigen hacia el esclarecimiento de los eventos bioquímicos y las moléculas involucradas en estos procesos de endocitosis, fusión, movimientos en el citoplasma y paso de genoma viral por membrana nuclear (Fig 2-4) (137).

En base al hallazgo de que HCMV puede unirse a la molécula de β -2 microglobulina tanto *in vitro* como *in vivo*, y que la adición de esta proteína purificada al medio de cultivo de fibroblastos humanos incrementa la infectividad viral, recientemente se ha postulado que HCMV también puede usar a las moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (HLA-I) como receptores virales alternos y desplazar a la β -2 microglobulina de los heterodímeros β 2m-cadena alfa sobre la superficie celular, en especial cuando microambientes hostiles (como el de la orina) causan la degradación parcial de los viriones envueltos (8,17).

Con respecto a los posibles receptores virales en las células blanco, estudios realizados por Taylor y cols (122) demostraron la unión de HCMV a una proteína de membrana de fibroblastos humanos (HFF), de una masa molecular aproximada de 30 kDa. La identificación se hizo a través de corrimientos electroforéticos bajo condiciones mínimas de desnaturalización de las proteínas de fibroblastos, transferencia a membranas e incubación con HCMV marcado radiactivamente. La especificidad de unión fué evidenciada por la competencia de HCMV no marcado por la unión a la banda de 30 kDa, en un efecto dependiente de dosis. Sin embargo, se observó una débil unión a componentes de la membrana de 28 y 92 kDa, pero los autores consideran que la proteína de 30 kDa representa el receptor primario en HFF para HCMV y que los demás constituyentes de la membrana como la molécula de 28 kDa puede representar un producto proteolítico, los constituyentes de 50-60 kDa podrían ser dímeros y la proteína de membrana de 92 kDa tal vez subunidad de un receptor multimérico; se especula que tales proteínas intervienen en eventos como fusión en la entrada del virus (122)

Se ha excluido a la molécula de 30 kDa de ser un antígeno MHC clase I, ya que éste consiste en una cadena polipeptídica glicosilada con una masa molecular de 45 kDa. Además el HCMV falla en la unión a antígenos purificados MHC clase I y corridos electroforéticamente en geles de poliacrilamida (2,122).

Estudios más recientes (89) han descrito la unión de HCMV a dos proteínas de membrana de fibroblastos, de 34 y 32 kDa y han demostrado la distribución de estos receptores en una variedad de tipos celulares (fibroblastos, endoteliales, epiteliales, monocitoides, linfoides, así como de origen no humano) y la correlación de su expresión con infectividad del virus, es decir, todas aquellas células que expresan el receptor para HCMV, permiten la penetración y la síntesis de proteínas virales inmediatas tempranas (IE) (Tabla 2-1). La capacidad de unión del virus correlaciona con la abundancia de las proteínas de 34 y 32 kDa

sobre la superficie celular, pero la capacidad de penetración viral no muestra esta proporcionalidad directa, lo que permite pensar que la unión y la penetración viral constituyen dos eventos no acoplados, y que la penetración depende de factores celulares adicionales (89).

Aunque es posible que las proteínas de 34 y 32 kDa representen un complejo receptor dual, la proporción de las dos bandas y la cantidad de proteína de 32 kDa varía de línea celular a línea celular (2,89).

En un intento de los autores por descartar la posibilidad de que los antígenos MHC-I fueran los receptores primarios para HCMV, infectaron una línea celular quimérica (T2) linfoblastoide B/T, la cual no expresa antígenos del MHC de clase I, y encontraron a HCMV capaz de unir, penetrar e iniciar la expresión de genes virales; por lo que se ha reforzado la idea de que aún cuando las moléculas MHC-I y su homólogo viral sean trascendentales en la patogénesis de la infección, éstas no son requeridas en los eventos primarios de penetración, a menos que constituyeran una vía de entrada alternativa (89).

Otros trabajos proponen a las tres glicoproteínas de la envoltura viral que han sido caracterizadas (gB, gH y gC) como candidatos a participar en la unión y penetración viral. Por un lado, Keay demostró que la gH es capaz de unirse a una proteína celular de 92 kDa, y Navarro (84) reportó que la gB no participa en la unión, pero promueve la penetración viral y la transmisión célula-célula, y por otro, el grupo de Compton (23) ha encontrado que la iniciación de la infección requiere de la interacción de gB o de gCH de HCMV con sulfato de heparina (HSPGs) presente en la superficie celular.

Si se consideran estos antecedentes, parece que la iniciación de la infección requiere de un proceso secuencial: HCMV se une a la superficie celular primeramente a través de HSPGs, para después unirse a un receptor de alta afinidad (probablemente la proteína de 34 kDa), y finalmente sufrir la internalización, con la participación de gB y/o gH (21,84).

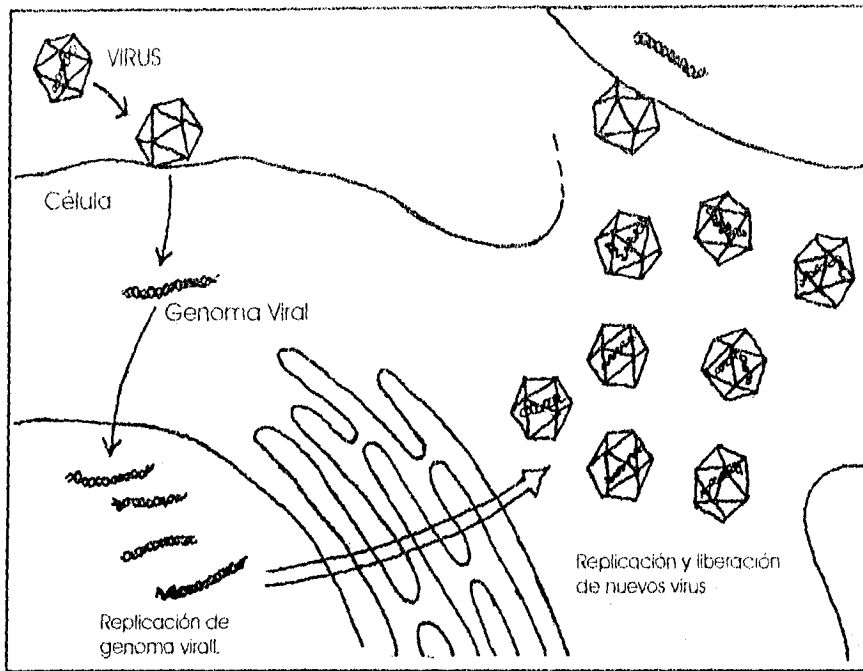
Tabla 2-1. Relación de la Expresión de Receptores Virales e Infectividad de HCMV en diferentes líneas celulares.

Designación	Tipo	Ataque	Proteínas de 32 y 34-kDa	Penetración	Síntesis de IE
HFF	Fibroblasto	+++	+++	+++	+++
HEp-2	Epitelial	+++	++++	++	+
HPK-1A	Epitelial	++	++	+	-
Mono Mac	Monocito	+++	++	+	-
U 937	Monocito	++	+++	+	+
Molt-4	Linfocito T	+++	+++	-	-
Raji	Linfocito B	++	+++	+	+
T2	Linfocito T/B	+++	++++	+	++
Vero	Simio	+++	++++	++	++
CHO-K1 (CHO)	Roedor	+++	+++	++++	++++
FOX-NY (FOX)	Roedor	++++	++++	+	+
Sf9	Insecto	-	-	-	-

IE = Proteínas inmediatas tempranas

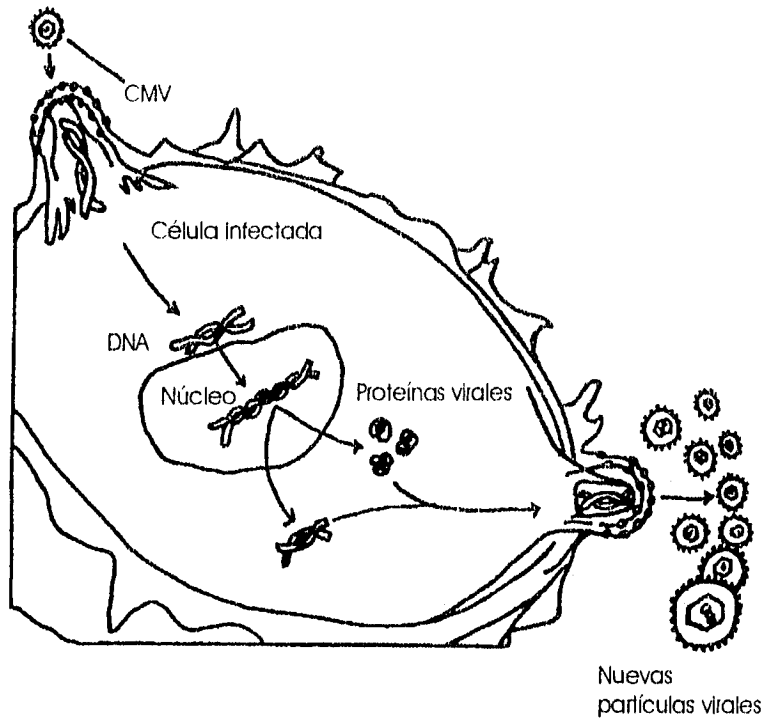
(Tomado de: Nowlin, D.M. Cooper N R and Compton T . 1991. Expression of a Human Cytomegalovirus receptor correlates with infectibility of cells.)

Fig.2-3 INFECCION VIRAL



LOS VIRUS invaden las células uniéndose a ciertas moléculas de superficie y atraviesan la membrana. Una vez dentro de la célula, los virus utilizan diferentes componentes para iniciar el proceso de replicación. Existen virus citopáticos dañan y matan la célula huésped. Las defensas inmunitarias en contra de estos virus en ocasiones no es efectiva en contra de ese tipo de infecciones. (Tomado de: William E.P. 1993., *Infectious Diseases and the immune system*).

Fig. 2-4. Infección productiva de una célula por CMV humano.



La replicación de los herpes virus es compleja, con la adherencia de las partículas virales a las células susceptibles comienza un ciclo lítico o productivo de infección; luego de la unión del CMV a la superficie celular el centro viral es liberado y transportado hacia el núcleo celular donde los genes del virus son transcritos y traducidos a proteínas para llegar finalmente a la producción de nuevas partículas virales. (Modificado de: Nowak M.A and McMichel A,K.J., 1995, How HIV defeats The Immune System)

2.3 Datos epidemiológicos y transmisión.

Las infecciones por citomegalovirus resultan ser más endémicas que epidémicas, y se presentan durante todo el año. La prevalencia de infección tanto primaria como secundaria en la población adulta varía extensamente en diferentes áreas del mundo y también entre edades y grupos socioeconómicos. La promiscuidad favorece altamente los grados de infección tanto primaria como recurrente (19,35)

En el oeste de Europa y en los Estados Unidos de América, las infecciones ocurren con elevada frecuencia durante la infancia y hacia los años de actividad sexual. La prevalencia de anticuerpos contra CMV varía del 40 al 80% dependiendo del nivel socio-económico. En países en desarrollo, la infección por CMV ocurre durante la infancia, de modo que al llegar a la edad adulta, la mayor parte de la población ya ha sido infectada (35).

El CMV puede ser transmitido en forma horizontal por contacto personal, o de manera vertical por transmisión intrauterina. Después de una infección, es común encontrar el virus en orina, secreciones vaginales, secreciones cervicales, sangre, semen y en leche materna; sin embargo, su excreción no es sinónimo de enfermedad. Ya que el virus presenta tropismo por las glándulas salivales, parece ser que a través de saliva éste puede diseminarse fácilmente en la población abierta. Por lo general la transmisión ocurre cuando existe un contacto íntimo o cercano con personas que excretan el virus (Tabla 2-3) (35,105).

De la población infantil de los E.U.A., 0.4 -2.3 % de los recién nacidos se infectan transplacentariamente, del 8 al 60% de los niños durante los seis primeros meses de vida a través de leche materna, y del 40 al 80% son infectados después de la pubertad (35)

Por otro lado, se ha observado que durante el embarazo el periodo de gestación influye en la excreción viral en tracto genital y urinario en mujeres jóvenes: la excreción genital aumenta de 1.5% en el primer trimestre, a 13.5% en el último trimestre (35)

Otras formas de adquirir infección por CMV son las transfusiones sanguíneas y de médula ósea y los trasplantes de órganos. La infección adquirida por transfusión varía del 5 al 67%; aproximadamente el 30% de los pacientes infectados permanecen sintomáticos, sobre todo cuando la infección es primaria (35).

En poblaciones inmunosuprimidas después de un trasplante, la prevalencia de infección primaria varía del 22 al 100%, y de infección recurrente del 46 al 100%. En pacientes con SIDA, la frecuencia de infecciones con CMV es del 90 al 100% (35).

2.4 Infección activa.

Como se ha mencionado anteriormente, las infecciones por HCMV pueden ser adquiridas antes del nacimiento (congénitas), en el momento del parto y/o en el primer mes de vida (perinatales), y después del nacimiento (posnatales) (19,49).

Al ocurrir una infección primaria, el CMV puede diseminarse al torrente sanguíneo (viremia), en donde permanece asociado a células. La fase de viremia resulta en la diseminación del virus a otros órganos como lo son pulmones, corazón, hígado, bazo, riñón, glándulas adrenales, médula espinal y piel; el tiempo de permanencia en los órganos es variable y dependiente del estado inmunológico del huésped. En un huésped inmuno-competente el tipo de infección

que ocurre es subclínica. la presencia del virus en los órganos dura pocas semanas, sin observarse anomalías patológicas; sólo en pocos casos provoca síntomas similares a una mononucleosis infecciosa con fiebre, hepatoesplenomegalia, linfocitos atípicos; ausencia de anticuerpos heterófilos y escasa o nula afección faríngea y adenopatía cervical, que cura espontáneamente en pocas semanas. Después hay una excreción prolongada (a menudo de meses o años) de virus infecciosos en saliva, orina, secreciones vaginales, semen, leche y heces. Una vez resuelta la primoinfección el virus permanece en estado de latencia en el organismo y se puede reactivar, sobre todo si el individuo sufre una inmunosupresión (Tabla 2-4) (19,49,105).

Durante una infección aguda por CMV es posible localizar el genoma viral (DNA) en monocitos, linfocitos y leucocitos polimorfonucleares (PMNL), siendo estos últimos más frecuentemente positivos. Se piensa que los leucocitos polimorfonucleares juegan un papel muy importante en la diseminación de la infección y los monocitos pudieran ser un sitio de latencia. Los estudios realizados en animales confirman estas observaciones, mostrando que el genoma viral del CMV está presente muy a menudo en células mononucleares y raramente en linfocitos. Durante la latencia es posible detectar el genoma viral en células mononucleares en sangre periférica de individuos tanto seropositivos como seronegativos (35).

En huéspedes inmunosuprimidos el número de virus replicativo es muy alto y se excreta por períodos largos (19,49). La patogénesis en estos individuos es compleja. Puede manifestarse como enfermedad localizada produciendo principalmente neumonitis intersticial, trastornos gastrointestinales y retinitis, o manifestarse como una enfermedad sistémica diseminada, en la cual prácticamente cualquier órgano puede ser afectado. En pacientes que padecen SIDA, el CMV

actúa como oportunista, siendo responsable de la retinitis y problemas gastrointestinales. Hay algunas evidencias que apoyan la hipótesis de que CMV pudiera actuar como un cofactor en la enfermedad por HIV ya que CMV tiene la capacidad de transactivar el genoma de HIV; otro posible mecanismo incluye la producción de citocinas, las cuales estimulan la expresión de HIV. Recientemente, Smith y cols (1992) mostraron la presencia del transcrito de TNF- α en líneas celulares de macrófagos dentro de la mucosa de pacientes con SIDA que presentaban colitis por CMV, esto permite suponer que CMV puede actuar como cofactor, ya que se conoce que el TNF- α regula positivamente la expresión de HIV (19,35,44).

Los neonatos afectados por HCMV pueden presentar ictericia, trombocitopenia, hepatoesplenomegalia, bajo peso al nacer y daño neurológico con microcefalia y calcificaciones intracraneanas con secuelas permanentes que incluyen diversos grados de sordera y retraso mental (35).

Tabla 2-3. Transmisión de los herpes virus humanos

Virus	Formas de transmisión	Vía de ingreso	Células blanco iniciales
HSV 1	Contacto directo	Mucosas, piel	Epiteliales
HSV 2	Contacto directo	Mucosas, piel	Epiteliales
VZV	Inhalación, contacto directo	Vías aéreas, mucosas (?)	Epiteliales
CMV	Saliva, sangre, orina (?), semen (?)	Torrente circulatorio, mucosas	Neutrófilos, monocitos, otras
EBV	Saliva, sangre	Mucosas, torrente circulatorio	Linfocitos B, glándulas salivales

(Tomado de: Schaechter/Medoff/Eisenstein/Guerra, Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas.)

Tabla 2-4 Infecciones asociados con Citomegalovirus.

Virus	Síndrome	Frecuencia	Grupo etario	Tejidos afectados	Resultado habitual
Citomegalovirus	Infeción congénita	Común	Neonatos	Cerebro, ojos, hígado, bazo, otros	Problemas del desarrollo, muerte
	Hepatitis	Común	Adolescentes, adultos	Ganglios linfáticos, hígado	Resolución
	Neumonía	Común en los pacientes inmunosuprimidos	Todos	Pulmones	Muerte
	Retinitis	Común en los pacientes inmunosuprimidos	Todos	Ojos	Ceguera

(Tomado de: Schaechter/Medoff/Eisenstein/Guerra, Microbiología: Mecanismos de las enfermedades infecciosas)

2.5 Infección persistente: latencia

Hay evidencias de que los herpes virus desarrollan infecciones latentes o persistentes. En la mayoría de los individuos normales (con sistema inmune humoral y celular intacto) no se desecha todo el virus después de una infección, dando lugar a una infección persistente o crónica, la cual es seguida por recurrencias periódicas o infecciones secundarias con nuevos o mayores niveles de excreción viral (19,35).

Existe una relación directamente proporcional entre la edad de un individuo y la seropositividad en IgM e IgG que hace suponer que el HCMV latente frecuentemente se reactiva en las personas seropositivas y que el promedio de reactivaciones se incrementa con la edad, o que con la edad se produce una pérdida de la supresión de la activación de los linfocitos B, dando como resultado un incremento en los títulos de IgG e IgM específicas para el virus sin que ocurra reactivación viral (19,35).

Banks y Rouse en 1992 definieron el fenómeno de latencia así: *"Las infecciones latentes son infecciones persistentes en las cuales el genoma viral esta presente, pero la expresión génica es limitada y no hay producción de virus infeccioso."* (19).

Esencialmente existen dos puntos que pueden explicar la permanencia de una infección latente: el primero comprende el desarrollo de mecanismos de escape al sistema inmune, y el segundo el empleo de estrategias no líticas de replicación viral. Con respecto al primer punto, aunque las tácticas utilizadas por HCMV no han sido dilucidadas completamente, hay evidencias de que existen y de que el sistema inmune no es efectivo en el reconocimiento y la erradicación del virus y las células infectadas (19). Estos temas se abordarán ampliamente en

páginas posteriores. Por otro lado, es insuficiente la información con la que se cuenta hoy en día con respecto a la existencia de componentes únicos de replicación de HCMV que pudieran estar involucrados en latencia y reactivación viral, aunque se ha mencionado la posible participación regulatoria del TNF (19,35,57).

La expresión del genoma de HCMV latente se reduce a los genes inmediatos tempranos, que pueden ser detectados en varios tejidos y órganos, entre los que se incluyen riñón, pulmón y corazón. Sin embargo, como no ha sido demostrada la reactivación viral, aún es una interrogante el sitio real de latencia. Se han considerado como candidatos a albergar al virus los linfocitos, monocitos y células endoteliales (19,35).

2.6 HCMV y Cáncer.

HCMV ha sido propuesto como candidato a virus oncogénico y se ha sugerido una asociación particular con Sarcoma de Kaposi, el cual se piensa que tiene origen en células endoteliales (35).

Se ha sugerido, y en algunos casos evidenciado, una relación HCMV-malignidad en cáncer cervical (58), cáncer testicular (84), cáncer prostático (14), carcinoma de colon (58,100), Sarcoma de Kaposi (15,58), neuroblastoma y tumor de Wilms (135); sin embargo, el papel activo del DNA de CMV en el mantenimiento del fenotipo oncogénico no se ha establecido.

En 1987, Nahab estudió el papel del HCMV y el virus del herpes simplex en la transformación morfológica y cánceres genitales, del que concluyó que este virus no codifica un oncogén, por lo que su capacidad transformante se puede deber a: habilidad viral para mutagenizar células, amplificación de secuencias de DNA celular, inducción de replicación retroviral endógena, encender síntesis de

proteínas malignas, es decir, "activación transcripcional", primordialmente. De aquí que los herpes virus tengan la capacidad de transformación inducida "in vitro" en células endoteliales humanas (115) y en células embrionarias de pulmón humano (41).

Por otro lado, ensayos de hibridación de DNA de oncogenes y de fibroblastos infectados con HCMV, han revelado que la infección resulta en un incremento rápido y sustancial de los oncogenes celulares *jun*, *fos* y *myc*, la activación de los cuales está relacionada a estímulos mitogénicos de lo cual surge la duda de si este incremento es causa de activación transcripcional ó de estabilización de mensajes producidos constitutivamente a bajos niveles (13).

A la luz de los conocimientos actuales, todavía no está clara la contribución que la activación de *jun*, *fos* y *myc* tiene en la patogénesis de HCMV, pero se cree que pudiera ser un medio para la activación rápida de los genes virales alfa (13).

2.6.1 HCMV y p53

El hallazgo de que HCMV puede inducir transformaciones morfológicas de células *in vitro* y estimular la síntesis macromolecular de la célula huésped ha llevado a algunos grupos de investigación a averiguar si existe algún efecto modulador de HCMV sobre los niveles celulares de la proteína celular p53. Esta proteína ha sido clasificada como producto de un gen supresor de tumores, aunque sus funciones y actividades bioquímicas precisas aún no son claras. El tipo p53 parece tener propiedades regulatorias multifuncionales, entre ellas la proliferación celular normal a través de la detención del ciclo celular en la fase G1 y también actúa como un policía molecular, acumulándose en respuesta al daño del DNA e inhibiendo la proliferación mientras el daño se repara, si esto falla la proteína continúa acopiándose hasta que ocurre la apoptosis (Fig 2-3) (65,68).

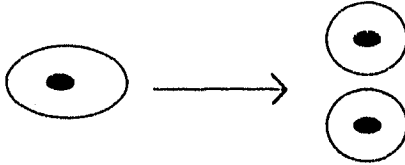
Los niveles de p53 en células normales y sanas son bastante bajos y la vida media es corta (6-30 min), sin embargo se ha observado que cuando ocurren infecciones y transformaciones celulares por ciertos virus hay una alteración en los niveles celulares de la proteína, por ejemplo en el caso de la infección por el virus del simio 40 (SV40) y adenovirus, en donde aumenta significativamente al parecer mediante un aumento de su vida media por la interacción con el Ag T principal de SV40 y con la proteína E1b de adenovirus; por el contrario el virus de papiloma humano tipo 16 y 18 lleva a la degradación de p53 a través de la proteína E6. Se cree que ambos mecanismos resultan en la inactivación de la función de p53 (65,68).

Con respecto a HCMV, recientemente ha sido demostrado por el grupo de Muganda y cols (84), mediante diferentes estudios del efecto de la neutralización del virus, o la inactivación por calor y experimentos en donde intervienen separaciones físicas del virus de células infectadas, que al ocurrir una infección de fibroblastos se eleva 10 a 20 veces el nivel de p53 y que la inducción es dependiente de la presencia del virus activo. Además, parece evidenciarse que los productos de genes IE son los responsables directos de esta inducción (84).

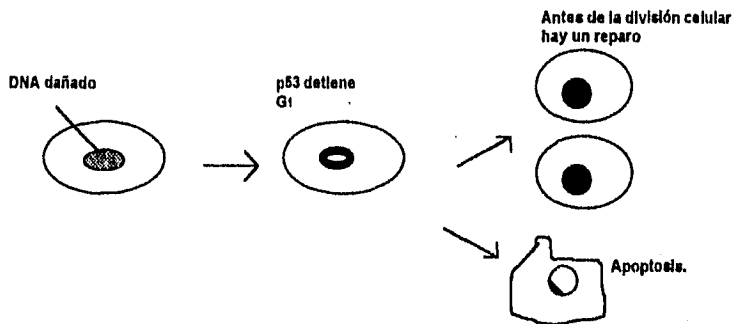
Por otro lado, Speir y cols (116) han propuesto que en la restenosis coronaria, caracterizada por daño severo en la pared de los vasos sanguíneos y proliferación excesiva de células de músculo liso, el daño reactiva a HCMV latente, el cual a través de la producción de la proteína IE84 y su unión a p53, bloquea la función de p53 y con esto la inhibición de la progresión del ciclo celular (116).

Fig. 2-5. Funcionamiento de p53.

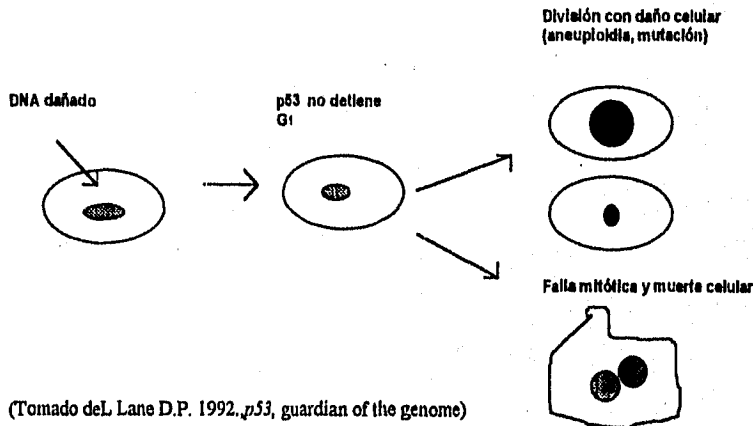
a. División celular normal (no se requiere de p53):



b. Inducción de p53 en respuesta al daño del DNA celular:



c. Situación celular en la que se encuentra inactivado p53 por mutaciones o por proteínas virales, el DNA en replicación resulta en una mutación, aneuploidía, falla en la mitosis y muerte celular.



(Tomado de Lane D.P. 1992., p53, guardian of the genome)

CAPITULO 3.

Immunología De La Infección Por HCMV.

3.1 Fundamentos De La Respuesta Inmune

De todas las funciones del cuerpo humano, una de las más asombrosas, interesantes y elaboradas es la del sistema inmune a través de su capacidad para reconocer y diferenciar estructuras propias de aquellas que son extrañas, logrando así mantener la individualidad de cada organismo y el equilibrio con el medio ambiente (26,144).

Así, la función básica del sistema inmune es la de asegurar la integridad del individuo, inclusive la protección contra microorganismos y parásitos, mediante la comunicación entre todos los elementos que conforman el concierto inmunológico establecido por la liberación de mediadores solubles y el contacto íntimo celular (26,144).

La respuesta inmune se inicia con la fagocitosis del antígeno por las células del sistema fagocítico mononuclear. Los macrófagos y otras células presentadoras de antígeno (APC) digieren las fracciones proteínicas a péptidos y los expresan en su membrana unidos a glicoproteínas codificadas por el sistema principal de histocompatibilidad (MHC). Esta primera fase, llamada de procesamiento y presentación del antígeno, es indispensable ya que los linfocitos T cooperadores (Th), responsables de dirigir la respuesta inmune, son incapaces de distinguir al antígeno nativo (26,144).

Los linfocitos T inductores o cooperadores (Th, CD4+) reconocen al Ag asociado a moléculas de histocompatibilidad de clase II. La activación de estas células no solo depende de la unión del complejo receptor (TCR)-CD2-CD3 al Ag

asociado a MHC, ya que existen otras moléculas en la superficie de los linfocitos que intervienen en la regulación de la adhesión con la APC (1,109).

Una vez activados los Th, estos proliferan y producen diversas linfocinas que conducen la fase efectora de la respuesta (113). En el ratón se han demostrado dos subpoblaciones funcionales de linfocitos cooperadores con capacidad de producción de diferentes interleucinas: los Th1 se han relacionado con la hipersensibilidad de tipo retardado y producen primordialmente interleucina 2 (IL-2), interferon gama (IFN- γ) y linfotoxina (TNF- β) y se coestimulan con IL-12 proveniente de macrófagos o de células B; y los Th2 que producen fundamentalmente IL-4 y 5, las cuales son factores de crecimiento y diferenciación de linfocitos B e IL-10 y 13, y se coestimulan con IL-1 (82).

Aún cuando los linfocitos B reconocen al Ag en su forma nativa, para iniciar su activación y diferenciación hacia células plasmáticas productoras de Abs, necesitan la participación de mediadores solubles producidos por los linfocitos cooperadores. Por su parte, los linfocitos B son capaces de procesar y presentar Ags, lo cual aumenta la eficiencia del sistema inmune, sobre todo en respuestas secundarias (66). Los linfocitos T también tienen la capacidad de presentar Ags, pero lo hacen de manera muy ineficiente (67).

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) (CD8+) participan en la fase efectora celular. A diferencia de los Th, reconocen Ags en el contexto de moléculas de clase I de histocompatibilidad. Estas moléculas, de gran polimorfismo, hacen su presentación unidas a una proteína globular no polimórfica, la β -2-microglobulina (β -2m), y a un péptido de 8 a 10 residuos de aminoácidos que es sostenido en el surco de unión al péptido (125). El ensamble ocurre en el retículo endoplásmico. Los péptidos virales incorporados al MHC-I, los cuales estabilizan la estructura terciaria y son reconocidos por CTLs, son frecuentemente derivados de proteínas

virales o tumorales sintetizadas endógenamente (en los ribosomas celulares), que han sido degradadas por la acción de proteinasas citoplásmicas conformadas en unidades llamadas proteasomas y translocadas al interior del retículo endoplásmico por dos moléculas transportadoras de péptidos localizadas en la membrana del retículo, codificadas en el MHC y denominadas TAP1 y TAP2 (1,27,81,103). Además de la asociación con péptidos en el RE, las moléculas MHC-I forman complejos transitorios con chaperoninas, tales como la calnexina o IP90 (69,81). El fenotipo citotóxico predominante de células T es CD8+, aunque está descrito que aproximadamente el 10% de las células humanas CD4+ son citotóxicas y potencialmente capaces de dar origen a CTLs específicas, las cuales reconocen péptidos en asociación con moléculas de clase II del MHC. Además, tal reconocimiento requiere la interacción de moléculas accesorias de adhesión de la superficie celular y sus ligandos sobre la célula T y/o la célula blanco (Fig 3-2) (1,81).

Las células Th aumentan la respuesta de CTLs, los que una vez activados secretan linfocinas, como la IL-2 y el IFN- γ , aunque en menor proporción que los Th. Los CTL tienen la propiedad de lisar células infectadas por virus o bacterias, así como células tumorales (12).

Para que la citotoxicidad se lleve a cabo es necesario que en primer término entren en contacto la célula infectada con los CTLs (144). La formación del conjugado es promovida en un medio rico en iones Mg²⁺, y se lleva a través del reconocimiento de receptores en la superficie de ambas células como CD8, MHC-I, LFA-3 (antígeno funcional de leucocitos), CD2, CD3, TCR y LFA-1 (11,133).

En la lisis específica por CTL la unión del complejo antígeno-MHC en la célula blanco, con las cadenas alfa y beta del TCR activa la maquinaria lítica de las células citotóxicas (en un medio rico en iones Ca²⁺), con la liberación de granzimas que promueven la transducción de señales apoptóticas, y la exocitosis de compuestos solubles provenientes de gránulos citoplasmáticos como las

perforinas (48), enzimas hidrolíticas y proteoglicanos (93), y una lipasa producto de la estimulación con IL-4 (55). Parece ser que estos compuestos llevan a cabo el "golpe letal" por un ataque directo a la membrana de la célula blanco, de modo que se forman poros de 10 a 20 nm que permiten el paso libre del medio, ocasionando la lisis y muerte de la célula (55). Se ha encontrado, sin embargo, que también puede llevarse a cabo la citotoxicidad en ausencia de los compuestos solubles secretados por el CTL (126). Se piensa que el mecanismo es una autólisis generada por un intercambio de señales a nivel de los receptores de ambas membranas (44). Por otra parte, recientemente se ha demostrado la presencia del complejo CD3-TCR-CD8 y posiblemente de otras moléculas (CD2 y LFA-1) en las membranas de los gránulos citoplasmáticos que contienen a la perforina y otras enzimas líticas. Esto sugiere que los compuestos citotóxicos no son exocitados al medio externo, sino que son transmitidos a través del contacto íntimo entre la membrana de los gránulos citoplasmáticos con la membrana de la célula blanco, con lo que se aseguraría la unidireccionalidad de los compuestos letales hacia la célula infectada (94).

Independientemente del mecanismo que se efectúe, el CTL escapa de la lisis celular y entonces puede participar en una nueva interacción lítica (143).

Una vez que el macrófago presenta el Ag a las células T, se dan todos los mecanismos de citotoxicidad mencionados por una parte, y por otra, se desarrollan clones de memoria que confieren inmunidad celular para infecciones posteriores. Es por esto que en el desarrollo de vacunas contra virus, se buscan antígenos que puedan establecer una inmunidad celular prolongada y que además carezcan de riesgos de reactivación viral (125).

3.2 *Respuesta Inmune hacia Virus*

Los estudios en pacientes con inmunodeficiencias aisladas y el intenso trabajo experimental en modelos animales han evidenciado la relativa importancia de los diferentes componentes de la respuesta inmune hacia los virus y permiten hacer las siguientes generalidades: los anticuerpos parecen actuar primordialmente en la neutralización de viriones, mientras que la respuesta mediada por células está dirigida contra antígenos virales presentes en la célula infectada. La respuesta mediada por anticuerpos es importante en la prevención de la infección primaria y reinfección, neutralizando virus sobre las superficies mucosas y limitando su diseminación en fase fluida, mientras que la inmunidad mediada por células es responsable de eliminar la infección intracelular y limitar la reactivación de virus persistentes (Fig 3-1)(12,124).

De manera general, podemos dividir la respuesta inmune hacia los virus en tres fases (Tabla 3-1) y en componentes humorales y celulares, los cuales incluyen mecanismos específicos e inespecíficos (12).

Tabla 3-1. Respuesta Inmune en relación a fase de infección viral.

Fase	Características	Mecanismos
Inmediata < 4 horas	No específica, innata no memoria no células T específicas	Células NK Ausencia de receptores celulares
Temprana 4-96 horas	No específica, inducible no memoria no células T específicas	IFNs α - β Células NK activadas por IFN
Tardía > 96 horas	Específica, inducible memoria Células T específicas	Acs específicos Células T citotóxicas

(Tomado de: Weiss, A. 1989., En: Fundamental Immunology)

3.2.1 Inmunidad inespecífica

3.2.1.1 CELULAS NK

Las células NK (asesinas naturales) son linfocitos granulares grandes (CD16+, CD3-, TCR-) capaces de matar células infectadas por virus sin haber tenido una previa exposición viral. El mecanismo de reconocimiento no está restringido a HLA y no requiere de procesamiento de antígeno. El blanco y/o receptor de la célula NK no se conocen, aunque el mecanismo de daño es similar al que llevan a cabo los linfocitos T citotóxicos (CTLs). Las NK son activadas por los interferones (IFNs) alfa y beta, que son liberados por las células infectadas por virus, y por ciertas glicoproteínas virales (124).

Comparando con células no infectadas, las células infectadas por virus muestran una susceptibilidad incrementada a la lisis por NK, lo que podría deberse al aumento en la unión a NK, a una inhibición del RNA celular y la síntesis de proteínas, a la expresión alterada de proteínas de superficie celular y a los efectos protectores de interferones sobre células no infectadas, sin embargo, la lisis por NK no se abole al bloquear la síntesis o expresión en superficie de proteínas virales estructurales (124).

Se piensa que las células NK son un importante mecanismo de defensa temprana en el curso de la infección viral, anterior a la activación de las CTLs y anticuerpos específicos. En modelos experimentales, las NK parecen ser más importantes en la resistencia a ciertas infecciones virales que a otras, por ejemplo las células NK protegen contra citomegalovirus murino (MCMV), pero no contra el virus de la linfocorionemeningitis (LCMV) (124).

En el caso de HCMV, se ha observado que las células que sufren su infección muestran incrementada susceptibilidad a lisis por las células NK, sobre todo en la fase viral temprana. Las células efectoras son *Leu*⁷⁺, *Leu*¹¹⁺, es decir,

con el mismo fenotipo de las células NK que median la lisis a tumores. Por otro lado, se reportó recientemente una correlación directa entre la susceptibilidad de células infectadas con virus y lisis por NK y su expresión del receptor de transferrina. En el caso de HCMV, no fue posible inhibir la lisis por NK con transferrina purificada, por lo que aún está sin contestar cuál es la estructura blanco que es reconocida por estas células (9,5).

3.2.1.2 INTERFERONES

Los interferones son proteínas capaces de interactuar con células no infectadas y producir un estado antiviral, estimulando la síntesis de proteínas que interfieren con transcripción y traducción de RNA viral. Su producción es estimulada por infección viral y algunos otros estímulos, como RNA de doble cadena. Los IFNs alfa y beta son completamente inespecíficos y producidos en respuesta a un amplio rango de virus (124).

El interferón gama es producido por células T en exposición a antígenos específicos y activa monocitos y macrófagos, mejorando su capacidad para procesar y presentar antígeno (124).

Los IFNs también activan a células NK y células efectoras responsables de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) y dan origen a varios de los síntomas sistémicos asociados con infecciones virales, como fiebre y mialgia (124).

El factor de necrosis tumoral (TNF) también tienen un efecto anti-viral, el cual puede ser sinérgico con el de los IFNs (124).

En cuanto a CMV, se ha demostrado en modelos murinos un papel protector del interferón gama y el TNF- α en la infección por MCMV. Por otra parte se ha demostrado un efecto sinérgico entre estas dos moléculas en la

protección de fibroblastos humanos cultivados *in vitro* de la infección por HCMV (124).

3.2.1.3 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y CITOCINAS

El efecto de las infecciones virales sobre el nivel de expresión celular de moléculas de adhesión también podría, al igual que la regulación de la expresión de moléculas de histocompatibilidad, afectar la respuesta citotóxica hacia fibroblastos infectados, así como la distribución de los leucocitos en el organismo (118).

Las células del sistema inmunológico dependen de las interacciones de otras células para activar y dirigir la respuesta a la infección. Para patrullar efectivamente el cuerpo y detectar organismos infecciosos, las células del sistema inmune deben circular como células no adherentes en la sangre y sistema linfático y migrar como células adherentes a los tejidos, especialmente a los órganos linfoides, en donde se congregan en presencia de antígenos (118).

Durante el desarrollo de la inflamación intervienen tres familias de moléculas o receptores de adhesión, la superfamilia de las inmunoglobulinas, las cuales incluyen los receptores de antígenos específicos de linfocitos T y B; la familia de integrinas, importantes en la regulación dinámica de adhesión y migración; y las selectinas, prominentes en interacciones de linfocitos y neutrófilos con células endoteliales (118).

LFA-1, miembro de las integrinas, se expresa en linfocitos T y su receptor es ICAM-1, molécula perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas. LFA-2 o CD2 también se expresa en linfocitos T y su receptor es LFA-3. Por otra parte CD2 se expresa en células NK y actúa como mensajero celular (118).

En 1993, Grundy y cols (52) estudiaron el efecto de la infección por HCMV en la expresión de las moléculas LFA-3 e ICAM-1 sobre la superficie de fibroblastos de pulmón fetal infectados y demostraron un incremento significativo de estas moléculas (el doble de LFA-3 y el triple de ICAM-1) a partir del primer día postinfección. Los estudios paralelos de la expresión de moléculas de clase I confirmaron la regulación negativa inducida por CMV, al tiempo de un incremento máximo de LFA-3 e ICAM-1, lo que sugiere que el mecanismo de regulación negativa de MHC-I no es consecuencia de la disminución generalizada de los eventos de transporte de moléculas a la superficie celular (52).

El rastreo de moléculas de adhesión mediante inmunofluorescencia y microscopía electrónica revelaron una difusa distribución de moléculas LFA-3 en células no infectadas, pero acumulada en gránulos en el área perinuclear en células infectadas. Por el contrario, ICAM-1 fue encontrada en la membrana celular entre una y otra célula infectada, mientras que en células no infectadas la distribución fue en el citoplasma, al parecer ICAM-1 sufre una redistribución del citoplasma a la membrana celular. Estos estudios demostraron que la regulación positiva de ICAM-1 e LFA-3 en la superficie de células infectadas es independiente. Queda aún por determinar si el aumento en la expresión de LFA-3 e ICAM-1 tiene un significado funcional en la superficie de células infectadas relacionado con la capacidad funcional de las células T citotóxicas, aunque se podría esperar que el aumento en la expresión de moléculas de adhesión aumente la lisis no específica o que jueguen un papel funcional en la activación de células T por vía de CD2 (52).

Un estudio posterior demostró el incremento paralelo en la adhesión de leucocitos de sangre periférica a fibroblastos infectados con CMV. Todas las subpoblaciones de linfocitos CD2+, los cuales comprenden las células CD3+, CD4+ y CD8+ (linfocitos T y células NK) tuvieron un incremento en la adhesión

a fibroblastos infectados por el virus, sugiriendo la importancia de la interacción CD2-LFA-3 en este evento. En contraste, la población CD2- (que comprende principalmente monocitos y células B) no muestra diferencia en adhesión entre células infectadas y no infectadas (53). El hallazgo tiene implicaciones biológicas importantes: si los linfocitos se activaran por la vía CD2, el CMV pudiera provocar una respuesta no específica a leucocitos hacia células no infectadas al igual que a células infectadas, contribuyendo posiblemente al daño de tejidos. Al parecer las moléculas CD4 y CD8 no son determinantes en el incremento de la adhesión a comparación de moléculas CD2 (52,53).

Aparentemente las citocinas y otros factores solubles liberados por las células infectadas en los primeros días de infección son capaces de incrementar la adherencia de leucocitos a fibroblastos no infectados. *In vivo* la producción de citocinas por leucocitos activados puede ser claramente incrementada por fibroblastos infectados y las citocinas liberadas en co-cultivos incrementan la adherencia de leucocitos a fibroblastos no infectados, lo que hace suponer que CMV pudiera provocar una respuesta de leucocitos tanto para células infectadas como para células no infectadas (52,53).

Se le han atribuido propiedades inmunosupresoras a HCMV, en este contexto se ha demostrado la liberación de un inhibidor de IL-1 de cultivos de monocitos infectados, y la sería disminución de la liberación de IL-1 activa. A pesar de ello aún permanece por esclarecerse si HCMV ejerce efectos inmunosupresores por infección directa de células T (53).

Queda claro que CMV tiene un efecto profundo en la expresión de las moléculas de adhesión como ya se había mencionado antes y en la adherencia de leucocitos a células infectadas. Estos cambios pueden tener consecuencias

funcionales importantes, además la liberación de citocinas inducida por CMV incrementa la adhesión de leucocitos, un fenómeno que amplifica la inflamación y la respuesta directa del huésped hacia células no infectadas (53).

3.2.2 Respuesta inmune mediada por anticuerpos.

Los anticuerpos anti-virales de mayor relevancia son IgG, aunque se produce IgM durante la fase temprana de la infección primaria, y la IgA secretoria es importante en la prevención de la entrada del virus vía superficie de las mucosas. Los anticuerpos antivirales pueden unir epítomos virales sobre la superficie del virión (Acs neutralizantes, la mayoría conformacionales) o sobre la superficie de la célula infectada. A menos que estén en muy alta concentración, los anticuerpos neutralizantes no necesariamente evitan la adsorción y entrada virales; sin embargo, pueden prevenir la replicación viral interfiriendo en los procesos de transcripción, o haciendo al virus más susceptible a enzimas celulares. Los anticuerpos también pueden aumentar la fagocitosis de los viriones por opsonización y aglutinación (6,32,79).

Son importantes otros sistemas efectores reclutados por los anticuerpos: lisis celular mediada por complemento y citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) (6,32,79).

Por otro lado, el complemento aumenta el efecto neutralizante de los Acs al recubrir la superficie de viriones sensibilizados, previniendo así su interacción con receptores virales sobre las células y promoviendo la agregación de viriones, lo que reduce los números de unidades infecciosas. Este también puede actuar como una opsonina para células fagocíticas y causar la lisis directa de los virus con

envoltura. Por último, algunos virus activan el sistema del complemento directamente por la vía alterna (6,32,79).

Estudios realizados en ratones muestran que la respuesta inmune mediada por anticuerpos hacia MCMV no es efectiva en la generación de un estado de protección y que aparentemente es la respuesta celular la responsable de controlar la infección. En el caso de HCMV se sabe que pocas proteínas virales inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, y que éstos requieren de complemento, de lo que se deduce que la lisis puede ser efectiva en plasma pero no necesariamente en otros líquidos corporales. Una evidencia que apoya la falta de efectividad protectora de los anticuerpos anti-HCMV es el hecho de que la presencia de anticuerpos en la madre no evita la infección intrauterina del producto (6,32,79).

3.2.3 Respuesta inmune mediada por células.

Las CTLs específicas *de virus* son fenotipo predominantemente CD8+ (aunque aproximadamente 10% de las células humanas CD4+ son citotóxicas y potencialmente capaces de dar origen a CTLs específicas); ellas reconocen antígenos virales que han sido procesados y presentados como péptidos sobre la superficie de células infectadas en el contexto de moléculas del MHC apropiadas; clase I en el caso de CD8+, clase II para CD4+ (Fig 3-1). El reconocimiento del antígeno viral por las células *T* requiere la interacción entre el receptor de T (TCR) y el complejo Ag-MHC, pero también son indispensables interacciones entre algunas moléculas accesorias, incluyendo LFA-1 e ICAM-1, y LFA-3 y CD2, para facilitar la unión de las células efectoras (6,32).

Una célula infectada por virus puede ser atacada antes de que el virus replique, y así limitar la diseminación viral (6,32).

Con pocas excepciones, como en los reovirus, las CTLs no son específicas de serotipos, es decir que no reconocen los mismos epitopos que los anticuerpos anti-virales (6,32).

Las células Th aumentan las respuestas de células T, B y NK a los virus. Estas células, a través de reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), responden a antígenos virales específicos secretando citocinas que producen una reacción inflamatoria caracterizada por infiltrados de células mononucleares; estos eventos pueden ser modulados por subpoblaciones de Th y CTL. El papel exacto de DTH en infecciones virales en el humano aún no está completamente dilucidado debido a la dificultad de los ensayos *in vitro* (6,32).

De las diversas ramas efectoras de la respuesta inmune, hay algunas evidencias de que los linfocitos T citotóxicos CD8(+) (CTLs) son relevantes en la eficiente resolución de la infección por HCMV (Fig 3-2). El desarrollo de CTLs específicas de HCMV en pacientes receptores de trasplantes de riñón y médula ósea ha sido asociado con un estado de protección contra la enfermedad; por otro lado, se ha demostrado en modelos murinos que la transferencia adoptiva de linfocitos CD8+ específicos de MCMV protege a ratones inmunosuprimidos contra el reto letal por MCMV y es terapéuticamente efectivo en ratones con la infección establecida. A pesar de estos hallazgos, recientemente se ha reportado, por un lado, que la replicación *in vitro* de MCMV inhibe la presentación de antígenos celulares a CTLs y por otro, cierta resistencia a lisis por CTLs de fibroblastos infectados por HCMV (19,35,49).

Tabla 3-3. Células del sistema inmune

Célula	Componente de superficie	Función
Linfocitos T	T3	Involucrados en la inmunidad mediada por células
Células T cooperadoras (Th)	T4	Reconocen antígenos con moléculas de clase II del MHC; promueven la diferenciación de las células B y las células T citotóxicas; activan macrófagos
Células T citotóxicas (CTL)	T8	Reconocen antígenos con moléculas de clase I del MHC; en general destruyen células que expresan antígenos endógenos en superficie
Células T <i>gld</i>	Probablemente todas T4 y T8 negativas	Responden a antígenos microbianos comúnmente hallados en los límites epiteliales; restricción del MHC y función desconocida
Linfocitos B	Inmunoglobulina de superficie, receptores de Fc, moléculas de clase II del MHC	Reconocen antígenos directamente; se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos, presentación de antígenos
Células K	Receptor de Fc	Destruyen células recubiertas con anticuerpos (ADCC)
Células NK	Receptor de "antígeno" blanco desconocido	Destruyen células con cierta selectividad
Macrófagos	Receptor de Fc, receptor de C3; todos tienen moléculas de clase I y algunos clase II del MHC; pueden unirse con una amplia variedad de sustancias a través de "receptores" de superficie	Presentación de antígenos; destrucción por fagocitosis de microbios y células tumorales; secreción de IL-1
Células dendríticas	Receptor de Fc, receptor de C3; moléculas de clase II del MHC	Presentación de antígenos

(Tomado de: Schaechter, Medoff, Einsenstein y Guerra, 1994. Microbiología, Mecanismos de las enfermedades infecciosas).

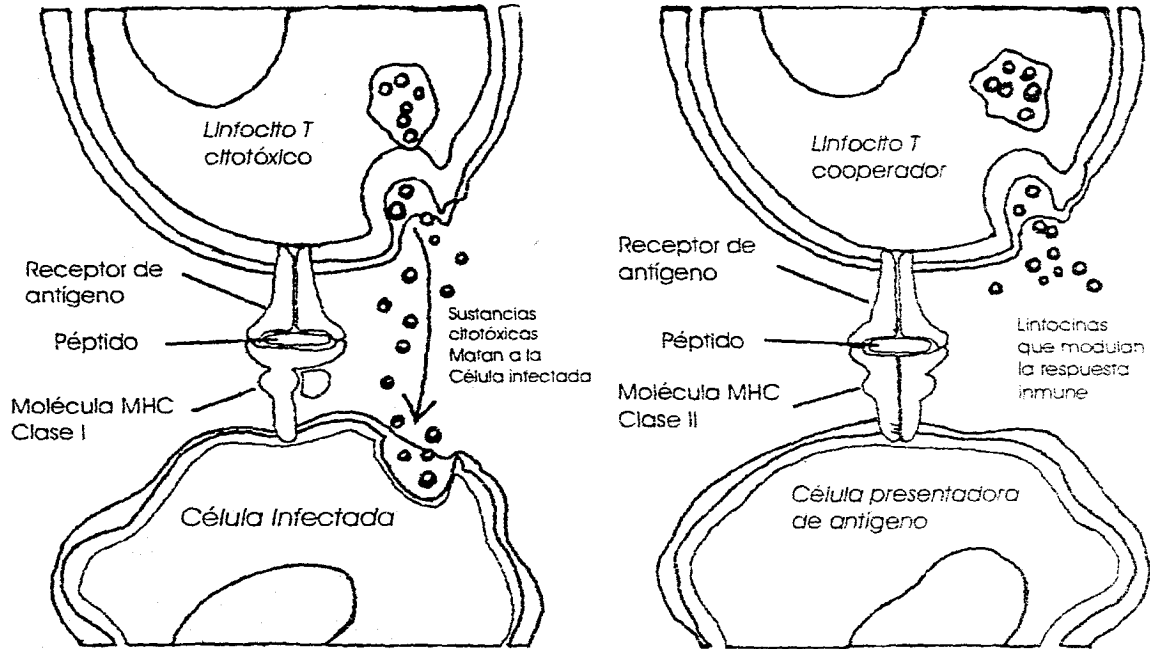
3.2.4 Aspectos clínicos.

En un estudio en receptores de transplantes de médula ósea con infección por HCMV, Quinnan y colaboradores observaron una correlación positiva entre la detección directa de lisis restringida por MHC de células infectadas por leucocitos totales de sangre periférica, y la recuperación de la infección (95,96). Por otro lado, Rook y colaboradores; quienes investigan pacientes con SIDA y en los cuales el HCMV es una causa principal de morbilidad y mortalidad, reportan que *Tc* específicas de HCMV no pueden ser inducidas *in vitro* tratando los linfocitos de sangre periférica con IL-2 exógena. Esto sugiere que hay *Tc* activados pero no pueden expandir, lo cual correlaciona con la depleción de células T4+ (60).

La prevención de infección primaria presumiblemente depende principalmente del reconocimiento de determinantes en el virión por Acs neutralizantes; esto pudiera significar la base de una vacuna. Ya se ha reportado el uso de HCMV como vacuna, pero ha tenido objeciones por el uso del virus vivo, el cual pudiera establecer un estado de persistencia en el huésped y comportamientos biológicos desconocidos. La inmunización pasiva pudiera conferir protección contra infección primaria en individuos seronegativos en riesgo, pero no haría lo mismo en el caso de una reactivación (127).

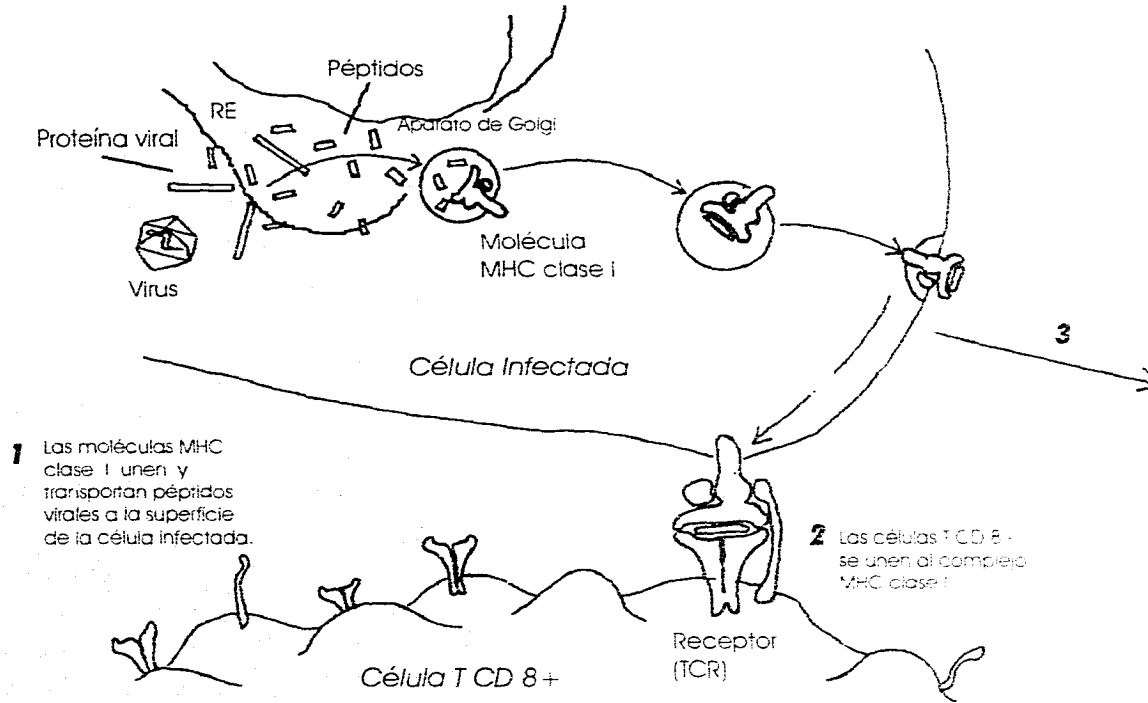
Aún no hay una quimioterapia efectiva para limitar la enfermedad por HCMV. Está siendo probado el antiviral DHPG (9-(1,3-dihidroxi-2-propoximetil)-guanina), aunque los conocedores del SIDA opinan que cualquier quimioterapia en ausencia de una respuesta de células *T* efectiva sólo es "virostática" y la enfermedad pudiera recrudecer tan rápido como se detenga el tratamiento (57).

Fig.3-1. Reconocimiento de Antigenos por linfocitos T y Respuestas Efectoras



El complejo Ag-Molécula de histocompatibilidad puede ser reconocido por linfocitos T. Las moléculas MHC clase I se encuentran en todas las células nucleadas del cuerpo y pueden presentar péptidos provenientes de virus. Las células T responden a estos complejos matando la célula infectada. La moléculas MHC clase II, se encuentran sólo en células presentadoras de antígeno, presentan péptidos provenientes de proteínas extracelulares. Este complejo estimula la liberación de linfocinas. (Tomado de: Engelhard V.H. 1994., How cells presents antigens).

Fig.3-2. Presentación de antígenos virales al Sistema Inmune



3 La célula T activada libera mediadores solubles que inhiben la replicación del virus deteniéndose temporalmente el ciclo de infección viral

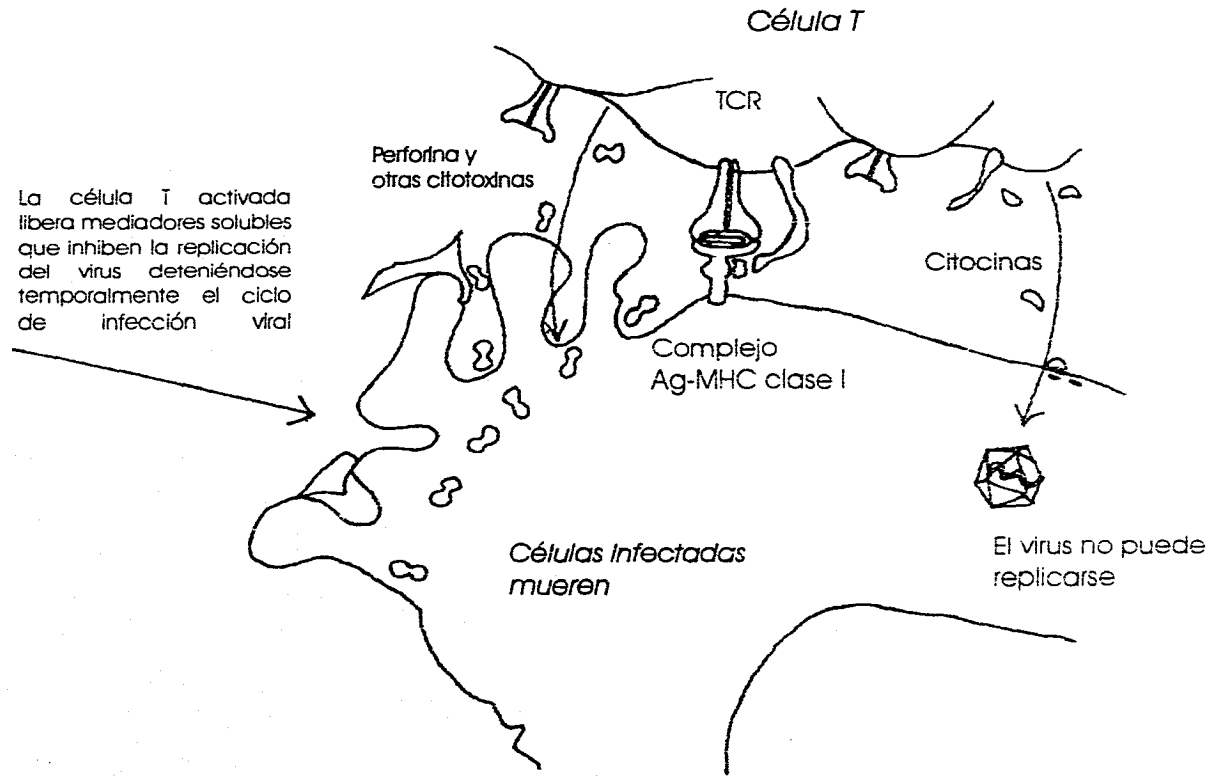
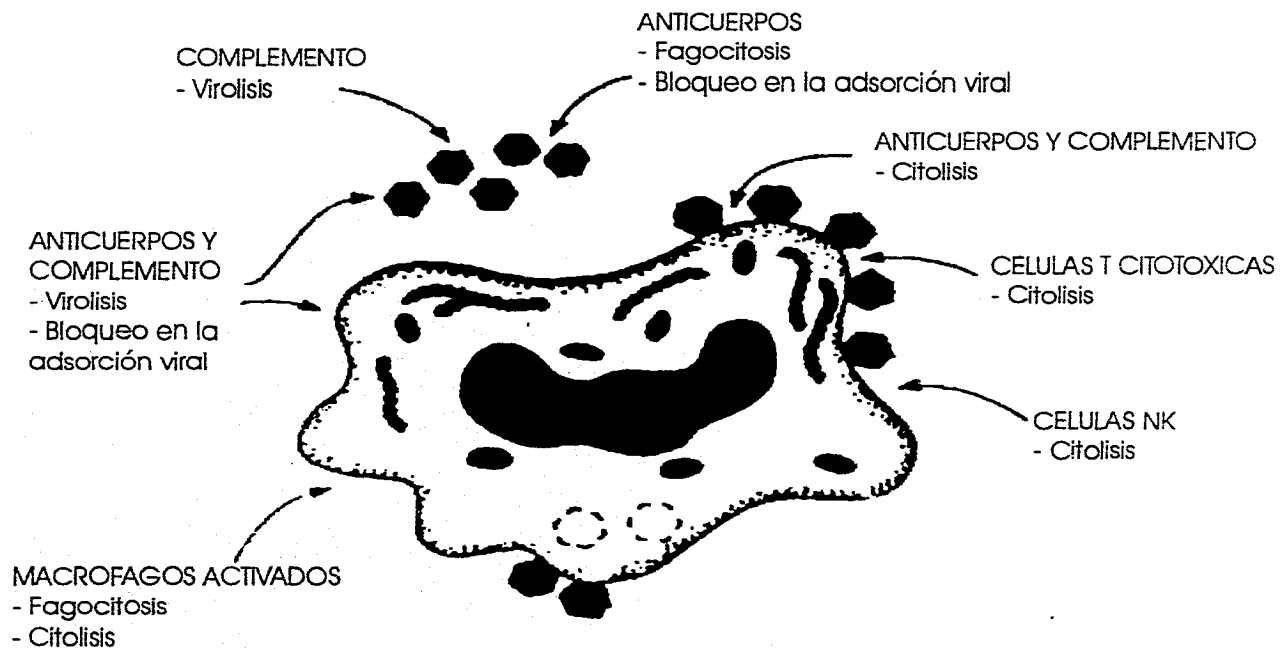


Fig. 3-3 INMUNIDAD HACIA VIRUS



Tomado de: Tizard, Jan R. Inflammation, En:
Tizard (eds) Immunology.

CAPITULO 4.

Mecanismos de HCMV de Evasión inmune.

4.1. Ocultamiento viral.

El ocultamiento viral, a través de la latencia y la infección en continuidad (paso del virus de una célula a otra sin tocar espacio extracelular) reducen la posibilidad de que HCMV sea detectado por el sistema inmune (91,92).

4.1.1 Latencia viral.

Algunos virus tienen la capacidad de mantenerse en el organismo tiempos prolongados, a menudo causando infecciones asintomáticas. Este fenómeno pudiera involucrar la producción de virus infecciosos o una infección latente con reactivación intermitente y producción de viriones; ciertos virus pueden exhibir ambos patrones, dependiendo del tipo de célula huésped, por ejemplo los herpesvirus y el virus de hepatitis B, los cuales infectan linfocitos en forma latente, pero producen virus infectantes en hepatocitos. Para lograr un establecimiento persistente, el virus debe limitar el daño celular del huésped; así, algunos virus no citolíticos como los arenavirus se replican con muy poca alteración de las funciones celulares y sobre todo, limitando su potencial lítico, lo cual en ocasiones logran restringiendo la expresión de sus genes (como es el caso de herpesvirus), a través de la generación de cepas mutantes que no causan lisis celular (reovirus) y por la infección de solo un pequeño porcentaje de células al mismo tiempo (virus murino de deshidrogenasa láctica) (19,45).

Los virus persistentes también tienen que evadir la detección y eliminación ejercida por el sistema inmune: algunos exhiben variación antigénica (lenti-retrovirus), otros promueven el incremento de anticuerpos no neutralizantes, o intervienen en la regulación negativa de moléculas de clase I e ICAM-1, creando

una interferencia con la respuesta de T (adenovirus y EBV, respectivamente); o bien, los que infectan células inmunocompetentes pueden comprometer su función y prevenir así la eliminación (HIV). La caracterización de proteínas virales que modulan tanto la respuesta anti-viral innata, como la específica, están siendo, hoy por hoy, la base de la información que explique la patogénesis viral. Gooding (45) ha realizado una revisión de algunas proteínas identificadas en herpes virus capaces de modular la respuesta inmune del huésped (Tabla 4-1), entre las que se encuentran la proteína C-1, la cual se une al fragmento C3b del componente C3 del complemento, previniendo la neutralización del virus y la citólisis de las células infectadas por el virus, y las gE y gI, que se unen a la porción Fc de la IgG, previniendo la lisis mediada por el complemento y protegiendo al virus de la fagocitosis facilitada por el Fc (45).

Así mismo, el virus de Epstein Barr sintetiza un factor inhibidor de la síntesis de citocinas, homólogo a IL-10. Tanto IL-10 como la proteína BCRF1 de EBV inhiben la síntesis de citocinas como TNF e IFN- γ por macrófagos activados y células Th1, reduciendo potencialmente la activación de los macrófagos y el desarrollo de la respuesta tipo hipersensibilidad retardada *In vivo* (45).

Por otro lado, y como se ha descrito ya, los linfocitos T citotóxicos reconocen los péptidos virales que son acarreados a la superficie celular por los antígenos del MHC clase I; este reconocimiento provoca la lisis de las células infectadas por el virus antes de que se lleve a cabo el proceso de replicación y la liberación de nuevas partículas virales. Existe un número muy grande de proteínas virales que interactúan con los linfocitos T citotóxicos. En el caso del HCMV, éste produce una proteína homóloga de la clase I, la UL18, la cual se une a la β 2m. La expresión de UL18 al parecer impide la salida de las moléculas de clase I a la superficie celular, por lo que interfiere con el reconocimiento de los

linfocitos *T* citotóxicos; aunque esta interferencia aún no se ha podido demostrar (91,92).

Indudablemente el valor de estas proteínas en los virus es substancial, ya que si asumimos que la mayoría de los genomas virales son restringidos en tamaño por la necesidad de ajustarse dentro de una cápside, y los virus tienden a ser bastantes económicos con su material genético, lo más seguro es que requieran de estas defensas a través de proteínas que les permitan replicar en un ambiente hostil generado por el sistema inmune (45).

Tabla 4-1. Proteínas virales que modulan la respuesta inmune e inflamatoria.

Herpes Virus	Proteína	Huésped
Virus de Epstein-Barr	EBER RNA	IFN (α/β)
Virus de Epstein-Barr	BCRF-1	síntesis de citocinas
Citomegalovirus	UL18	CTL (?)
Herpes simplex I/II	gC-1	complemento
Herpes simplex I/II	gE-gI	anticuerpos
Herpes saimiri	CCPH	complemento

(Tomado de : Gooding, I.R. 1992. Virus proteins that counteract host immune defenses).

Al respecto de moléculas involucradas en la regulación negativa de antígenos de histocompatibilidad sobre las células infectadas, se ha demostrado que la gp 19k de la unidad de transcripción E3 de Adenovirus humano tipo 2 suprime el proceso de presentación de antígeno de las células infectadas a través de la retención de las moléculas de clase I en retículo endoplásmico inhibiendo su transporte a la superficie celular, con lo cual se ve reducido drásticamente el reconocimientos por células *T* (45,73).

En Adenovirus tipo 12, la proteína inmediata temprana IEA, la cual es un potente regulador transcripcional, disminuye los niveles de expresión de los genes del MHC clase I, lo que reduce la susceptibilidad de las células transformadas por Ad12 a linfocitos citotóxicos y permite el desarrollo y la proliferación de tumores (64,73).

Recientemente se ha reportado que el virus de herpes simple (HSV) expresa una proteína inmediata temprana, denominada ICP47, que bloquea la presentación de péptidos virales a las células del sistema inmune. Como se sabe, los péptidos antigénicos son generados en el citoplasma por la acción de los proteasomas y translocadas al interior del retículo endoplásmico por TAP I y TAP2, que se localizan en la membrana de éste y se encargan de transportar los péptidos, que luego son tomados por las moléculas del MHC de clase I- β 2m en formación y llevados a la superficie para su reconocimiento. HSV media la retención de moléculas de clase I "vacías" en el retículo endoplásmico, a través de ICP47, la cual interactúa con la región citosólica del heterodímero de TAP e inhibe la translocación de péptidos al RE (37,56).

El mimetismo molecular es otro mecanismo interesante de escape, que ocurre cuando el microorganismo expresa moléculas similares o idénticas a proteínas del huésped sobre la superficie celular y esto lleva a una incapacidad del sistema inmune de reconocerlas como extrañas. En este contexto, CMV codifica polipéptidos que comparten secuencias con proteína G celular acoplada a receptores (Chee, y cols, 1990) (24).

El conocimiento del fenómeno de latencia de los herpes-virus, es incompleto aún, y en particular hay muy pocos datos acerca del CMV. Los estudios en humanos y animales muestran que probablemente todos los individuos seropositivos albergan al virus latente y este puede reactivarse bajo ciertas circunstancias, tales como supresión inmune (57). Al parecer HCMV persiste en

células epiteliales, endoteliales, hepatocitos y astrocitos, pero el estado físico de su persistencia aún no se conoce. La disponibilidad de modelos animales adecuados (como ratón y rata) y la sensibilidad de nuevas técnicas como la reacción de polimerización de DNA en cadena (PCR) prometen para un futuro cercano la obtención de más datos al respecto (19).

Tabla 4-2. Efecto de algunos virus sobre la expresión del MHC.

Grupo de virus	Virus	Gene	Efectos en MHC clase I	Efectos en MHC clase II
Adenovirus	Ad12	E1A	↓	
	Ad2	E3(19K)	↓	
Hepadnavirus	HBV	pol	↓	
Papilloma virus	HPV16	E6/E7	↓	↑
Herpes virus	CMV	H301; ?	↓	↓
	HSV 1 y 2		↓	
Pox virus	Virus de Vaccinia		↓	
	Virus Ectromelia		↓	
Rhabdovirus	VSV		↓	
Flavivirus	Virus West Nile		↑	↑
Coronavirus	Virus JHM			↑
Paramyxovirus	Sarampión		↑	↑
Retrovirus	HIV		↓	↑
	SIV			↑
	RaLV		↓↑	
	RSV	src ?	↓	↓?
	Mo-MLV		↑	
	Mo-MSV	mos?	↓	
	Mo-MLV/MSV	mos?	-	↓
	Ki-MLV		↓	↓
	Ki-MSV	v-Ki-ras	↓	↓↓
	(Ha-MSV)	v-Ha-ras	-	↓↓

↑ aumento en la expresión; ↓ disminución en la expresión; - sin efecto en la expresión de antígenos MHC; Ad12: adenovirus12; Ad2: adenovirus 2; HBV: virus de hepatitis B; HPV 16: virus de papilloma humano 16; CMV: citomegalovirus; HSV: virus de herpes simplex; VSV: virus de estomatitis vesicular; HIV: virus de inmunodeficiencia humana; SIV: virus de inmunodeficiencia de simios; RaLV: virus de radation leucemia; RSV: virus de Rous sarcoma; Mo-MLV: virus Moloney-murino de leucemia; Mo-MSV: virus Moloney-murino de sarcoma; Ki-MLV: Kirsten-MLV; Ha-MSV: Harvey-MSV. (Tomado de: D. Maudsley, J y Pound, J., 1991.).

4.1.2 Infección en continuidad

El genoma de HCMV codifica una glicoproteína homóloga a la HSV-1 del virus de Herpes simple, la glicoproteína B, la cual es transportada a la membrana plasmática de células infectadas y es un componente abundante de la envoltura del virión (85).

Recientemente, Navarro y cols (85) concluyeron a través de ensayos de neutralización de la actividad de gB con un panel de anticuerpos monoclonales, que esta proteína viral juega un papel muy importante en la infección, promoviendo la penetración viral, en la diseminación de la infección de una célula a otra y en la fusión de células de glioblastoma U-373. Al parecer, los receptores que facilitan la unión de HCMV a la superficie celular difieren de las proteínas celulares que participan en el proceso de penetración, ya que el nivel de unión de HCMV a diferentes tipos celulares correlaciona con la abundancia del receptor, pero no así la penetración de los viriones y la expresión de proteínas inmediatas tempranas (85).

Este estudio es el primero en demostrar que las células de glioblastoma U-373 infectadas con HCMV se fusionan y que esta fusión es dependiente de la multiplicidad de infección y es bloqueada por anticuerpos neutralizantes que previenen la entrada de viriones a la célula y la transmisión de la infección de célula a célula. A etapas tardías de la infección gB se empaca densamente en las membranas celulares acompañada de otras glicoproteínas, que aunque también pudieran inducir fusión, el hallazgo de que anticuerpos monoclonales contra gB evitan la fusión, indica que gB es protagonista en el evento de fusión de células infectadas con células no infectadas. A pesar de que los mecanismos implicados no son totalmente entendidos hoy en día, el hecho de que una proteína viral tardía sea requerida para la diseminación del virus célula-célula habla de que al menos una buena parte de viriones maduros e infectivos escapan a la detección del sistema inmune por ocultamiento de sus estructuras (85).

4.2 Enmascaramiento

4.2.1 Unión del virus a $\beta 2m$

Algunos datos en la literatura han dado evidencias de la capacidad que muestra el citomegalovirus humano de unir la proteína β 2-microglobulina ($\beta 2m$) del huésped en fluidos corporales o en medio de cultivo, lo cual aumenta la infectividad del virus debido a una evasión de la neutralización inmune y a la adhesión a la célula huésped a través de la unión a la $\beta 2m$ (50,54,102)

La $\beta 2m$ es una proteína de aproximadamente 12000 Da, que constituye la cadena ligera de las moléculas de clase I del sistema principal de histocompatibilidad (HLA-I). En retículo endoplásmico se une a la cadena pesada (alfa o H) de estas moléculas sintetizadas de novo, y este complejo a su vez se estabiliza a través de la unión de un péptido endógeno, lo que permite su transporte y expresión en superficie. Así mismo, el sitio principal de unión de $\beta 2m$ soluble extracelular sobre la superficie celular es la cadena H (46).

En 1985 McKeating y cols (77) reportaron la falla de un ensayo diagnóstico de ELISA tradicional para detectar HCMV en muestras de orina fresca y el efecto positivo del almacenamiento de las muestras a 4°C por 1-2 semanas; ellos postularon la presencia de una sustancia inhibidora en orina fresca la cual fue identificada posteriormente como $\beta 2m$. Enseguida se demostró la unión de $\beta 2m$ a HCMV cepa AD-169 al adicionar esta proteína al medio de cultivo celular, pero sólo durante o después de la liberación de los viriones de la célula, con lo cual se predijo que HCMV se encuentra naturalmente en fluidos celulares recubierto de $\beta 2m$ y que esto además le pudiera conferir una estabilidad extra a las partículas virales (54).

La unión de $\beta 2m$ a HCMV urinario fue también capaz de evitar la neutralización de los virus por globulinas hiperinmunes, suero inmune humano y

por varios anticuerpos monoclonales (mAbs) murinos neutralizantes. Ya que CMV es transmitido por contacto directo con fluidos infectados como saliva, orina, sangre, leche materna y semen, los cuales contienen $\beta 2m$ libre, el hallazgo de la falta de neutralización viral tiene varias implicaciones *in vivo* facilitando la transmisión entre individuos y la diseminación del virus (76).

Estudios posteriores mostraron que la unión a $\beta 2m$ aumenta la infectividad del virus a células en cultivos, y que la $\beta 2m$ y HCMV compiten por sitios de unión sobre fibroblastos. Como resultados de la evidencia de que HCMV recubierto de $\beta 2m$ se une más eficientemente a células Raji (las cuales expresan moléculas HLA-I) que a células Daudi (deficientes en RNAm de $\beta 2m$ y no expresan HLA-I en superficie), se postuló que HCMV puede usar las moléculas HLA-I como receptores virales y desplazar $\beta 2m$ de los dímeros $\beta 2m$ -HLA-I sobre la superficie celular (50).

Recientemente, la utilización de técnicas inmunocitoquímicas y microscopía electrónica de tinción negativa han identificado proteínas situadas en un nivel ultraestructural inferior a la envoltura viral, que delimita las nucleocápsides y es comunmente denominado tegumento, como las involucradas directamente en la interacción con $\beta 2m$ (120). Esto permite sugerir que aún las cápsides no envueltas cuentan con un medio adicional de adhesión e inicio de infección a las células huésped diferente del que normalmente siguen los viriones intactos y envueltos; que probablemente implique entrecruzamiento de cadenas H de HLA-I por $\beta 2m$ sobre HCMV y el disparo de la internalización del virus por endocitosis vía receptor. Al parecer, el fenómeno puede jugar un papel importante cuando microambientes hostiles (como el de la orina) causan la degradación parcial de los viriones envueltos (120).

4.2.2 Unión de Inmunoglobulina G

En los últimos años se ha dirigido un interés particular a la distribución y significado biológico de la ocurrencia de receptores de inmunoglobulinas sobre varios tipos celulares. Receptores para IgG se han detectado en células linfoides como macrófagos, monocitos, neutrófilos, linfocitos *B* y linfocitos *T*, así como en algunas células no linfoides y tejidos neoplásicos. Mientras que en células linfoides la presencia de estos receptores presumiblemente gobierna los primeros pasos de la defensa inmune mediada por anticuerpos, sobre células no linfoides pudieran jugar un papel importante en la degradación de complejos Ag-Ac después de infecciones virales o exposición a antígenos, aunque tampoco se desecha la posibilidad de que los receptores inducidos como consecuencia de una infección viral representen un mecanismo de evasión inmune del virus (136).

Estudios realizados en 1984 por Frey y Einsfelder (36) han mostrado que fibroblastos humanos diploides expresan un receptor para IgG de alta especificidad, que une preferencialmente IgG agregada y reconoce a la molécula vía la región Fc. Para determinar el efecto de la infección de fibroblastos por HCMV sobre la expresión en superficie de receptores para IgG, se cultivaron *in vitro* fibroblastos humanos obtenidos de biopsias de piel de voluntarios sanos, se infectaron con HCMV cepa AD 169 y se midió la unión de moléculas IgG monoméricas y/o agregadas, marcadas radiactivamente con C^{14} . Los resultados obtenidos demostraron claramente la inducción de receptores para IgG (IgGFcR) a través del virus. El receptor reconoció primordialmente IgG agregada por la fracción Fc (ya que Fabs de IgG humana no desplazaron a la IgG unida), y en una manera saturable y dependiente de tiempo. La infección de los fibroblastos con HCMV incrementó más de 100 veces la unión de IgG mediada por receptores, con respecto a fibroblastos no infectados (36).

Posteriormente Xu-Bin y cols (140) aislaron los receptores de extractos de células infectadas con HCMV por cromatografía de afinidad (IgG) y los caracterizaron por inmunoelectrotransferencia (Western blotting) utilizando IgG marcada con I^{125} . De especial importancia fué el hallazgo de cuatro especies de receptores, con pesos moleculares de 130, 65, 50 y 38-kDa, responsables de la unión de IgG. Los FcR's de 130 y 65 kDa también fueron detectados sobre los viriones de HCMV. Las cuatro especies fueron reactivas con un mAb dirigido a la glicoproteína E del virus de Herpes simple (HSV), sugiriendo que el FcR inducido por HCMV está antigénicamente relacionado a los FcR de HSV. Los FcR's mostraron especificidad de subclases de IgG, siendo la relativa magnitud de unión del siguiente orden: IgG1 \geq IgG4 > IgG2 > IgG3 (140).

Por otro lado, Stannard y Hardie (121) han demostrado mediante microscopía electrónica con tinción de oro que la IgG se une al tegumento del HCMV mediante el Fc y que esta unión resulta inhibida cuando se preincuban los fragmentos Fc con proteína A y/o con β -2m. Al parecer, la unión se lleva a cabo cerca del sitio de interacción de la proteína A. El hecho de que la unión se lleve a cabo en espacios no membranales sugiere que el complejo Fc-proteína puede ayudar a que los virus que perdieron su envoltura continúen la infección (121).

A pesar de estos datos, el papel del receptor Fc inducible por HCMV en fibroblastos no humanos no queda del todo claro. El hecho de que la unión sea preferencial hacia IgG agregada sugiere la posibilidad de que el papel fisiológico sea unir complejos antígeno-anticuerpo *in vivo*. El número incrementado de FcR en las células infectadas pudiera entonces jugar un papel muy importante en la remoción de células infectadas por virus por macrófagos antes de la lisis celular, siendo el posible mecanismo que las células recubiertas con complejos Ag-Ac disparen la endocitosis por macrófagos y prevengan a las células infectadas de la lisis mediada por complemento, resultado de la unión de complejos inmunes al

FcR; y/o protegiendo de la neutralización por anticuerpos específicos, ya que la IgG no inmune unida provee una barrera física que limita el acceso de anticuerpos anti-virales a los viriones (121).

Si esto fuera comprobable, la persistencia de la infecciones por HCMV se explicarían, en parte, por este medio de escape del sistema inmune huésped (36,121,140).

4.3 *Mimetismo molecular.*

4.3.1 *Homología DNA viral-DNA Genómico celular.*

En 1984, Rudiger, Ruger y cols (104), demostraron la existencia de homología en las secuencias de ADN de HCMV y el genoma celular, a través de tecnología de ADN recombinante, específicamente por reacciones de hibridación de una biblioteca de ADN viral clonado en cósmidos con ADN procedente de tejido normal placentario humano, material de autopsia de hígado, tejido intestinal, leucocitos y células de carcinoma de colon, así como en algunas líneas celulares hematopoyéticas (104).

De estos trabajos se pudo deducir que las secuencias con homología no están relacionadas a secuencias *Alu*, representadas repetidamente en genoma humano, ni a secuencias del oncogen *c-myc*, lo que permite sugerir una ausencia de asociación del virus con enfermedad neoplásica (104).

Estudios similares de digestión/hibridación de DNA viral y DNA de genoma humano permitieron reportar en 1985 otras secuencias en genoma viral de la cepa AD 169 relacionadas por homología a células humanas, de ratón y de erizo. Los resultados indicaron que los principales sitios de hibridación de HCMV al ADN humano son los fragmentos *R*, *b* y *v-myc* y consistentemente con los

trabajos reportados anteriormente, se observó un bajo nivel de hibridación con el oncogen humano *c-myc*. Las homologías entre el DNA de HCMV y el genoma celular pudieran tener su origen en la formación fortuita de apareamientos estrechos de regiones cortas homólogas de DNA viral y celular, o alternativamente como consecuencia de transposiciones de DNA del genoma celular al viral o viceversa (112).

4.3.2 Homología a Proteína G.

Los miembros de la familia de receptores acoplados a la proteína G funcionan importantemente en transducción de señales celulares, regulación de homeostasis y desarrollo celular; ellos son activados por fotones o moléculas pequeñas, tales como neurotransmisores y hormonas glicoproteicas (71).

En 1990 Chee y cols (25) y en 1991 Welch y cols (134), publicaron los trabajos que identificaban tres genes de HCMV, UL33, US27 y US28 que codificaban polipéptidos de 390, 362 y 323 aminoácidos, respectivamente y que contienen siete dominios que cruzan membrana celular y una serie de motivos bien definidos característicos de los receptores acoplados a proteína G (GCR). El alineamiento de secuencias nucleotídicas de ambas familias reveló una correlación de aproximadamente 300 aminoácidos. Los tres genes se encuentran expresándose y no existe evidencia de la presencia de pseudogenes en la región única viral. Aun cuando el grupo de investigación de Welch ha evidenciado que los 3 genes son transcritos durante la infección lítica, y que su transcripción está restringida a la fase tardía, se desconoce si la homología con GCRs se refleja también a nivel funcional, en particular, si los productos polipeptídicos unen ligandos; si fuera así nos encontramos ante un desarrollo complejo por parte de HCMV, utilizado

hipotéticamente en el inicio de la infección cuando estas proteínas, constituyentes de la envoltura viral tienen contacto con proteína G, sin ser "visualizadas" como extrañas por el sistema inmune, pudiendo representar uno de los mecanismos de regulación de latencia o reactivación virales (25,134)

4.3.3 Homología a Quimiocinas.

Las interquinas o quimiocinas (cuyo nombre proviene de su capacidad quimiotáctica y su actividad de citocinas) son mediadores solubles que constituyen una familia de 18 proteínas pequeñas estructuralmente relacionadas, distinguidas por una secuencia característica de 4 residuos de cisteínas espaciados. Están divididas en 2 subfamilias, las C-C (β) (que tienen 2 residuos de cisteínas adyacentes) y las C-X-C (α) (poseen un aminoácido entre 2 cisteínas) (124). Miembros de la subfamilia C-C incluyen la MIP 1 (proteína inflamatoria de macrófagos 1), MCP-1 (la proteína quimiotáctica de monocitos) y la proteína RANTES; todas ellas tienden a ser quimiotácticas para monocitos. Dentro de la subfamilia C-X-C se encuentra, entre otros, la interleucina 8, cuya actividad quimiotáctica se dirige a neutrófilos. Las proteínas MIP 1 α y MIP 1 β son heterodímeros de 8 kDa producidas por macrófagos tratados con endotoxina. células T activadas, células B, células cebadas y fibroblastos. MIP 1 β atrae células T CD4+ y MIP 1 α tiende a atraer células B y T citotóxicas. Por otro lado, la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP) es producida por tratamiento de células mononucleares, fibroblastos y células endoteliales con IL-1 o TNF- α ; es quimiotáctica y activa monocitos, en los que estimula el estallido respiratorio y la liberación de enzimas lisosomales (Tabla 4-3). Recientemente, Neote y cols (87) aislaron un cDNA (de diferentes tipos celulares hematopoiéticos, incluyendo células mononucleares de sangre periférica y líneas celulares de monocitos como

U937, HL70 y THP-1), que codifica un receptor transmembranal para las quimiocinas β -(C-C) al que se le denominó C-C CKR-1. Este receptor es capaz de unir, con diversas afinidades, tanto a MIP 1 α y MIP 1 β , como a MCP y RANTES (87).

El análisis de la secuencia genómica de HCMV ha revelado tres marcos de lectura abiertos (US27, US28 y UL33) cuyas secuencias de aminoácidos deducidas pueden ser alineadas con receptores acoplados a proteína G (40). Los 3 transcritos virales son expresados en la fase tardía de la infección de fibroblastos humanos *in vitro*. De ellos, la secuencia de US28 muestra 30 % de identidad al receptor para quimiocinas β C-C CKR-1(87). En base a esta secuencia, experimentos de clonación y expresión de US28 en células de riñón humano evidenciaron la unión específica de las células transfectadas a MIPs, MCP y RANTES radiomarcados; cuya señal disminuyó al promover una competencia con las quimiocinas α (IL-8). Estos resultados sugirieron que la proteína codificada por US28 une específicamente quimiocinas C-C, pero no C-X-C (40,87).

Este hallazgo pudiera dirigir eventualmente a una mayor comprensión de las patologías asociadas con la infección por HCMV y permite suponer que forma parte de una estrategia para evadir la respuesta inmune anti-viral (3), aunque para delinear el papel biológico preciso de esta molécula viral sería interesante un análisis *in vivo* de virus mutantes en los que haya sido deletado US28.

Mientras que las quimiocinas probablemente se han desarrollado para alertar al sistema inmune del huésped de evasiones microbianas, los conocimientos actuales parecen apuntar a que algunos virus pueden usar el sistema de quimiocinas para poner en desventaja al huésped a través de mimetismo molecular (3,81).

Tabla 4-3. La superfamilia de las quimiocinas humanas.

	Quimiocina	Célula blanco	Receptor(es)
α (CXC) quimiocinas (cromosoma 4)	γ IP-10	M,T	?
	Mig	?	?
	NAP-4	N	?
	PF-4	N,M,T	?
	ENA-78	N	?
	GCP-2	N	?
	GRO α	N, Ba	IL-8RB
	GRO β	N, Ba	?
	GRO γ	N, Ba	?
	NAP-2	N	IL-8RB
	IL-8	N,T,Ba, Eo	IL-8RB,IL8RA
	Quimiocina	Célula Blanco	Receptor (es)
β (CC) Quimiocinas (cromosoma 17)	MCP-1	M, Ba	?
	MCP-3	M,Eo,Ba	?
	MCP-2	M	?
	MIP-1 α	M,T,B,Eo,Ba, N,MP	MIP-1 / RANTES R
	MIP-1 β	M,T	?
	RANTES	M,Eo, Ba,T,N	MIP-1 α / RANTES R
	I-309	M	?

(M=macrófago; Ba=basófilo; Eo=eosinófilo; T=célula T; B= célula B; N= neutrófilo) (Tomado de: Ahuja,S.K., Gao .J. y Murphy,P.M.1994. Chemokine receptors and molecular mimicry).

4.4 Supresión inmunológica

La infección por CMV puede causar un estado de inmunodepresión profunda, aunque transitoria, en individuos inmunocompetentes. La destrucción citopática que sufren las células infectadas no parece ser suficiente para explicar el fenómeno, lo que permite proponer como alternativa la hipótesis de que una inmunoregulación por mediadores como citocinas pudieran participar amplificando las modificaciones locales hechas por la infección viral (123).

Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* confirman la desregulación de producción de citocinas en la infección por CMV: los pacientes con transplante de hígado tienen altos niveles de factor necrosante de tumores alfa (TNF- α) durante la enfermedad (123). Los receptores de transplantes de pulmón que experimentan neumonitis por CMV, elevan los niveles de IL-6 y del receptor de IL-2 (IL-2R) en circulación (59,60).

Por otro lado, *in vitro*, la infección de fibroblastos induce activación transcripcional de IL-6, factor de crecimiento derivado de plaquetas, TNF- α , e IL-1; la infección de leucocitos de sangre periférica y células endoteliales resulta en la producción aumentada de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ y factor estimulante de colonias-1 (CSF-1) (90); y la infección de células de médula ósea incrementa la producción de IFN- α , IFN- γ , TNF- α , IL-6 y factor básico de crecimiento de fibroblastos, aunque transitoriamente suprime la producción de IL-1 α e IL-1 β (63).

Está reportado que el factor básico de crecimiento de fibroblastos inhibe la replicación de CMV en fibroblastos (4), y que el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1), una citocina cuyo promotor es activado por proteínas inmediatas tempranas de HCMV (IE), estimula la replicación de CMV y regula negativamente algunos sistemas efectores de la respuesta inmune (78).

Por otro lado, se ha demostrado que los leucocitos mononucleares de sangre de pacientes con mononucleosis causada por HCMV son selectivamente hiporespondedores a ciertos mitógenos como PWM y concavalina A *in vitro*, pero se comportan igual que las células de individuos normales en una respuesta hacia fitohemaglutinina PHA y células alogénicas (98).

Rinaldo y colaboradores (99) al estudiar un grupo de 18 pacientes con mononucleosis por CMV en etapa aguda y de convalecencia, cultivaron sus leucocitos e hicieron ensayos de transformación de linfocitos con diversos mitógenos, encontrando que durante la etapa aguda de la mononucleosis, los leucocitos mononucleares disminuyeron su respuesta a PWM y concavalina A, y que en etapa de convalecencia ésta se recuperaba. Sin embargo, precultivando las células 7 días antes de la adición de concavalina A y aún más, depletando las células adherentes del cultivo, se aumentó considerablemente la respuesta blastogénica al mitógeno. Esto permitió sugerir que la hiporrespuesta a mitógenos en mononucleosis por CMV podría estar mediada por células supresoras que están incluidas en la población de leucocitos mononucleares adherentes, y que la liberación de mediadores celulares que regulan la reactividad hacia mitógenos se ve alterada durante ciertas etapas de la enfermedad (99).

En 1986, Schrier y cols (108) investigaron el efecto que tiene el HCMV proveniente de aislados clínicos frescos, sobre células NK o asesinas, y sobre la proliferación de las células T y mostraron que este virus puede suprimir en cultivo tanto la proliferación de células T (la cual se ve afectada más rápidamente) como la actividad de NK, que se dió después de 7 días de cultivo y parece no estar relacionada con el título viral. Cuando se utilizó el mitógeno, PHA, la actividad del mitógeno se vió inhibida. La adición de IFN- α reconstituyó parcialmente la respuesta de las células NK, pero ni este IFN, ni IL-2 reconstituyeron la proliferación de células T. Experimentos de depleción y reconstitución,

evidenciaron que la supresión de la actividad de las células NK aparentemente esta mediada por monocitos infectados, lo que confirma los hallazgos de Rinaldo y cols (99,108)

Las cepas de HCMV tradicionales de laboratorio han mostrado siempre mucho menor actividad supresora que los aislados de pacientes. Estos efectos inmunosupresores, los cuales pueden tener su origen en múltiples mecanismos, parecen ser el resultado directo de una infección de linfocitos y esto tendría un gran significado e impacto *in vivo* al complicar y empeorar la condición del paciente inmunocomprometido (108).

En vista de que la inmunosupresión puede ser causa de efectos citopatológicos en células inmunocompetentes, Rodgers y cols (101) han estudiado el efecto que tiene el HCMV cepa AD-169 sobre la actividad de la IL-1. Una de las principales funciones de los monocitos y macrófagos es el procesamiento y la presentación del antígeno a las células *T* y la secreción de IL-1, la cual provee un segundo mensaje para la activación de las células *T* y es capaz de regular la diferenciación de células B. Algunos ensayos realizados *in vitro* demuestran que existe un inhibidor de la actividad de la IL-1, correspondiente a una proteína liberada por monocitos infectados HCMV cepa AD-169; esto ha sido confirmado con otros hallazgos del mismo fenómeno en células macrófágicas U937 infectadas (101).

Cuando Rodgers y cols (101) preincubaron timocitos con el inhibidor de IL-1, durante una hora, la respuesta que obtuvieron hacia los efectos mitogénicos de la concavalina A y la potenciación de los efectos de la IL-1 fué nula. Esto sugiere que el inhibidor presente en células infectadas por HCMV, actúa al nivel de la respuesta celular de la IL-1; esta inhibición no afecta la proliferación de la IL-2, dependiente de la PHA. Reportes recientes describen un inhibidor de la IL-1, encontrado en orina de pacientes en estado febril; este inhibidor tiene un peso

molecular menor, comparado con el inhibidor de origen celular antes descrito, de una aparente masa molecular de 95 kDa. Si este inhibidor, es una proteína de la célula huésped, se sugiere un mecanismo de inmunosupresión del virus, asimismo, aumenta la posibilidad de que los monocitos normales liberen el inhibidor de la IL-1 en respuesta a otros estímulos fisiológicos (10).

En 1987 Rice y cols (94) por un lado, y Carney y Hirsch por otro, exploraron el papel de IL-1 e IL-2 en células mononucleares inmunosuprimidas *in vitro* por CMV. Carney y Hirsch en 1987 reportaron que el efecto de inmunosupresión está mediado por monocitos o macrófagos, ya que en cultivos de linfocitos purificados con células libres de virus, la respuesta de proliferación no se ve suprimida. En los experimentos de Rice se demostró que cuando el CMV infecta los linfocitos, la supresión aumenta considerablemente a comparación de una infección de monocitos, aunque la producción de IL-1 e IL-2 disminuye en ambas infecciones, y a pesar de hacer un intento por reconstituir la respuesta adicionando IL-1 o IL-2 exógena, los resultados no fueron positivos. Al parecer CMV atrofia la capacidad de producción de IL-1 e IL-2 en linfocitos y monocitos, aunque no se ha encontrado evidencia de la existencia de un inhibidor viral de IL-2 (61).

4.5 Modulación de la Expresión de moléculas I y II del Complejo Principal de Histocompatibilidad.

Las moléculas de histocompatibilidad (cuyas características generales se muestran en la tabla 4-4) juegan un papel imprescindible en la "vida cotidiana" del sistema inmune, ya que promueven y median la interacción celular y el reconocimiento íntimo de los materiales extraños por las células efectoras del sistema (1).

Hay evidencias de que HCMV reduce significativamente la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase I en la superficie de células infectadas, y que posiblemente participe en la modulación de la expresión de las moléculas de clase II (50,106).

Por la importancia de las implicaciones que estos fenómenos representarían en el buen funcionamiento y eficacia de la inmunidad generada -afectación de la cooperación y citotoxicidad celulares-, el seguimiento de los estudios realizados al respecto se revisará en un capítulo aparte.

Tabla 4-4. Propiedades de las proteínas de clase I y clase II del MHC.

	<i>Clase I</i>	<i>Clase II</i>
Estructura de las cadenas	Glicoproteínas de 45,000 Da de peso molecular + β 2-microglobulina	Cadena α (33 kDa de peso molecular) Cadena β (28 kDa de peso molecular)
Distribución celular	Casi todas las células somáticas nucleadas	Células B, algunos macrófagos, células dendríticas, células epiteliales del timo y células T activadas
Actúan en la presentación de antígenos a:	Células T citotóxicas (células CD8+)	Células T cooperadoras (células CD4+)

(Tomado de: Schaechter, Medoff, Einsenstein y Guerra, 1994. Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas.)

CAPITULO 5.

Modulación de la Expresión de Moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad en la Infección por HCMV.

5.1 Moléculas de clase I.

Como ha sido mencionado, algunos virus han desarrollado estrategias para reducir la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en las células huésped y así escapar a su detección por el sistema inmune (73). En algunos casos, el control de esta expresión es a nivel transcripcional (106,107), y en otros el evento se lleva a cabo post-transcripcionalmente a través de proteínas residentes en retículo endoplásmico que se asocian a las moléculas e impiden su transporte a la superficie (5,20,39) o proteínas virales citoplasmáticas que evitan la translocación de péptidos dentro del retículo endoplásmico (37,55).

El citomegalovirus murino (MCMV) origina un secuestro de las moléculas de clase I (MHC-I) en RE al momento de expresión de los genes virales tempranos; el mecanismo que explique este fenómeno aún no está claro (24,30).

Con respecto a citomegalovirus humano, algunos autores han evidenciado una franca disminución de la expresión en superficie celular de moléculas MHC-I (17,132), mientras que los niveles de RNAm de la cadena pesada se mantienen inalterados durante la infección. Se postulan varias hipótesis para tratar de explicar este fenómeno, el cual pudiera significar un mecanismo de evasión viral a la red de vigilancia y efectora del sistema inmune, y por ello se han dirigido grandes esfuerzos hacia la obtención de datos experimentales que permitan determinar el destino de estas moléculas dentro de la célula al momento de la infección viral (42).

Por un lado existen evidencias de que CMV induce un descenso progresivo de la expresión de moléculas MHC-I en la superficie de fibroblastos infectados *in vitro*, en los cuales los niveles declinan desde 24 h post-infección, de modo que a los 5 ó 6 días prácticamente ninguna célula es positiva en términos de fluorescencia indirecta (FACS). Al parecer esta regulación sólo es negativa para las moléculas expresadas en la superficie, ya que las mismas células presentan niveles altos de MHC-I y β_2m en el citoplasma, comparadas a células no infectadas en las que hay una distribución difusa de moléculas en el citoplasma, patrón que es dramáticamente alterado después de la infección por CMV, cuando los antígenos de clase I parecen acumularse en el área perinuclear (Fig 5-1) (7,139).

5.1.1 Participación de proteínas virales.

En 1988 Beck y Barrell (8) realizaron un análisis de la secuencia nucleotídica del genoma de HCMV y reportaron la presencia de un marco de lectura abierto cuyo producto de traducción predicho (H301 o UL18) tiene homología con la cadena pesada (H) de la molécula de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-I) de eucariotes superiores. Aunque el gen viral no sufre procesos de corte y escisión, la secuencia de aminoácidos deducida revela una alta conservación de características estructurales de MHC- clase I. La longitud predicha de la cadena α de HCMV-UL18 madura es de 350 aminoácidos, con 13 sitios potenciales de glicosilación, lo cual hace casi imposible la predicción del PM exacto, que debe variar entre 40 y 68 kDa. El dominio alfa 1 tiene similitud del 21% con el homólogo en MHC-I, alfa 2 del 20% y alfa 3 del 22%, este último en los antígenos de clase I contiene un sitio de unión a β_2m formado por una asa de 6 aminoácidos (posición 258-263); cuatro de estos 6 residuos se encuentran conservados en el dominio viral alfa 3, lo que sugiere que UL18

también comparte el sitio de unión funcional a $\beta 2m$. Por otro lado, UL-18 contiene una potencial secuencia transmembranal de 23 aminoácidos, pero su región citoplásmica no contiene sitios de fosforilación, lo que pudiera ser de significancia en el proceso de ingestión viral (8)

Con el fin de determinar si esta proteína homóloga de MHC-I puede interactuar con $\beta 2m$, Browne y cols (18) construyeron un virus de vaccinia recombinante que expresa ambas proteínas, UL-18 y $\beta 2m$. Como el virus de vaccinia *apaga* la síntesis de proteínas celulares, la infección de fibroblastos con cada clona recombinante sola no resulta en la interacción de la proteína expresada con productos génicos celulares. Cuando las células se coinfectan con ambos virus recombinantes, el producto del gen UL-18 (PM aprox. 67 kDa) coprecipita con $\beta 2m$, usando un mAb contra $\beta 2m$. En células infectadas con vaccinia- $\beta 2m$, el producto recombinante ($\beta 2m$) es detectado en citoplasma y raramente en superficie celular, lo cual concuerda con el conocimiento de que la expresión en superficie de $\beta 2m$ requiere síntesis de MHC-I. En cambio, la expresión en superficie de células coinfectadas (v-UL18 y v- $\beta 2m$) aumenta significativamente, ya que en condiciones normales las moléculas de clase I se asocian con proteínas endógenas y presentan sus péptidos a la superficie celular, y en células infectadas por virus, la presentación de antígenos a través de estas moléculas permite el reconocimiento viral por linfocitos autólogos CD8⁺; los hallazgos anteriores han permitido especular que una función de la proteína viral homóloga a MHC-I es secuestrar a $\beta 2m$, con esto evitar la maduración de las moléculas de clase I y hacer a la célula infectada por HCMV irreconocible por las células T citotóxicas del individuo, lo cual pudiera interpretarse como un mecanismo de evasión a la actividad del sistema inmune (18).

A la luz de estos conocimientos y haciendo uso de técnicas de DNA recombinante, recientemente se realizó la inserción del gen de β -galactosidasa en

el locus UL-18 del genoma de CMV para inactivar el gen (18). El virus recombinante no mostró diferencias fenotípicas con la cepa silvestre de HCMV en términos de curvas de crecimiento o proporciones de partículas infectivas, lo que indica que el producto del gen UL-18 es dispensable para el crecimiento *in vitro* de HCMV en fibroblastos. En este trabajo se demostró que la síntesis del heterodímero de clase I maduro es disminuida en células infectadas a alta multiplicidad con HCMV y que había un efecto similar cuando los fibroblastos se infectaban con el virus recombinante; con lo que se sugirió que aunque el producto del gen UL-18 pudiera asociarse con $\beta 2m$, probablemente no esté involucrado directamente en la falta de ensamble de las moléculas de clase I (18).

La posible participación de UL-18 u otra proteína estructural en la disminución de las moléculas de clase I, así como los mecanismos moleculares responsables de este fenómeno y su posible implicación en la generación de una respuesta protectora hacia HCMV aún no ha podido esclarecerse. Al respecto se ha demostrado en un modelo murino de infección por citomegalovirus murino (MCMV) que la infección de macrófagos y fibroblastos transformados con el virus SV40, evita la presentación del antígeno T de SV40 a CTL's específicas, y que este evento parece estar relacionado directamente con la expresión de genes tempranos de MCMV (128). Por otro lado, estudios realizados por Del Val y cols (30) y por Campbell (21) describen una inhibición selectiva en la presentación de la proteína inmediata temprana pp89 a clonas específicas de CTL's y proponen el producto de un gen temprano como responsable de este efecto a través del bloqueo del transporte del complejo trimolecular (MHC-I- $\beta 2m$ -péptido) en el compartimiento de Golgi medio.

5.1.2 Alteración del transporte de MHC-I a la superficie celular.

En 1988 Grundy y cols (51), reportaron una expresión aumentada de moléculas MHC-I en cultivos de fibroblastos humanos infectados con bajas dosis de HCMV comparados con fibroblastos no infectados; sin embargo, este efecto decreció significativamente con la adición de un anticuerpo neutralizante contra interferón β , sugiriendo que el interferón liberado por las células infectadas fué responsable de la regulación positiva de la expresión de los antígenos MHC-I en las células no infectadas del cultivo (51).

En 1992, Barnes y Grundy (7) demostraron una regulación negativa de estas moléculas en superficie dependiente de la dosis viral, tal que en estadios tardíos de la infección celular (72 h) la mayoría de las células infectadas no tienen moléculas detectables (por inmunofluorescencia indirecta) en superficie. Este decremento coincidió con un incremento en la expresión citoplasmática y el análisis de microscopía de laser permitió la detección de las moléculas MHC-I como acúmulos en el compartimiento perinuclear dentro de las células infectadas (7).

5.1.3 Degradación acelerada de la cadena H en espacio pre-Golgi.

En 1993, Yamashita y cols (141) propusieron una regulación negativa en la expresión en superficie de antígenos MHC-I de células infectadas por HCMV, que obedece a un defecto que ocurre post-traduccionalmente, probablemente a nivel de la formación correcta del complejo cadena H- β 2m y/o a nivel de transporte intracelular de MHC-I. Sus estudios se basaron en análisis de moléculas en superficie por citometría de flujo-inmunofluorescencia indirecta (FACS) y en ensayos de inmunoprecipitación, los cuales revelaron una franca reducción (al

20%) en el nivel de MHC-I de células a 72 h post-infección, con respecto a células no infectadas; esta reducción fue también observable aún en presencia de un inhibidor de la síntesis de DNA viral (9-*I*,3-dihidroxi-2-propoximetil-guanina DHPG), lo que indicó que la expresión de genes virales tardíos no se requiere en el efecto de regulación negativa. Las inmunoprecipitaciones de cultivos marcados con Metionina-S³⁵ con un mAb (W6/32) que reconoce cadena II asociada a β 2m detectaron muy poca cantidad de cadena II con respecto a las células no infectadas, sin embargo al precipitar con el mAb TP25.99, que reconoce cadena II libre y asociada a β 2m, no fué evidente una reducción en la síntesis de esta molécula (141).

Estos resultados llevaron a los mismos autores a buscar experimentalmente el posible defecto post-traduccionaI y en 1994 (142) reportaron un fenómeno de degradación rápida de MHC-I en retículo endoplásmico de las células infectadas con HCMV; comparando el destino de las moléculas MHC-I en fibroblastos infectados y no infectados, por análisis de "pulso y caza" en combinación con tratamientos con endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (endo H).

Como otras glicoproteínas, las cadenas II del MHC son cotraduccionaImente glicosiladas y adquieren manosas en RE; la endo-H rompe las uniones de oligosacáridos de manosas de las proteínas. Durante el transporte de RE a Golgi, la cadena II pierde las manosas y adquiere azúcares que contienen galactosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico como proceso natural de maduración, de modo que en el compartimiento medio-Golgi, la estructura es resistente a endo-H (9,10,142).

En los experimentos descritos con células no infectadas, las cadenas II son sensibles a endo-H inmediatamente después de la síntesis, pero al final de una "caza" de moléculas de 180 min, virtualmente todas ellas son resistentes, lo que indica que han alcanzado el Golgi; en contraste, las cadenas II de las células

infectadas permanecen sensibles a endo-H durante todo el periodo de "caza", y la mayoría de la proteína desaparece al final, lo que en esencia hizo suponer que nunca accesan al aparato de Golgi y son degradadas en compartimientos pre-Golgi (9,10,142).

5.1.4. Reducción de la estabilidad de cadenas H de MHC-I.

Con una estrategia experimental muy similar a la seguida por Yamashita, Beersma y cols (10) y Warren y cols (132) propusieron en 1993 que HCMV reduce los niveles de MHC-I al interferir con la estabilidad de las cadenas H. Al examinar la biosíntesis de MHC-I humanas (HLA-A) en fibroblastos humanos y fibroblastos de ratón transfectados con genes que codifican la cadena H de la molécula HLA-B27 y $\beta 2m$ humana, encontraron que la reducción es específica de la molécula humana y que ésta es menos estable en los lisados celulares mantenidos a 37 ° C por diferentes períodos de tiempo, comparada con células no infectadas (10,132).

Además, el efecto en la expresión de MHC-I es insensible al ácido fosfonoacético (inhibidor de síntesis de genes virales), lo que sugiere una participación de proteínas virales inmediatas tempranas y no tardías (10).

En un intento de estos grupos de investigación de explicar como puede la infección por HCMV afectar la estabilidad de las cadenas H se propuso la modificación de la conformación de estas cadenas después de su síntesis, resultando en una asociación reducida con $\beta 2m$ y su rápida degradación, que podría ser a través de una interacción física débil y transitoria de una proteína viral con MHC-I (10).

Otras posibilidades son defectos en el aporte o generación de los péptidos que se asocian a MHC-I y/o en la asociación con chaperoninas. Al respecto, algunas observaciones, aún no publicadas, indican que no hay diferencias significativas en la expresión de las moléculas TAP 1 y TAP 2 entre células infectadas y no infectadas, así como tampoco en los niveles de la expresión de la chaperonina IP-90, molécula requerida en la biogénesis de MHC-I estables (Fig 5-1).

5.2 Moléculas de clase II.

La participación de HCMV en la modulación de la expresión de moléculas de clase II de MHC ha sido relativamente poco estudiada. En 1986 von Willebrand y cols (129) asociaron la infección por HCMV a una regulación positiva de antígenos MHC-II, en la mayoría de los casos, acompañada rápidamente de una evidencia citológica y/o clínica de rechazo de injertos en pacientes que han experimentado trasplante de riñón; este fenómeno fué atribuido al IFN- γ producido en respuesta a la infección viral, lo cual presumiblemente generaría un círculo vicioso en el injerto: el IFN γ activa monocitos en reposo, los que liberan IL-1 y ésta incrementaría la presentación de Ag y por lo tanto la inflamación, es decir el rechazo del trasplante (129).

Por otra parte, Fujinami en 1988 (38), observó la existencia de una región homóloga y con reactividad inmunológica cruzada entre la proteína viral IE-2 y la cadena β de HLA-DR, lo cual explicaba, según el autor, la detección aumentada de moléculas y la participación directa de HCMV en el rechazo de órganos transplantados. En el mismo año (128) surgió la primera demostración de que HCMV no causa un incremento en la expresión de clase II cuando infecta células

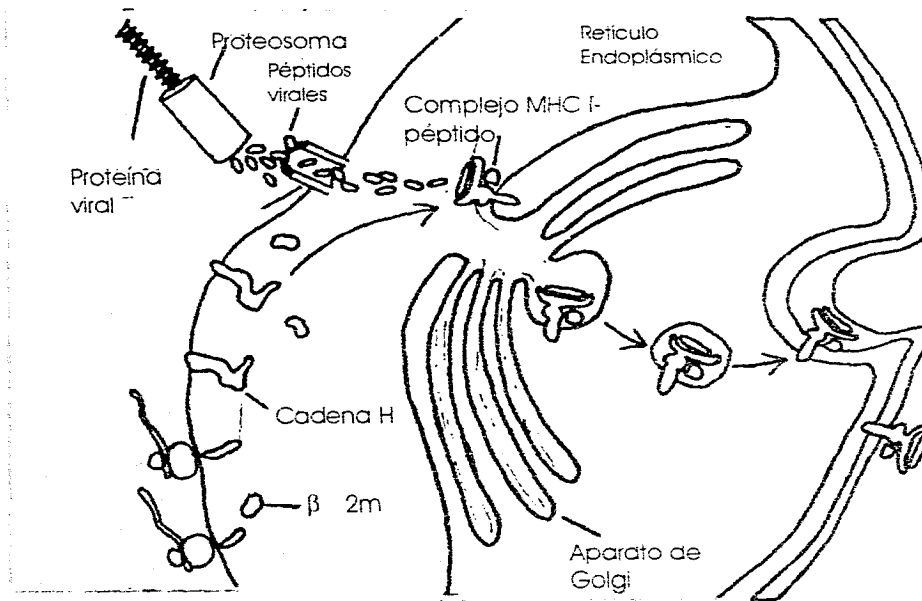
endoteliales, sin embargo cuando se adiciona IFN γ al medio de cultivo después de la infección, es evidente un aumento en la expresión de aquellos antígenos, comparable a células no infectadas, lo que sugiere que CMV no inhibe la expresión inducida por IFN γ . A este estudio siguieron otros que revelaron la incapacidad del virus de inducir un aumento de la expresión de HLA DR y DQW1 en cultivos de células endoteliales en ausencia de citocinas, particularmente IFN γ (110) ya que *in vitro* el IFN β es capaz de suprimir la expresión de HLA-DR inducida por IFN γ , se plantea la posibilidad de que la infección por HCMV resulte en la producción de IFN β por las células endoteliales, con la subsecuente inhibición de la síntesis de HLA DR.

Este mismo grupo de trabajo demostró posteriormente una inducción *in vitro* de la expresión de MHC-II en células endoteliales no infectadas con HCMV, pero cocultivadas con linfocitos alogénicos CD4+ provenientes de individuos seropositivos; aparentemente el fenómeno fué una consecuencia de la activación de las células T específicas, ya que el efecto inductivo fué totalmente atenuado con la adición de un mAb anti IFN γ al cultivo (111).

Finalmente en 1994 Sedmak y cols (111), a través de ensayos de inmunofluorescencia indirecta/citometría de flujo, mostraron una reducción franca de la expresión de superficie y citoplasmática de HLA-DR, que no ocurrió cuando las células fueron tratadas con virus inactivados por luz UV e IFN γ . Por otro lado, el análisis tipo "Northern blot" de las células infectadas y tratadas con IFN γ reveló una ausencia de RNAm de MHC-II, lo cual demuestra que el evento de reducción de estos antígenos es secundario a la inhibición de la transcripción de los genes de clase II. La estrategia usada por HCMV para bloquear la transcripción de MHC-II todavía está por dilucidarse. Existe la posibilidad de una

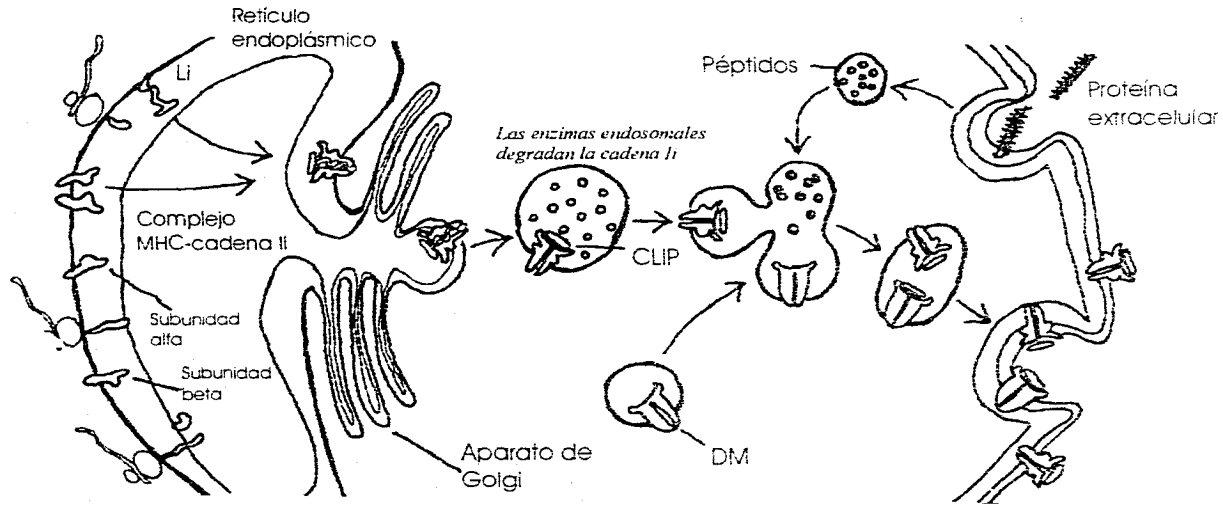
transactivación mediada por productos de genes virales inmediatos tempranos, o probablemente el genoma de HCMV contenga secuencias que presente homología con IFN α o β y que ellas retroregulen la expresión de MHC-II. Esta capacidad viral pudiera representar un importante mecanismo para la persistencia de HCMV, al proteger a las células infectadas de la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD4 (+) (Fig 5-2) (111).

Fig. 5-1. Presentación de antígenos a través de moléculas MHC clase I.



El procesamiento de antígenos a través de moléculas MHC clase I comienza cuando proteínas extracelulares se reducen a péptidos mediante proteosomas. Esos péptidos son llevados al retículo endoplásmico mediante una proteína transportadora, TAP. Dentro del retículo endoplásmico los péptidos se asocian a las subunidades alfa y beta clase I que se encuentran parcialmente plegadas y se forma un complejo MHC-péptido. El complejo atraviesa el compartimento de Golgi y llega a la superficie celular, donde puede ser reconocido por células T CD8⁺. (Tomado de: Engelhard V.H., 1994. How cells presents antigen).

Fig. 5-2 Presentación de antígenos a través de moléculas MHC clase II



El procesamiento de antígenos a través de moléculas MHC clase II comienza con la síntesis y unión de estas moléculas a la cadena invariante (Ii) en el RE. El complejo formado pasa a través del Golgi, después de lo cual entra en endosomas, donde la cadena se reduce a pequeños péptidos denominados CLIP. Dentro de las vesículas endosomales, una molécula denominada DM libera el CLIP de la molécula MHC-II que se une a proteínas extracelulares que han sido endocitadas y degradadas en lisosomas. El complejo MHC clase II-péptido migra a la superficie celular para ser reconocido por células T CD4+. (Tomado de: Engelhard V.H, 1994., How cells presents antigens)

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Discusión y Conclusiones

La historia reciente del mundo transita por un camino de cambios importantes en aspectos primordialmente económicos y sociales, que han repercutido en el entorno ecológico y esto a su vez en cambios demográficos y de salud. La constante innovación tecnológica y científica ha acelerado de una forma indirecta y/o directa el ciclo de la vida, generando movimientos que benefician o deterioran la vida de los individuos. En los aspectos de salud, los cambios han sido trascendentes. A pesar de que mundialmente la población se duplica cada veinte años, principalmente en países subdesarrollados, y con esto aumenta también el número de enfermos y enfermedades, la mortalidad general ha disminuido considerablemente y, de la misma manera, la esperanza de vida al nacer se ha incrementado. Al interior de este mosaico de cambios, el perfil de morbi-mortalidad por causas también se ha modificado. En términos generales el porcentaje de muertes atribuido a enfermedades transmisibles se ha reducido en más del 50%, mientras que las defunciones por enfermedades crónico-degenerativas, accidentes y violencias ha aumentado.

Estas variaciones y alteraciones en el comportamiento de la humanidad y la naturaleza misma estimulan modificaciones o transformaciones en el entorno biológico, de manera que los virus, microorganismos "casi perfectos", se afanan en echar a andar maquinarias evolutivas que les permitan sobrevivir y adaptarse a lo que se ofrece.

La explosión del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida por VIH (en México es ya la tercera causa de muerte en hombres de 20 a 30 años) y el gran aumento de casos de transplantes de órganos, entre otras situaciones, han permitido la reactivación masiva y compleja de virus persistentes, oportunistas y

patógenos, tal es el caso de citomegalovirus humano (HCMV), causante de la muerte del 90% de pacientes con SIDA que presentan infección por este virus, y de un elevado número de casos de infecciones perinatales, congénitas, por transfusiones y trasplantes.

Hasta el momento no se cuenta con un tratamiento profiláctico (vacunal) que ayude a individuos inmunocomprometidos a resolver una infección por HCMV, lo que se debe en gran medida a la falta de entendimiento acerca del pobre reconocimiento inmune en etapas tardías de la infección. Esencialmente existen dos razones por las cuales pudiera darse una infección viral persistente: una respuesta inmune ineficiente e inefectiva en el reconocimiento y la eliminación de partículas virales y/o células infectadas, y una estrategia única de replicación viral. Lo cierto es que la persistencia viral ocurre en la naturaleza como un mecanismo de evasión del sistema de vigilancia inmune del huésped, aunque a nivel molecular todavía no se han resuelto con exactitud las preguntas de ¿cómo se da y que media o permite esta permanencia? ¿ocurre, al menos en cierto grado, tolerancia inmunológica durante una infección viral persistente? ¿si no hay selección clonal, qué le permite al virus persistir, en ocasiones durante toda la vida de un individuo?. Los planteamientos para abordar o armar este rompecabezas constituyen el gran reto de la virología moderna, ya que el interés estriba no solo en razones intelectuales, sino en objetivos pragmáticos de prevención, tratamiento o cura de infecciones persistentes.

Para lograr productos que generen una inmunidad efectiva contra citomegalovirus, es importante comprender con profundidad los mecanismos de patogenicidad, así como la naturaleza de la respuesta inmune que se genera en contra del virus; por lo que es necesario que la investigación científica se enfoque fundamentalmente en la generación de información en aspectos de la biología celular y molecular e inmunología de la infección, primordialmente.

La aparición y desarrollo de tecnologías modernas de Inmuno-biología molecular han tenido avances sin paralelo en la última década y han permitido obtener francos adelantos en el estudio de las varias estrategias usadas por HCMV para evadir la red de vigilancia y efectora del sistema inmune, las cuales, al parecer, no se dan aislada, sino concertada y simultáneamente.

Las evidencias que se tienen al respecto a la luz de los conocimientos actuales, y que hemos presentado a lo largo de esta revisión se refieren a:

El ocultamiento viral, a través de la latencia y la infección en continuidad, lo que reduce la posibilidad de que el virus sea detectado por el sistema inmune; la unión a su envoltura de inmunoglobulinas G y de moléculas de beta-2-microglobulina, que le permiten un efecto de enmascaramiento; la capacidad de hacer mimetismo molecular mediado por estructuras con diversos grados de homología a moléculas celulares, y la inmunosupresión que provoca, al alterar algunas funciones de monocitos y macrófagos, como es la producción de IL-1. Aunado a éstos, interesantemente la infección por HCMV induce un fenómeno de regulación de la expresión en superficie celular de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, en particular cuando se trata de moléculas de clase I maduras, el efecto es de franca y consistente reducción en varios sistemas *in vitro* analizados, mientras que con respecto a moléculas de clase II aún se no se conoce en su totalidad el efecto o la participación que HCMV pudiera tener. De cualquier modo, el resultado final implica un drástico impacto en la eficiencia de resolución de la infección viral, ya que la inmunidad mediada por células es responsable de eliminar las infecciones virales y limitar la reactivación de virus persistentes a través de linfocitos T citotóxicos, primordialmente de fenotipo CD8+, contra antígenos virales presentes en las células infectadas.

Se han postulado varias hipótesis para tratar de explicar el fenómeno de disminución de clase I:

- Competencia entre la cadena H de la molécula del MHC-I y el producto del gen viral UL-18 por la B-2m disponible en retículo endoplásmico; esta hipótesis es basada en el alto grado de homología secuencial entre UL-18 y cadena H, y apoyaría la observación de que en fases tardías de la infección es evidente un decremento de la respuesta inmune.
- Alteración del transporte de MHC-I a la superficie celular por la acumulación de moléculas en espacio perinuclear.
- Degradación acelerada de la cadena pesada de MHC-I en espacio pre-Golgi.
- Reducción de la estabilidad de las moléculas MHC-I y por consiguiente de la maduración y expresión de éstas.

Aún cuando los mecanismos 2,3 y 4 propuestos no necesariamente se excluyen y han sido parcialmente demostrados en forma experimental, no se ha resuelto de que manera participa HCMV en la regulación de la expresión de MHC y por consiguiente en el disparo de las células citotóxicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Accolla, R.S., Adorini L., Sartoris, S., Sinigaglia, F and Guardiola J. 1995. **MHC:orchestrating the immune response**. Immunol Today, 16: 8-11
2. Adishi,J.D., Lahijani R.S., and Jeur S.C. 1990. **Identification of a putative cell receptor for human Cytomegalovirus**. Virology. 176:337-345
3. Ahuja,S.K., Gao,J and Murphy,P.M. 1994. **Chemokin receptors and molecular mimicry**. Immunol Today 15:281-287.
4. Alcami,J., C.V. Paya, J.L.Virelizier and S.Michelson. 1993. **Antagonistic modulation of human cytomegalovirus replication by transforming growth factor β 1 and basic fibroblast growth factor**. J Gen Virol. 74:269-274
5. Anderssons, M., Paabo S., Nilsson T. and Peterson P.A., 1985. **Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible mean for adenoviruses to evade immune surveillance**. Cell, 43: 215
6. Askonas,BA; Moss,B; Tomigiani,G; Gorini (eds). **The immune response to viruses**. Adv Exp Med Biol. 257: 1-295. 1989
7. Barnes, P.D., and Grundy, J, E, Grundy., 1992: **Down-regulation of the class I HLA heterodimer and β 2 - microglobulin on the surface of cells infected with cytomegalovirus**. J Gen Virol, 73: 2395-2403.
8. Beck,S y Barrell,B.1988. **Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class I antigens**. Nature. 331:269-272.
9. Beersma M.F.C., Van Dillen W.P., Geelen,J.L and Felkamp T.E., 1991. **Expression of HLA class I heavy chains and β 2- microglobulin does not affect human cytomegalovirus infectivity**. J Gen Virol, 72:2757-2764
10. Beersma M.F.C., Bijlmakers M.J and Ploegh H.L., 1993. **Human cytomegalovirus down-regulates HLA class I expression by reducing the stability of class I H chains**. J Immunol., 151: 4455-4464
11. Bell,GI.1984. **Cell adhesion.Competition between nonspecific repulsion and specific bonding**. Byophy J. 45:1051-1064
12. Berke,G. 1989. **Functions and mechanisms of lysis induced by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells**. En: Fundamental Immunology. Second edition. Paul, WE.Ed. New York, USA. pg 735-764.
13. Boldogh I., AbuBakar S., Deng CZ., Albretch T. 1991., **Transcriptional activation of cellular oncogens fos, myc and jun by human cytomegalovirus**. J Virol., 65: 1568-1571.
14. Boldogh I., Baskar JF., Mar EC, Huang ES 1983. **Human cytomegalovirus and herpes simplex Type 2 in normal and adenocarcinomatous prostate glands**. Journal of the National Cancer Institute, 70:192-211.

15. Boldogh I., Beth E., Huang ES., Kyalwazi K., Giraldo G 1981. *Kaposi's sarcoma. IV Detection of CMV DNA, CMV RNA and CMNA in tumor biopsies.* Int J Cancer, 28: 469-474.
16. Borysiewicz L.K., Rodgers, B., Graham, S. and Sissons J.G.P., 1985. *Lysis of human cytomegalovirus infected fibroblasts by natural killer cells: demonstration of an Interferon-independent component requiring expression of early virus proteins and characterization of effector cells.* J Immunol. 134: 2695-2701.
17. Browne H., Smith G., Beck S., Minson T. 1990: *A complex between the MHC class I homologue encoded by human Cytomegalovirus and $\beta 2$ microglobulin*, Nature, 347: 770-772.
18. Browne H., Churcher M., and Minson, T. 1992. *Construction and characterization of a Human Cytomegalovirus mutant with the UL18 (Class I homologue) gene deleted* J Virol, 66: 6784-6787.
19. Bruggeman C.A. 1993. *Cytomegalovirus and latency: an overview.* Virchows Archiv B Cell Pathol. 64: 325-333.
20. Burgert H. and Kvist. 1985. *An Adenovirus type 12 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens.* Cell, 41:987
21. Campbell A., Slater J., Cavanaugh V., Stenberg R. 1992. *An early event in murine cytomegalovirus replication inhibits presentation of cellular antigens to cytotoxic T lymphocytes.* J Virol. 66: 3011-3017
22. Clark E.A and Ledbetter J.A. 1994. *How B and T cells talk to each other.* Nature, 367:425-428
23. Compton T. 1993. *An immortalized human fibroblast cell line is permissive for Human Cytomegalovirus Infection.* J Virol, 67: 3644-3648
24. Chee M. S., Bankier, A.T., Beck S., Bohni R., Brown, C.M et al. 1990. *Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus AD169.* Curr Top. Microb Immunol, 154:125
25. Chee M.S, Satchwell, S.C., Preddie, E., Weston, K.M and Barrel, B.G. 1990, *Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues.*, Nature, 344:774-777
26. Chesnut, R.W. et al. 1982. *Requirements for the processing of antigens by antigen-presenting B cells. Functional comparison of B cell tumor and macrophages.* J Immunol. 129:2383-2388.
27. Degen, E., and Williams D.B., 1991. *Participation of a novel 88-kDa protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules.* J Cell Biol. 112:1099
28. Del Val M., Schlicht H.J., Ruppert T., Reddehase, M.J, and Koszinowski V.H., 1991. *Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein.* Cell, 66:1145.

29. Del Val, M., Hengel, H., Hacker, H., Hartlaub, U., Ruppert, T., Lucin, P., and Koszinowski, U.H. 1992. *Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the Media-Golgi compartment.*, J Exp Med. 176:729-738
30. Del Val, M., Munch, K., Reddehase, M.J., Koszinowski, V.H. 1989. *Presentation of CMV-immediate early antigen to cytolytic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase.*, Cell, 58:305-315
31. DeMarchi J.M., Blankenship M.L., Brown G.L and Kaplan A.S., 1978. *Size and complexity of human cytomegalovirus DNA.* Virology, 89:643-646.
32. Doherty, P.C; Allan, W; Eichelberger, M; Carding, S.R. 1992. *The roles of ab and td T cell subsets in viral immunity.* Ann Rev Immunol. 10:123-151
33. Engelhard, V.H., 1994. *How cells process antigens.* Sci Ame. 271: 44-51
34. Fertuga, J. et al. 1974. *Observations on the mechanisms by which T lymphocytes exert cytotoxic effects.* Nature 250: 673-675
35. Fields B.N., Knipe D.M., *VIROLOGY*. Raven Press Ltd, 2nd ed. New York, 1990
36. Frey, J., And Esenfelder. 1984. *Induction of surface IgG receptors in Cytomegalovirus-infected human fibroblasts.* Eur J Biochem, 138:213-216
37. Fruh, K, Ahn K, Djaballah H, Sempe P, van Edernt P.M., et al. 1995. *A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation.* Nature 375: 415-418.
38. Fujinami R.S., Nelson J.A., Walker L and Oldstone M.B.A. 1988. *Sequence homology and immunologic cross-reactivity of human cytomegalovirus with HLA-DR β chain: a means for graft rejection and immunosuppression.* J Virol, 62: 100-105
39. Gabathuler, R, et al, 1990. J Virol. 64:3679
40. Gao J.L. and Murphy P.M., 1994, *Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional β chemokine receptor.*, J Biol Chem, 269: 28539-28542
41. Geder L., Lausc R., 1976. *Oncogenic transformation of human embryo lung cells by human cytomegalovirus.*, Science, 192: 1134-1137.
42. Gilbert M.J and Greenberg P.D., 1993. *Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus.*, J Virol, 67: 3461-3469
43. Goldstein, P. 1987. *Cytolytic T cell melodrama.* Nature 327:12
44. Golstein, P. et al. 1971. *Cell mediating specific in vitro cytotoxicity. I. Detection of receptor-bearing lymphocytes.* J Exp Med. 134:1385-1402
45. Gooding, L.R. 1992. *Virus proteins that counteract host immune defenses.*, Cell, 71:5-7

46. Greswell, P., Springer, T., Strominger, J.L., Turner, M.J., Grey, H.M. and Hubo, R.T., 1974. *Immunological identity of the small subunit of HLA-I antigens and β 2-microglobulin and its turnover on the cell membrane*. Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A. 71:2123-2127
47. Griffiths, P.D. 1989. *Cytomegalovirus, infection and immunity*. En. Fundamental Immunology. Second Edition. Paul, W.E. ed. New York, USA pg. 445-557.
48. Groscurth, P. 1987. *Cellular localization of perforin 1 in murine cloned cytotoxic lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes*. J Immunol. 138:2749-2752
49. Grundy J.E. 1990. *Virologic and pathogenetic aspects of cytomegalovirus infection*. Reviews of infectious diseases., 12 [Supl 7]: S711--S719
50. Grundy J.E., McKeating, J.A., Ward p.J., Sanderson A.R and Griffiths P.D., 1987. *β 2 microglobulin enhances the infectivity of cytomegalovirus and when bound to the virus enables class I HLA molecules to be used as a virus receptor*. J Gen Virol. 63:793-803
51. Grundy J.E., Ayles H.M., McKeating J.A., Buther R.G., Griffiths P.D, and Poulter L.W., *Enhancement of class I HLA antigen expression by cytomegalovirus: role in amplification of virus infection.*, 1988. J Med Virol, 25: 483-495
52. Grundy, J.F. and Downes, K.L. 1993. *Up-regulation of LFA-3 and ICAM-1 on the surface of fibroblasts infected with cytomegalovirus.*, Immunol, 78: 405-412.
53. Grundy, J.E and Pahal, G.S. 1993. *"Increased adherence of CD2 peripheral blood lymphocytes to cytomegalovirus-infected fibroblasts is blocked by anti-LFA-3 antibody"*. Immunol, 78: 413-420.
54. Grundy, J.E McKeating, J.A., and Griffiths P.D., 1987. *Cytomegalovirus Strain AD-169 binds β 2 microglobulin in vitro after release from cells*. J Gen Virol. 68:777-784
55. Grusby, M.J. et al. 1990. *Cloning of an Interleukin-4 Inducible gene from cytotoxic T lymphocyte and its identification as a lipase*. Cell 60:451-459
56. Hill, A., Jugovic, P., York I., Russ G., Berrink J., Yewdell J., et al., 1995. *Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity.*, Nature 375:411-415.
57. Ho, M. *Cytomegalovirus: Biology and Infection*. Second edition, 1991, N.Y. Plenum Medical Book Co.
58. Huang, Es., Boldogh, I., Baskar, J.F., Mar EC., 1984: *The molecular biology of HCMV and its relation ship to various human cancers*. In Giraldo G, Belli E (eds): "Role of Viruses in Human Cancer". New York: Elsevier, pp 169-198.
59. Humbert, M., D'Emilie, J., Cerina, G., Simonneau, B., Rain, F., Leroy-Adurie, S., Fattal, P., Dartevielle, P., Duroux, P., and P. Galanaud. 1991. *Soluble Interleukin-2 receptor and neopterin serum levels after lung/heart-lung transplantations: absence of predictive value for late allograft rejection*. Transplantation, 146: 1092-1094
60. Humbert, M., R.M. Delattre, S. Fattal, J. Cerina, G. Simonneau, B. Rain, P. Dartevielle, P. Duroux, P. Galanaud and D. Emilie. 1993. *In situ production of Interleukin-6 within*

- human lung allografts displaying rejection and cytomegalovirus pneumonitis*, Transplantation 56:623-627
61. Kapasi, K. and Rice G.P.A. 1988. *Cytomegalovirus Infection of peripheral blood mononuclear cells: effects on interleukin-1 and -2 production and responsiveness*. J Virol, 62:3603-3607
 62. Kari B., Radeke R and Gehrz R., 1992., *Processing of human cytomegalovirus envelope glycoproteins in and egress of cytomegalovirus from human astrocytoma cells*. J Gen Virol, 73: 253-260
 63. Kim, S.J., J. H. Kehrl, j.Burton, C.L.Tendler,K.T. Jeang, D.Danielpour, C. Thevenin, K.Y.Kim, M.S. Spom and A.B. Roberts. 1990. *Transplantation of the transforming growth factor β 1 (TGF β 1) gene by human T lymphotropic virus type 1:a potential mechanism of the increased production of TGF β 1 in adult T cell leukemia*. J Exp Med. 172:121-129
 64. Kralli,A. et al. 1992. *Negative regulation of the Major histocompatibility complex class I enhancer in Adenovirus type 12-transformed cells via a Retinoic Acid responses element*. J Virol, 66:6979-6988.
 65. Lane,D.P. 1992 . *p53, guardian of the genome*, Nature,358:15-16
 66. Lanzavecchia,A., 1985. *Antigen-specific Interaction between B and T cells*. Nature, 314:537-539
 67. Lanzavecchia, A., 1988. *T cells can present antigens such as HIV gp120 targeted to their own surface molecules*. Nature 334:530-532.
 68. Levine, A.J., Momand, J and Finlay,C.A., 1991.*The p53 tumor supressor gene*., Nature, 351: 453-456
 69. Lindsley, M.D., Torpey, D.J. and Rinaldo,C.R.J. 1986. *HLA-DR- restricted cytotoxic of cytomegalovirus-infected monocytes mediated by Leu-3-positive T cells*. J Immunol. 136: 3045
 70. Macher, A.M., Reichert C.M., Strauss S.E., Longo D.L., Pamillo J., et.al. 1983. *Death in the AIDS patients: role of cytomegalovirus*. N Engl J Med, 309:1454
 71. Macnab, J, C,M 1987. *Herpes simplex virus and Human Cytomegalovirus: their role in morphological transformation and genital cancers*. J Gen Virol., 68: 2525-2550.
 72. Mathews C.K and van Holde K.E. *BIOCHEMISTRY*, 1990, The Benjamin/Cummings Publishing Co, Inc.
 73. Maudsley,D.J and Pound J.D. 1991. *Modulation of MHC antigen expression by viruses and oncogens*.,Immunol Today, 12: 429-431
 74. McDougall J.K., 1991. En: *Cytomegalovirus, Biology and Infection*. New York, Plenum Medical Books Co.
 75. McDonough S.H and Spector D.H. 1983. *Transcription in human fibroblasts permissively infected by human cytomegalovirus strain AD 169*., Virology, 125:31-46

76. McKeating, J.A., Griffiths P.D and Grundy J.E., 1987. *Cytomegalovirus in urine specimens has host β 2 microglobulin bound to the viral envelope: a mechanism of evading the host immune response?* J Gen Virol. 68:785-792
77. McKeating, J.A., Stagno, S., Stirk, P.R and Griffiths, P.D. 1985. *Detection of cytomegalovirus in urine samples by enzyme-linked immunosorbent assay.* J Med Virol, 16:367-373
78. Michelson, S., J.Alcami, S.J.Kim, D.Danielpour, F.Bachelerie, L.Picard, C.Bessia, C.Paya, and J.L.Virelizier. 1994. *Human cytomegalovirus infection induces transcription and secretion of transforming growth factor β 1.* J Virol. 68: 5730-5737.
79. Mims, CA; White, DO; Borysiewicz, LK. **VIRAL PATHOGENESIS AND IMMUNOLOGY**. 2nd edn. Oxford: Blackwell scientific Publications. 1991
80. Mitchison, NA. 1989. *Is genes in the mouse.* En: Progress in Immunology VII. Proceedings of the 7th International Congress of Immunology. Melchers, F. et al Eds. Springer-Verlag, RFA. pg. 845-852.
81. Monaco J.J. 1992., *A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing.*, Immunol Today, 13: 173-178
82. Mosmann, TR. et al. 1986. *Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokines activities and secreted proteins.* J Immunol. 136: 2348-2357
83. Muganda, P., Mendoza, O., Hernandez, J and Quian, Q. 1994. *Human cytomegalovirus elevates levels of the cellular protein p53 in infected fibroblasts.*, J Virol, 68:8028-8034.
84. Mueller, N., Hinkula J., Wharen B., 1988. *Elevated antibody titres against cytomegalovirus among patients with testicular cancer.* Int J Cancer, 41: 399-403.
85. Navarro D., Paz P., Tugizov S., Topp K., La Vail J and Pereira L., 1993., *Glycoprotein B of Human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells.*, Virology, 197: 143-158.
86. Neefjes J.J and Ploegh H.L., 1992. *Intracellular transport of MHC class II molecules.*, Immunol Today, 13: 179-183
87. Neote, K., DiGregorio, D., Mak, J., Horuk, R. y Schall, T. 1993. *Molecular cloning, functional expression and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor.* Cell 72: 415-425
88. Nowak, M.A and McMichel, A.J. 1995., *How HIV defeats the immune system.*, Sci Am 273: 42-49
89. Nowlin, D.M., et al. 1991., *Expression of a Human Cytomegalovirus receptor correlates with infectibility of cells.*, J Virol, 65: 3114-3121
90. Numazaki, K., H.Goldman, I.Wong, X.Q.Bal and M.A. Wainberg. 1989. *Effects of infection by HIV-1, cytomegalovirus and human measles virus on cultured thymic epithelial cells.* Microbiol Immunol. 33:733-745

91. Oldstone M.B.A. 1989. *Viral Persistence.*, Cell, 58:517-520
92. Oldstone M.B.A. 1991. *Molecular anatomy of viral persistence.*, J Virol, 65: 6381-6386
93. Pasternack, M.S. 1986. *Serine esterase in cytolytic T lymphocytes.* Nature, 322: 740-743.
94. Peters, P.J. 1980. *A new model for lethal hit delivery by cytotoxic T lymphocytes.* Immunol Today 11:28-32
95. Quinnan, G., Kirmani N., Esker E., Saral R., Manischewitz J.F., Rogers L., et al., 1981. *HLA-restricted cytotoxic T lymphocyte and nonthymic cytotoxic lymphocyte responses to cytomegalovirus infection of bone marrow transplant recipients.* J Immunol. 126: 2036.
96. Quinan, G., Kirmani N., Rook A.H., Manischewitz J.F., Rogers L., et al., 1982. *Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T lymphocyte and non-T lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus in bone marrow transplant recipients.* N Engl J Med. 307:6
97. Ridell S.R., Rabin M., Geballe A.P., Britt W.J and Greenberg P.D., 1991, *Class I MCH-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression.*, J Immunol, 146: 2795-2804.
98. Rinaldo, C.R Jr., Black P.H and Hirsch M.S., 1977. *Interaction of cytomegalovirus with leukocytes from patients with mononucleosis due to cytomegalovirus.*, J Infect Dis. 136:667-678
99. Rinaldo, C.R.Jr., Carney W.P., Richter B.S., Black P.H and Hirsch M.S., 1980. *Mechanisms of immunosuppression in cytomegaloviral mononucleosis.*, J Infect Dis, 141 488-495
100. Roche I., Cheing K.S., Boldogh I., Huang E.S., Lang DJ., 1981. *Cytomegalovirus: detection in human colon and circulating mononuclear cells and presence in gastrointestinal diseases.* Int J Cancer, 27: 695-667.
101. Rodgers, B.C., Scott, D.M., Muddin, J., and Sissons, P.J.G. 1985, *Monocyte-derived inhibitor of interleukin-1 induced by human cytomegalovirus.* J Virol, 55:527-532
102. Rose J.S.L and Grundy J.E., 1992. *β 2 microglobulin on the envelope of urinary cytomegalovirus is not associated with host class I human leukocyte antigen α chain.*, J Gen Virol, 73:507-512
103. Rotzschke, O., Falk k., Denes K., Schild H., Norda M., et al. 1990. *Isolation and analysis of naturally processed peptides as recognized by cytotoxic T cells.* Nature (London) 348:252
104. Ruder, R., Bomkamm G.W and Fleckenstein B., 1984. *Human cytomegalovirus DNA sequences with homologies to the cellular genome.*, J Gen Virol. 65: 1351-1364
105. Schaechler., Medoff., Einsenstein y Guerra, 1994. *Microbiología, Mecanismos de las enfermedades infecciosas*; Ed Medico Panamericana, 2da Ed. Cap 41:538

106. Scheppler, J., Nicholson, J.K.a., Swan, D.C. Ahemd-Ansari, A., and McDougal, J.S. 1989., *Down-regulation of MHC-I in a CD4+ T cell line, CEM-E5, after HIV-1 infection.* J Immunol. 143:2358
107. Schier, P.L., Bemards R., Vaessen R.T., Honweling A. and van der Eb Aj., 1983. *Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells.* Nature. 305:771-775
108. Schier, R.D., Rice, G.P. y Oldstone, M.B.A., 1986. *Supression of natural killer cell activity and T cell proliferation by fresh Isolates of Human cytomegalovirus .* J Infect Dis. 153:1084-1091.
109. Schwartz, R.H. 1987. *Immune response (I_r) genes of the murine major histocompatibility complex.* Adv Immunol. 38:31-199.
110. Sedmak, D.D., Roberts, W.H., Stephens, R.E., Buesching, W.J et al., 1990. *Inability of cytomegalovirus infection of cultured endothelial cells to induce HLA class II antigen expression.,* Transplantation, 49:458-462 .
111. Sedmak, D.D., Guglielmo A.M, Knight D.A, Birmingham, D.J, Huang, E.H, and Waldman W.J. 1994. *Cytomegalovirus inhibits major histocompatibility class II expression on infected endothelial cells.,* Am J Pathology. 144:683
112. Shaw, S.B., Rasmussen R.D., McDonough S.H., Staprans S.I., Vacquier P., et al., 1985. *Cell-related sequences in the DNA genome of Human Cytomegalovirus strain AD169.,* J Virol. 55: 843-848.
113. Shimizu, A. et al. *Structure and function of lymphokines and their receptors.* En: Progress in Immunology. Melchers, F. et al Eds. Springer-Verlag, RFA. pg 601-610.
114. Sissons, J.G.P., Borysiewicz, L.K., Rodgers, B. and Scott, D. 1986: *Cytomegalovirus: its cellular immunology and biology.* Immunol Today, 7:57-61.
115. Smiley M.L., Mar EC, huang ES ,1988., *Cytomegalovirus infecton and viral-induced transformation of human endothelial cells.* J Med Virol., 25:213-226.
116. Speir , E., Modali R., Huang E.S., Leon M.B., Shaw F et al., 1994. *Potential of Human Cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis.,* Science, 265:391-394
117. Spom M.B., Roberts A.B., Wakefield L.M and Crombrugge B. 1987. *Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta.,* J Cell Biol, 105: 1039-1045.
118. Springer, T.A. 1990. *Adhesion receptors of the immune system.* Nature, 346:425-434.
119. Stagno, S., Pass R.F., Dworsky M.E., Henderson R.E et al., 1982. *Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection.* N Engl J Med. 306:945
120. Stannard, L.M. 1989. *β2 microglobulin binds to the tegument of cytomegalovirus: an immunogold study.* J Gen Virol. 70:2179-2184.

- 121 Stannard, L.M. and Hardie, D.R. 1991 *An Fc receptor for Human cytomegalovirus for human immunoglobulin G is located within the tegument of Human cytomegalovirus*, J Virol. 65: 3411-3415.
- 122 Taylor, H.P., Cooper, N.R. 1990: *The Human Cytomegalovirus receptor on fibroblast is a 30-Kilodalton membrane protein*, J Virol. 64: 2484-2490.
- 123 Tilg, H., W. Vogel, W.B. Aulitzky, M. Herold, A. Konigsrainer, R. Margreiter, and C. Huber. 1990 *Evaluation of cytokines and cytokine-induced secondary messages in sera of patients after liver transplantation*. Transplantation 49: 1074-1080
- 124 Tizard, Ian R. *Inflammation*. En: Tizard, I. (ed) Immunology, 1995 pag 436-438
- 125 Townsend, A., and Bodmer H., 1989. *Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes*. Annu Rev Immunol. 7:601
- 126 Trenn, G. et al 1987. *Antigen-receptor regulated exocytosis of cytotoxic granules may not be required for target cell lysis by cytotoxic T lymphocytes*. Nature 330:72-74
- 127 Vodinelich, L., Sutherland, R., Schreider, C., et al. 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:835-839
- 128 van Dorp, W.T., Jonges, E., Bruggeman, C.A., Daha, M.R., et al., 1989., *Direct induction of MHC class I, but not class II, expression on endothelial cells by cytomegalovirus infection*, Transplantation 48: 469-472
129. von Willebrand, Pettersson, E., Ahonen, J and Hayry, P., 1986., *CMV infection, class II antigen expression, and Human kidney allograft rejection*, Transplantation, 42:364-367
130. Wahren B., Ljungman P., Paulin T and Ringden O., 1986. *Enhancive and suppressive effects of cytomegalovirus on human lymphocyte responses in vitro*, J Virol. 58: 909-913.
131. Waldman W.J., Knight, D.A., Adams, P.W., Orosz, C.G., and Sedmak, D.D., 1993. *In vitro induction of endothelial HLA class II antigen expression by cytomegalovirus-activated CD4+ cells*, Transplantation, 56: 1504-1512
132. Warren A.P., Ducrocq, D.H., Lehner, P.J and Borysiewicz, L.K., 1994, *Human Cytomegalovirus-infected cells have unstable assembly of major histocompatibility complex class I complexes and are resistant to lysis by cytotoxic T lymphocytes*, J Virol. 68: 2822-2829.
- 133 Weiss, A. 1989. *T Lymphocyte activation*. En: Fundamental Immunology, Second Edition. Paul, W.E. ed. New York, USA pg. 359-384
134. Welch A.R., McGregor L.M and Gibson W., 1991. *Cytomegalovirus homologs of cellular G protein-coupled receptor genes are transcribed*, J Virol. 65: 3915-3918
135. Wertheim, P.M.E., Voute, P.A., 1976., *Neuroblastoma, Wilm's tumor and cytomegalovirus*. Journal of the National Cancer Institute, 57: 701-703.

136. White J.M and Littman D.R. 1989. *Viral receptors of the immunoglobuline superfamily.*, Cell, 56: 725-728
137. White J.M.. 1990. *Viral and cellular membrane fusion proteins.*, Annu Rev Physiol. 52: 675-697
138. William P.E 1993. *Infectious Diseases and the Immune System.*, Sci Ame, 269:42-49
139. Wykes M.N., Shellam G.R., McCluskey J., Kast W.M., Dallas P.B and Price P., 1993. *Murine cytomegalovirus interacts with major histocompatibility complex class I molecules to establish cellular infection.*, J Virol. 67: 4182-4189
140. Xu-Bin., Murayama T., Ishida K and Furukawa T., 1989. *Characterization of IgG receptors induced by Human cytomegalovirus*, J Gen Virol, 70:893-900
141. Yamashita.Y., Shimokata.K., Mizuno.S., Yamaguchi,H and Nishiyama.Y. 1993. *Down-regulation of the surface expression of class I MHC antigens by human cytomegalovirus*, Virology, 193: 727-736.
142. Yamashita.Y., Shimokata.K., Saga,S., Mizuno.S., Tsurumi, T., and Nishiyama.Y.1994. *Rapid degradation of the heavy chain of class I major histocompatibility complex antigens in the endoplasmic reticulum of human cytomegalovirus-infected cells*, J. Virol, 68:7933-7943
143. Zagury, D. et al. 1975. *Isolation and characterization of individual functionally reactive cytotoxic T lymphocytes. Conjugation, killing and recycling at the single cell level.* Eur J Immunol. 5:818-822
144. Ziegler.EK., Unanue,ER.1982. *Decrease in macrophage antigen catabolism caused by amonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presetaion to T cells.* Proc Natl Acad Sci. 79:175

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos mis amigos, Carlos, Chai, David, Eduardo, Katia, Katina, Goros, Pablo, Sandra, con los que viví tantas cosas y son un soporte en mi vida.

Gracias en especial a Ana K, Ceci, Gaby, Kutzi, Rocío, por su gran apoyo, ayuda y consejos durante toda la carrera.

A mis estimados maestros y compañeros.

Gracias Alejandro y Paco, por la ayuda en la edición e impresión de los dibujos.