



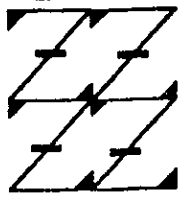
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

MODULACION DE LA EXPRESION DE LAS MOLECULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN MACROFAGOS INFECTADOS POR CITOMEGALOVIRUS HUMANO (HCMV)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARTHA MIREYA CABRIALES MACIAS

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.



284479



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.

CONTENIDO

ABREVIATURAS.	3
ÍNDICE DE FIGURAS.	4
I. INTRODUCCIÓN.	5
II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.	6
A. El citomegalovirus humano.	6
A.1. Estructura del virión.	6
A.2. Ciclo infectivo.	7
A.3. Patogénesis.	8
A.4. Epidemiología.	9
B. El sistema inmune.	9
B.1. Respuesta inmune natural.	10
B.2. Respuesta inmune adquirida.	11
B.3. Procesamiento y presentación de antígeno.	12
B.3.1. Vía endógena.	12
B.3.2. Vía exógena.	12
B.4. Macrófagos como células presentadoras de antígeno.	12
C. Respuesta inmune hacia HCMV.	14
D. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por HCMV.	15
D.1. Ocultación viral.	15
D.1.1. Variación antigénica.	15
D.1.2. Infección en continuidad.	15
D.1.3. Enmascaramiento.	15
D.1.4. Latencia.	15
D.2. Inmunosupresión	16
D.2.1. Supresión de la hematopoyesis.	16
D.2.2. Inducción de TGF- β .	16
D.2.3. Alteración de la respuesta y producción de citocinas.	16
D.2.4. Proteínas virales homólogas a receptores asociados a proteína G.	16
D.2.5. Inducción de apoptosis de células linfoides.	17
D.3. Bloqueo de los mecanismos efectores de la respuesta inmune.	17
D.3.1. Bloqueo de la activación de células NK.	17
D.3.2. Bloqueo de la actividad de complemento.	17
D.3.3. Disminución de la expresión de moléculas del MHC-I.	17
D.3.4. Modulación de la expresión de moléculas del MHC-II.	18
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	20
IV. OBJETIVOS.	21
V. HIPÓTESIS.	22

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.	23
A. Material biológico.	23
A.1. Hibridomas.	23
A.2. Líneas celulares.	23
A.3. Virus.	23
B. Equipo.	23
C. Métodos.	24
C.1. Cultivo de líneas celulares.	24
C.2. Producción y purificación de anticuerpos monoclonales.	24
C.3. Determinación del título viral.	25
C.4. Diferenciación celular.	25
C.4.1. Adherencia.	26
C.4.2. Expresión de receptores FcR.	26
C.4.3. Expresión de molécula de superficie CD14.	26
C.4.4. Expresión de moléculas del MHC de clase II.	26
C.4.5. Actividad de esterasa no específica.	26
C.4.6. Fagocitosis.	27
C.5. Infección viral.	27
C.6. Cinéticas de infección.	27
C.7. Inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo.	27
VII. RESULTADOS.	29
A. Producción y purificación de anticuerpos monoclonales.	29
B. El PMA induce diferenciación a macrófagos en células U-937.	30
B.1 Cambios morfológicos en células U-937 estimuladas con PMA.	30
B.2 Cambios fenotípicos en células U-937 estimuladas con PMA.	30
B.3 Cambios funcionales en células U-937 estimuladas con PMA.	33
C. Células U-937 diferenciadas a macrófagos son permisivas a la infección por HCMV.	34
D. Disminución de la expresión de moléculas del MHC-I en la superficie de macrófagos infectados por HCMV.	35
E. Disminución de la expresión de moléculas del MHC-II en la superficie de macrófagos infectados por HCMV.	36
VIII. DISCUSIÓN.	39
IX. CONCLUSIONES.	44
X. PROPUESTAS.	45
XI. ANEXOS.	46
XII. REFERENCIAS.	49

ABREVIATURAS.

CPA	Célula profesional presentadora de antígeno
CLIP	Péptido derivado de la cadena invariable.
CTLs	Linfocitos T citotóxicos CD8 ⁺ .
E	Gen temprano del HCMV.
FACS	Clasificador de células activadas por fluorescencia. Del inglés: Fluorescence activated cell sorter.
gB	Glicoproteína B de la envoltura del citomegalovirus humano (gp UL55).
gCII	Complejo glicoproteico II de la envoltura del citomegalovirus humano.
gH	Glicoproteína H de la envoltura del citomegalovirus humano (gp UL75).
HCMV	Citomegalovirus humano.
HSPGs	Proteoglicanos heparánulfatos.
IE	Gen inmediato temprano del HCMV.
IFN	Interferón.
L	Gen tardío del HCMV.
L-14	Hibridoma productor de mAb anti-proteína inmediata temprana principal (IE-1) del HCMV.
mAb	Anticuerpo monoclonal.
Mφ	Macrófago.
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad.
MHC-I	Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I.
MHC-II	Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II.
MOI	Multiplicidad de infección. Del inglés: Multiplicity of infection.
MRC-5	Línea celular de fibroblastos de pulmón fetal humano.
NK	Linfocitos NK. Del inglés: Natural killer.
ORF	Marco de lectura abierto.
PMA	13-acetato del forbol 12-miristato. 4β, 9α, 12β, 13α, 20-hidroxitiglia-1,6-dien-3-ona 12β-miristato.
RE	Reticulo endoplásmico.
TAP	Transportador asociado al procesamiento del antígeno.
TCR	Receptor específico de células T.
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta.
Th	Linfocitos T cooperadores CD4 ⁺ .
TNF	Factor de necrosis tumoral.

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura

1. Estructura del citomegalovirus humano.	6
2. Ciclo infectivo del virus.	8
3. El sistema inmune.	11
4. Vías de presentación de antígeno.	13
5. Interferencia con la biosíntesis de moléculas del MHC de clase I.	18
6. Lecturas de asorbancia de las fracciones de los mAbs W 6/32 y L-14.	29
7. Efecto del PMA 160 nM sobre la diferenciación morfológica de células U-937.	31
8. Efecto del PMA sobre la expresión del receptor Fc en células U-937.	31
9. Regulación de la expresión de CD14 sobre células U-937 por PMA 160nM.	32
10. Expresión del MHC-II sobre la superficie de células U-937.	32
11. Actividad de esterasa inespecífica.	33
12. Influencia del PMA sobre la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT).	34
13. Expresión de las proteínas IE y gB del HCMV en monocitos infectados.	35
14. Expresión de las proteínas IE y gB del HCMV en monocitos U-937 . estimulados con PMA 160 nM.	36
15. Disminución de la expresión de MHC-I en macrófagos humanos infectados con HCMV.	37
16. Disminución de la expresión de MHC-II en macrófagos humanos infectados con HCMV.	38

I. INTRODUCCIÓN.

La respuesta inmune celular es fundamental en la recuperación de la infección primaria y la protección contra infecciones recurrentes por virus. De allí que la supresión de la respuesta inmune por células T, exacerba las infecciones virales conduciendo a un incremento en la patogénesis. Ciertos virus; como los herpes virus, son capaces de causar disfunción de la respuesta inmune del huésped. Particularmente, el citomegalovirus humano (HCMV) ha desarrollado estrategias de evasión de la respuesta inmune que incluyen: a) ocultación viral, b) inmunosupresión y c) bloqueo de los mecanismos efectores de la respuesta inmune. Además, establece infecciones latentes y/o persistentes aún en individuos inmunocompetentes. Posiblemente, el mecanismo más importante de evasión de la respuesta inmune es el de la disregulación de la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), debido a que una disminución de la expresión puede incrementar la persistencia de la infección por HCMV.

Algunos estudios han demostrado que el HCMV produce un fenómeno de disminución de la expresión de las moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) sobre la superficie de fibroblastos infectados. Sin embargo, la activación de linfocitos T CD4⁺ requiere el reconocimiento de antígenos virales enlazados a moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) sobre la superficie de células profesionales presentadoras de antígeno (CPA), por ejemplo, monocitos, macrófagos (mφ's) y células dendríticas. Dado que para estudiar la expresión de moléculas del MHC-II durante una infección por HCMV es necesario utilizar CPA, en este estudio empleamos la línea celular U-937, con características monocíticas y que además es susceptible de sufrir diferenciación a macrófagos.

Los resultados muestran que el HCMV induce una importante reducción de la expresión de las moléculas de clase II sobre la superficie de los mφ's infectados, siendo ésta de aproximadamente 72%.

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.

A. EL CITOMEGALOVIRUS HUMANO.

El citomegalovirus humano es un patógeno con distribución mundial. La infección primaria en un individuo inmunocompetente generalmente es asintomática y se resuelve rápidamente. Sin embargo, el HCMV ha desarrollado mecanismos que le permiten evadir el sistema inmune del huésped, propiciando el establecimiento de infecciones latentes y/o persistentes.

En individuos inmunosuprimidos tales como: a) los neonatos, b) los pacientes que reciben trasplante de órganos (riñón, hígado, corazón y médula ósea), c) los pacientes con neoplasias y d) los pacientes con SIDA; la infección primaria, reinfección o reactivación de la infección latente es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad¹.

A.1. Estructura del virión.

El virión del HCMV tiene las características estructurales típicas de la familia *Herpesviridae*. El genoma de DNA de doble cadena de 230 kilopares de bases está contenido en una cápside icosaédrica de 116 nm de diámetro^{2,3}. Rodeando la cápside se encuentra la matriz o tegumento. Ambos componentes están circundados por una envoltura compuesta de lípidos provenientes de la célula huésped y proteínas de origen viral. El diámetro de los viriones maduros es de 150-230 nm³. El genoma del HCMV está caracterizado totalmente, contiene 208 marcos de lectura abiertos (ORFs). No obstante, tan sólo un centenar de sus productos están identificados (fig. 1)⁴.



Figura 1. Estructura del citomegalovirus humano.

A.2. Ciclo infeccioso.

Los viriones penetran a las células a través de dos vías: a) En células fagocíticas las partículas virales se fusionan con la membrana vacuolar de los fagosomas⁵ y b) Por fusión entre el virión y la membrana citoplasmática la cual se divide en pasos secuenciales:

a) El proceso de adherencia inicia con una interacción de "baja afinidad" entre los proteoglicanos heparán sulfatos (HSPGs) sobre la superficie celular y las glicoproteínas B (gB) y gCII de la envoltura del virus^{6,7};

b) Interacción de "alta afinidad", en donde gB también se une a la proteína celular anexina II, aunque se desconoce la función precisa de esta última⁸. En monocitos se ha demostrado participación de la molécula CD13⁹;

c) Otra molécula de la envoltura del virión involucrada en la penetración es la glicoproteína H (gH), la cual posiblemente tiene como receptor una proteína de 92.5 kDa¹⁰. La entrada del virus es un evento independiente del pH y requiere la participación de gB^{11,12}.

d) Posterior a la entrada a la célula, las nucleocápsides migran al núcleo; sitio en donde liberan su contenido de DNA para iniciar el ciclo replicativo.

e) Durante la replicación del virus, la expresión de los genes procede de manera definida. Los productos de los genes inmediatos tempranos (IE) funcionan como transactivadores de los genes tempranos (E), cuyos productos participan en la síntesis del DNA viral. Finalmente, se expresan los genes tardíos (L), muchos de los cuales codifican proteínas de la estructura del virión¹³.

f) Los viriones recién formados adquieren una envoltura inicial de la membrana nuclear interna, misma que pierden al fusionarse con la membrana nuclear externa, finalmente adquieren la envoltura del retículo endoplásmico (RE)¹⁴. Los viriones maduros alcanzan la superficie celular en vesículas que viajan a través del complejo de Golgi (fig. 2).

A.3. Patogénesis.

En general, en un huésped normal la infección primaria por HCMV usualmente es asintomática aunque persistente, probablemente debido a una relación balanceada entre la replicación viral y los mecanismos de vigilancia inmune del huésped. En contraste, en

sujetos inmunosuprimidos la infección primaria, reinfección o reactivación endógena puede ser severa y en algunos casos fatal.

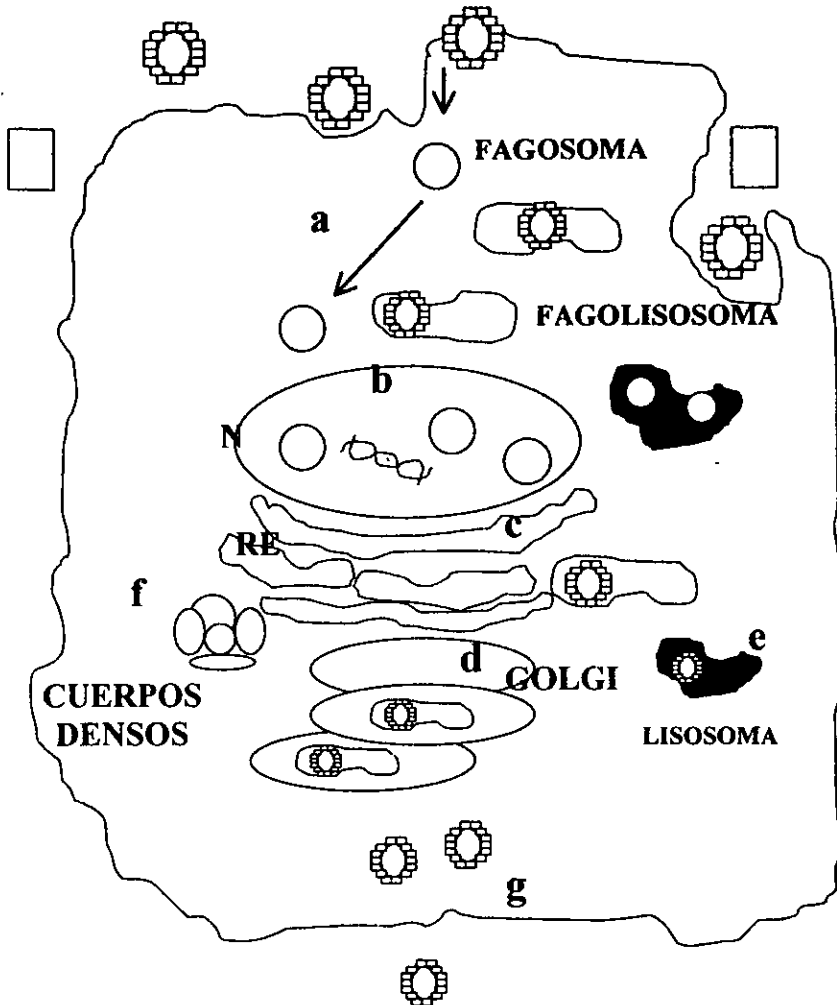


Figura 2. Ciclo infeccioso del virus. Los viriones penetran a las células a través de dos vías, por fagocitosis (1) o fusión a la membrana de las células huésped (2). En el citoplasma, las cápsidas desnudas derivadas de los viriones procedentes de cualquiera de las vías mencionadas, viajan al núcleo (a) para replicarse (b). Las partículas recién formadas adquieren su envoltura del retículo endoplásmico (c), viajan a través del aparato de Golgi (d) hacia los lisosomas (e), cuerpos densos (f) o finalmente son liberados extracelularmente.

Los mecanismos patogénicos que inducen infecciones sintomáticas por el virus incluyen:

a) Extensa replicación viral (citopatogenicidad directa), causando enfermedad principalmente en retina, tracto gastrointestinal y epitelio alveolar.

b) Citopatogenicidad indirecta, a través de citotoxicidad mediada por anticuerpos (CCDA) o células T; y en el contexto de los trasplantes alogénicos, la alteración de la expresión de moléculas MHC-II.

Finalmente, en la actualidad se cuenta con evidencias experimentales que muestran reactivación del virus en células del linaje mieloide por estimulación alogénica con células T. Posiblemente, éste sea el mecanismo principal de activación del virus en pacientes transplantados¹⁵⁻¹⁹.

A.4. Epidemiología.

La infección por HCMV es endémica. Estudios seroepidemiológicos muestran que en países desarrollados entre 40 y 80% de la población presentan anticuerpos contra el virus. En contraste, en países en vías de desarrollo aproximadamente 100% de la población es seropositiva desde los primeros años de vida²⁰. En México los informes epidemiológicos indican que la seropositividad para la IgG en la población adulta es superior a 90%²¹. La transmisión natural de la infección se produce por contacto directo o indirecto persona-persona a partir de secreciones respiratorias, orina, saliva, etc. Fuentes adicionales del virus son las transfusiones sanguíneas y trasplantes de órganos²².

B. EL SISTEMA INMUNE.

El sistema inmune, conjunto coordinado de células y moléculas capaz de sostener una incesante batalla contra los patógenos invasores, se basa en dos sistemas de reconocimiento diferentes: innato y adaptativo. El sistema innato controla el inicio de la respuesta inmune adaptativa regulando la expresión de actividad coestimuladora sobre CPA's. La función de los linfocitos T depende totalmente de las citocinas liberadas por las células del sistema de reconocimiento innato.

B.1. Respuesta inmune natural.

Se refiere a la resistencia natural frente a la infección, es independiente del patógeno, no se altera por exposiciones repetidas y no discrimina entre varios antígenos. En este tipo de inmunidad participan macrófagos, monocitos, neutrófilos eosinófilos, células NK, interferones tipo I y mediadores solubles tales como componentes de la cascada de complemento y proteínas reactantes de fase aguda. Inicialmente involucra el reconocimiento de patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs) tales como modificaciones postraduccionales presentes sobre el microorganismo por medio de receptores de reconocimiento del patrón (PRRs), algunos de los cuales favorecen la fagocitosis, opsonización, liberación de citocinas y activación del complemento²³. Cuando los macrófagos fagocitan a los patógenos, generan dos tipos de respuestas que contribuyen a eliminar la infección. Primeramente, son estimulados a producir citocinas que inducen inflamación local y otras respuestas innatas inducidas tempranamente (respuesta de fase aguda). Las principales citocinas incluyen TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8²³. IL-1 y TNF- α inducen la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales favoreciendo la migración de linfocitos al sitio de infección²⁴. Adicionalmente, otras citocinas potencian la respuesta adaptativa en estados efectores ya que la IL-6 induce la diferenciación terminal de linfocitos B en células plasmáticas productoras de anticuerpos²⁵. Los macrófagos también participan en la generación de la respuesta adaptativa ya que son unas células eficientes presentadoras de antígeno, las cuales activan a los linfocitos T cooperadores CD4⁺. Además de los macrófagos, otros tipos celulares (fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos) responden secretando quimiocinas cuya función es la de quimioatrayentes de neutrófilos y monocitos al lugar de la infección. Los virus inducen la producción de interferones de tipo I (α y β) y entre otros efectos aumentan la expresión de las moléculas del MHC-I. De este modo se incrementa la capacidad presentadora de antígenos virales por la célula infectada a los linfocitos T citotóxicos²⁶. Finalmente, la función primaria de las células NK es la eliminación de patógenos intracelulares en las fases tempranas de la infección, antes de que se establezca una respuesta inmune adaptativa. El IFN de tipo I puede aumentar la capacidad de las células NK para lisar las células infectadas (fig. 3)²⁷⁻³⁰.

La confrontación de la inmunidad innata con los patógenos conduce a su activación y prepara las armas adaptativas del sistema inmune para que respondan apropiadamente.

B.2. Respuesta inmune adquirida.

La inmunidad específica frente a virus está mediada por una combinación de elementos humorales y celulares. Los anticuerpos antivirales neutralizantes se unen a las proteínas de la envoltura o de la cápside y evitan la unión del virus a la célula huésped y por lo tanto, su entrada a la misma, así como la diseminación del virus de una célula a otra. Por otra parte, los anticuerpos opsonizantes incrementan el aclaramiento de las partículas virales por medio de los fagocitos. Aunque los anticuerpos son un componente importante de la inmunidad frente a los virus, pueden no ser suficientes para eliminar muchas infecciones, ya que los virus intracelulares son inaccesibles a los anticuerpos³¹.

Las células presentadoras de antígeno profesionales capturan a los patógenos o los productos que no pueden ser eliminados por los macrófagos. Para que se produzca la activación de los linfocitos T por la CPA se requiere una interacción entre un péptido viral unido a una molécula MHC-II sobre la CPA y el complejo TCR/CD3 de un linfocito T virgen específico para dicho MHC; además de una señal coestimuladora de la misma CPA proporcionada por la molécula CD80 a la molécula CD28 del linfocito T. Esta señalización produce la activación, proliferación y diferenciación del linfocito T con la consiguiente adquisición de su función efectora (fig. 3)^{27,31}.

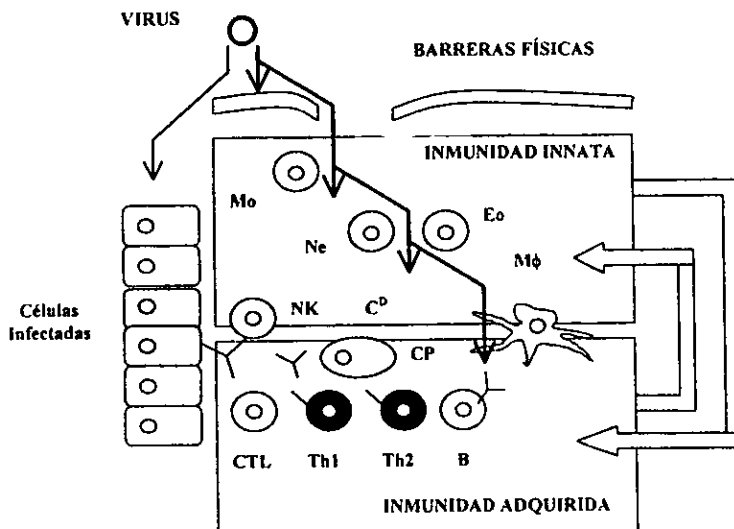


Figura 3. El sistema inmune.

B.3. Procesamiento y presentación de antígeno.

El inicio de la respuesta inmune requiere que los productos del MHC presenten fragmentos antigénicos de proteínas derivadas del patógeno. Las moléculas de clase I presentan péptidos citosólicos a receptores específicos del antígeno sobre las células T CD8⁺; mientras que los productos MHC II principalmente portan péptidos generados en la vía endocítica y los presentan a las células T CD4⁺.

B.3.1. Vía endógena. El proteasoma es un complejo multicatalítico que hidroliza a las proteínas que se sintetizan durante la expresión de genes virales. El transportador asociado con el procesamiento del antígeno (TAP) transloca a los péptidos hacia el RE; después de enlazarse a las moléculas de MHC clase I, el complejo trimérico egresa del RE y se transporta a la superficie celular en donde los péptidos se presentan a los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTLs) (fig. 3)^{32,33}.

B.3.2. Vía exógena. Las moléculas de histocompatibilidad de clase II presentan a los antígenos derivados de las proteínas internalizadas en la vía endocítica. Después del ensamblaje en RE de las moléculas MHC-II con la cadena invariante (i_i), el trímero formado viaja a través del Golgi hacia los endosomas debido a una secuencia de señalización presente en el tallo citoplásmico de i_i. La enzima cathepsina S realiza un procesamiento proteolítico de i_i en el compartimento endosomal, lo que produce un complejo denominado CLIP, el cual ocupa el sitio de unión al péptido en las moléculas de MHC de clase II recién sintetizadas, inhibiendo así, la carga prematura del antígeno. Posteriormente, la molécula HLA-DM, induce la disociación del CLIP y su intercambio por los péptidos antigénicos. Los complejos MHC-clase II-péptido son transportados a la superficie celular donde los reconocen los linfocitos T CD4⁺ (fig. 4)^{34,35}.

B.4. Macrófagos como células presentadoras de antígeno.

El término CPA se reserva para aquellas células capaces de presentar antígenos en asociación con las moléculas de clase II, de modo que los principales tipos de CPAs incluyen a: los fagocitos mononucleares, las células dendríticas, las células de Langerhans, los linfocitos B y las células endoteliales.

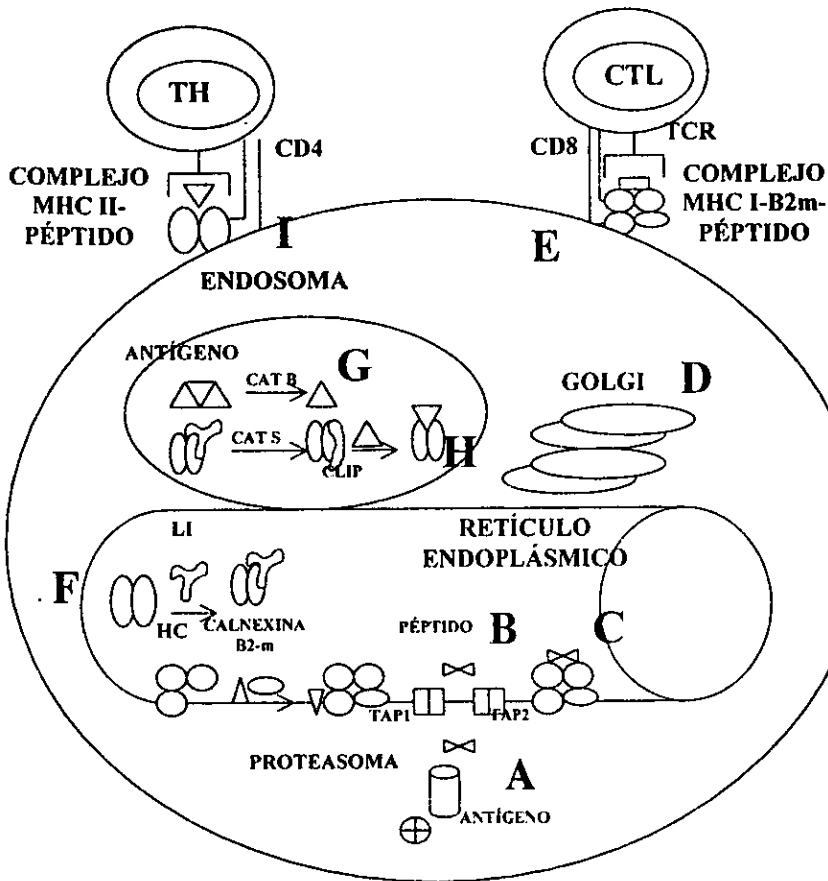


Figura 4. Vías de presentación de antígeno. Los proteasomas procesan a las proteínas virales sintetizadas endógenamente en el citoplasma (A) y los TAPs las translocan al RE (B), sitio en donde se enlazan a moléculas del MHC de clase I (C). Los complejos MHC-péptido viajan a través del Golgi (D) hacia la superficie celular en donde los reconocen las células T CD8⁺ (E). Por otra parte, las moléculas de clase II que se ensamblan con la cadena invariable li en RE (F) viajan a los endosomas; allí las catpsinas degradan a li (G) para formar el péptido CLIP, que finalmente es reemplazado por los péptidos antigénicos en un proceso catalizado por las moléculas HLA-DM (H). Los péptidos cargados por las moléculas de clase II son presentados a linfocitos T CD4⁺(I).

Los monocitos y macrófagos poseen una vigorosa capacidad fagocítica que les permite eliminar virus de la circulación después de una infección. Desempeñan un papel importante en el inicio de la inmunidad mediada por células T. Los $m\phi$'s expresan relativamente bajos niveles de moléculas MHC de clase II, sin embargo, esos niveles se incrementan por la acción de citocinas tales como el IFN γ y producido por las células T en los sitios de activación inmune. Los $m\phi$'s activados secretan una gran variedad de proteasas dentro de su ambiente local, las cuales degradan el material antigénico convirtiéndolo en fragmentos peptídicos particularmente efectivos en el procesamiento y presentación a los linfocitos T $CD4^+$ ³⁶.

C. RESPUESTA INMUNE HACIA HCMV.

En la respuesta inmune hacia HCMV participan mecanismos de inmunidad tanto específicos como inespecíficos, ambos responsables del control de la infección y la latencia viral. Los anticuerpos contra el virus no desempeñan un papel principal en la recuperación de la infección; sin embargo, en las infecciones congénitas aún cuando los anticuerpos maternos no evitan la infección, sí reducen la severidad de la enfermedad³⁷. Con respecto de la inmunidad mediada por células, si bien no se ha logrado demostrar actividad de células NK contra las células infectadas por el virus, existen informes que indican que una deficiencia en esta subpoblación predispone al huésped a infección por el virus³⁸. Se ha demostrado participación de linfocitos T citotóxicos $CD8^+$ específicos del virus; los cuales son capaces de lisar células infectadas previo a la formación de la progenie viral. Los linfocitos T citotóxicos tienen como blanco los productos de los genes virales IE-1 (UL-123), gB (UL-55), UL-18, pp65 (UL-83) y pp150 (UL-32)^{39,40}. Por otra parte, se ha sugerido el importante papel que desempeñan los linfocitos T $CD4^+$ en el control de la infección. Entre las funciones que realizan destaca la producción de citocinas con actividad antiviral y la participación en el desarrollo de CTLs y anticuerpos anti-HCMV. Los antígenos inductores de este tipo de respuesta incluyen pp65, pp28 (UL-99), IE-1, IE-2, pp71 y gB⁴¹.

D. MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR HCMV.

Durante la coevolución con sus huéspedes los virus han adaptado los mecanismos de vigilancia inmune y algunos de ellos tales como el HCMV persisten en el organismo aún en presencia de una respuesta inmune vigorosa.

D.1. Ocultación viral.

El citomegalovirus humano ha desarrollado mecanismos mediante los cuales evade su detección por los componentes del sistema inmune; entre estos se encuentran la variación antigénica, infección en continuidad, enmascaramiento y latencia.

D.1.1. Variación antigénica. Existen más de 100 cepas de HCMV las cuales muestran hasta 80% de homología secuencial. En pacientes receptores de transplante, los síntomas de la enfermedad se asocian a la infección primaria o reinfección, en tanto que la reactivación cursa asintomática, indicando que la inmunidad previa protege contra una cepa homóloga pero no así de una cepa nueva²⁰.

D.1.2. Infección en continuidad. La glicoproteína B (gB) viral participa en la infección de célula a célula por fusión entre las membranas de células infectadas y de células sin infectar¹¹.

D.1.3. Enmascaramiento. El HCMV se une a β -2-microglobulina a través de su tegumento, efecto que probablemente le permite preservar la infectividad de viriones lesionados^{42,43}. Por otra parte, el virus también genera un fenómeno de enmascaramiento induciendo la expresión de FcR de alta afinidad para IgG en superficie celular^{44,45}.

D.1.4. Latencia. Igual que otros herpesvirus, después de la infección primaria, el HCMV establece infecciones persistentes. El reservorio del HCMV latente son las células del linaje mieloide, en las que después de diferenciarse a macrófagos por estimulación alogénica, el HCMV latente es reactivado. Por consiguiente; los monocitos portan y diseminan el virus en sangre periférica, evadiendo así, la respuesta inmune¹⁹.

D.2. Inmunosupresión.

El HCMV infecta sólo una pequeña proporción de los leucocitos, lo cual indica que la destrucción citopatogénica no es el único mecanismo de la inmunosupresión causada en individuos inmunocompetentes, por lo que también se ha asociado a alteraciones en los inmunoreguladores de la respuesta inmune.

D.2.1. Supresión de la hematopoyesis por infección de las células pluripotenciales.

En huéspedes inmunocompetentes la infección por HCMV produce un efecto de inmunosupresión transitoria debido a la producción de interferón alfa (IFN- α) por células productoras de interferón natural, el cual altera la maduración y función de los monocitos y la respuesta proliferativa de los linfocitos hacia mitógenos o antígenos, a través de la inducción de un antagonista del receptor de IL-1, asociado con el defecto proliferativo producido por el HCMV⁴⁶.

D.2.2. Inducción de TGF- β . La infección *in vitro* de fibroblastos por HCMV produce un incremento en la producción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), esta citocina es responsable de la inhibición de la activación de los macrófagos, células NK y CTLs. Además, induce disminución de la expresión de las moléculas del MHC y estimula la replicación viral⁴⁷.

D.2.3. Alteración de la respuesta y producción de citocinas. En las células mononucleares de sangre periférica se ha observado que la infección por el virus causa daños en el metabolismo tanto en linfocitos como en monocitos, alterando finalmente la capacidad de producción y respuesta a citocinas como IL-1 e IL-2⁴⁸. Por otra parte, las células infectadas por el HCMV son capaces de transducir señales de quimiocinas que incluyen la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α)⁴⁹.

D.2.4. Proteínas virales homólogas a receptores asociados a proteína G. El HCMV expresa la proteína US28 sobre células infectadas. Posiblemente, US28 es responsable de la unión de quimiocinas tales como RANTES, MCP-1, MIP-1 α y MIP-1 β . Las células infectadas por el virus transducen señales de éstas moléculas que conducen a un incremento en los niveles de adenosina del monofosfato cíclico (AMPC) y diacilglicerol lipasa, las cuales inhiben funciones de los macrófagos y de células T⁴⁹.

D.2.5. Inducción de apoptosis en células linfoides. Estudios recientes han demostrado que en células T (CD45RO⁺, de memoria) procedentes de individuos seropositivos al HCMV, los niveles de expresión de la molécula Fas inductora de apoptosis, están incrementados; mientras que disminuye la expresión del producto del gen bcl-2 el cual se relaciona con el control de la apoptosis⁵⁰.

D.3. Bloqueo de los mecanismos efectores de la respuesta inmune.

D.3.1. Bloqueo de la activación de células NK. El HCMV produce una proteína con homología a las cadenas pesadas del MHC de clase I que se enlaza a β_2 -microglobulina. Estudios recientes sugieren que este homólogo (producto del gen UL-18) expresado sobre la superficie de células infectadas actúa inhibiendo la lisis mediada por células NK. Probablemente, el receptor de la molécula UL-18 es la lectina de tipo C, CD 94, la cual se encuentra en la superficie de muchas células NK y algunos linfocitos T y funciona como receptor inhibitorio tanto de células NK como de células T⁵¹.

D.3.2. Bloqueo de la actividad de complemento. La infección por HCMV induce un incremento en la expresión de los inhibidores de complemento CD55 y CD46 codificados por el huésped. La molécula CD55 (factor acelerador del decaimiento, DAF) es responsable de inhibir y disociar la convertasa C3 de las vías clásica y alterna del complemento, mientras que CD46 funciona como un cofactor para la degradación e inactivación de C3b unido a células por el factor I. El incremento de CD55 en células infectadas por HCMV regula la convertasa C3 en la vía alterna e incrementa la resistencia a lisis mediada por complemento⁵².

D.3.3. Disminución de la expresión de moléculas del MHC-I. La infección *in vitro* por HCMV induce desregulación de las moléculas del MHC de clase I a través de la producción de diferentes proteínas las cuales actúan en varios niveles durante el proceso de ensamblaje y transporte de dichas moléculas:

a) El HCMV contiene dos loci dentro de su genoma cuyos productos desregulan las cadenas pesadas de clase I, a saber US2⁵³ y US11⁵⁴. Ambas proteínas interactúan directamente con las moléculas de clase I recién sintetizadas causando su dislocación dentro del citosol en un proceso que involucra el complejo Sec61⁵⁵. El proteasoma degrada

las moléculas de clase I dislocadas al citosol. Posiblemente cada glicoproteína reconozca alelos diferentes de las cadenas de clase I⁵³.

b) gpUS3 es una proteína del HCMV la cual inhibe la maduración y el transporte de complejos MHC de clase I [β_2 -microglobulina hacia la superficie celular^{56,57}. Existe cooperación entre gpUS3 y gpUS2 o gpUS11, implicando que las cadenas pesadas retenidas por gpUS3 se localizan en la vecindad del complejo de translocación Sec61⁵³.

c) La expresión de la glicoproteína US6 del HCMV se correlaciona con la inhibición del transporte de péptidos hacia el RE a través de la molécula TAP. Se ha demostrado que US6 se asocia con el complejo TAP-tapasina-MHC-calreticulina/calnexina en el lumen del RE (fig. 5)⁵⁸⁻⁵⁹.

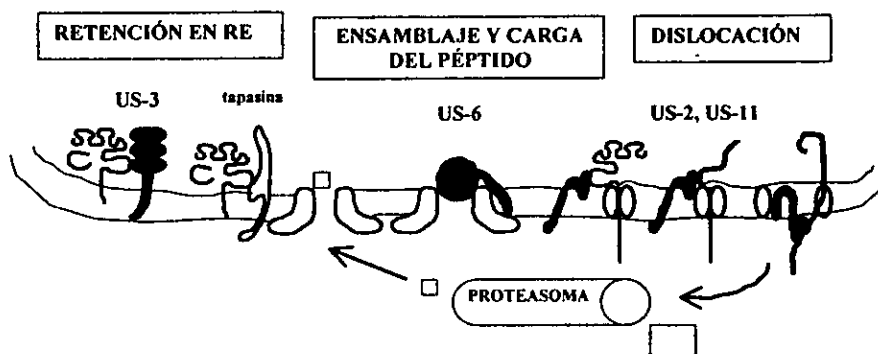


Figura 5. Interferencia con la biosíntesis de moléculas del MHC de clase I. Los productos de los genes virales se muestran en color.

D.3.4. Modulación de la expresión de moléculas del MHC-II. Existen pocos informes acerca de infecciones virales que alteren la expresión de las moléculas del MHC de clase II; algunos de los cuales, presentados por Sedmak y col. indican que el HCMV reduce significativamente el efecto potenciador del IFN- γ sobre la expresión de tales moléculas en la superficie de células endoteliales^{60, 61} y células de epitelio alveolar⁶². Se sabe que la producción de IFN $\alpha\beta$ inhibe la inducción de moléculas del MHC de clase II mediada por IFN γ ⁶³.

Por otra parte, estudios recientes revelan que la transducción de señales estimulada por IFN γ (vía Jak/Stat) está alterada en células infectadas. La señalización por Jak/Stat es el más próximo de los niveles que se requieren para inducir la expresión de las moléculas MHC II, por tanto, su alteración previene la sobrerregulación del transactivador de clase II (CIITA)⁶⁴ y la activación de la transcripción de las moléculas⁶⁵.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los linfocitos T CD8⁺ son una población relevante en la respuesta inmune contra muchos virus. Estos, lisan células infectadas que les presentan péptidos virales en el contexto de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I. También los linfocitos T CD4⁺ son protagónicos en el control de las infecciones virales, ya que participan en la activación de la respuesta inmune humoral y celular cuando se les presentan péptidos virales en el contexto de moléculas del MHC de clase II. Sin embargo, los virus han desarrollado mecanismos para evitar el establecimiento de dichas respuestas. El HCMV previene el reconocimiento de las células infectadas por los linfocitos T CD8⁺, principalmente por disminución de la expresión de las moléculas de MHC clase I. No obstante, se desconoce el efecto que induce sobre la expresión de las moléculas de MHC clase II en células presentadoras de antígeno (CPA's).

Las CPA's desempeñan un papel importante en la inducción de actividad funcional de las células T CD4⁺. Los macrófagos son células profesionales presentadoras de antígeno, por lo que decidimos estudiar el efecto de la infección por HCMV en la expresión de moléculas del MHC en la línea celular U-937 (linfoma histiocítico humano) diferenciadas a macrófagos mediante estímulos con PMA (éster de forbol miristato).

IV. OBJETIVOS.

A) GENERAL

Estudiar el efecto de la infección *in vitro* por HMCV en la expresión de las moléculas de histocompatibilidad de clase II en macrófagos humanos.

B) PARTICULARES

- Realizar la titulación del citomegalovirus humano cepa AD-169 por la técnica de formación de placas líticas.
- Producir anticuerpos monoclonales de los hibridomas 2.06, C-41, L-14 y W6/32 por cultivo y/o por líquido de ascitis en ratones BALB/c.
- Diferenciar monocitos de la línea celular U-937 a macrófagos por estimulación con éster de forbol miristato (PMA).
- Determinar por citometría de flujo el nivel de expresión de moléculas de histocompatibilidad en macrófagos humanos infectados *in vitro* por citomegalovirus humano AD-169.

V. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Uno de los mecanismos más importantes por los cuales HCMV evade la respuesta inmune celular del huésped es la evidente disminución de la expresión de las moléculas del MHC clase I sobre células infectadas, evento por el que presumiblemente evita la participación de los linfocitos T CD8⁺. No obstante, el efecto que éste virus produce sobre las moléculas de clase II es aún desconocido. Por lo cual, se establece la siguiente hipótesis de trabajo.

Si el HCMV es capaz de disminuir la expresión de moléculas del MHC-I en células infectadas para evadir la respuesta inmune y considerando la similitud de la funcionalidad y de los mecanismos de síntesis de moléculas de clase I y II, entonces el HCMV tal vez inducirá la disminución de la expresión de las moléculas del MHC-II sobre la superficie de células U-937 diferenciadas a macrófagos. Tal evento evitaría la activación de los linfocitos T CD4⁺ y con ello, el establecimiento de una respuesta inmune específica contra el virus.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

A. MATERIAL BIOLÓGICO.

A.1. Hibridomas:

2.06	ATCC HB-104	Productor de mAb anti-determinante monomórfico de HLA-DR.
C-41	ATCC HB-9215	Productor de mAb anti-glicoproteína B de la envoltura del HCMV.
L-14	ATCC HB-8554	Productor de mAb anti-proteína inmediata temprana principal (IE-1) del HCMV.
W6/32	ATCC HB-95	Productor de mAb anti-determinante monomórfico de HLA A, B, C.

A.2. Líneas celulares:

U-937	ATCC CRL-1593	Linfoma histiocítico humano.
MRC-5	ATCC CCL-171	Fibroblastos de pulmón fetal humano.
U-373 MG	ATCC HTB-17	Astrocitoma humano.

A.3. Virus:

Citomegalovirus humano cepa AD-169 ATCC VR-538.

B. EQUIPO:

FACSORTER Becton-Dickinson, programa de cómputo Cell Quest para el procesamiento de datos.

C. MÉTODOS

C.1. Cultivo de líneas celulares.

Las células U-937, U-373 y MRC-5 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y 250 mg/mL de ampicilina; se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C. Las células MRC-5 y U-373 se cultivaron hasta obtener monocapas confluentes, realizando los subcultivos en relaciones de pase 1:2, previo proceso de tripsinización.

C.2. Purificación de anticuerpos monoclonales.

a) Los hibridomas 2.06, C-41, L-14 y W6/32 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, glutamina 2 mM, y 100 UI/mL de penicilina, incubando a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.

b) A ratones BALB/c se les administró 1 mL de pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) por vía intraperitoneal. Dos semanas después se inocularon por la misma vía 1x10⁶ células de los hibridomas mencionados. Cuando los ratones desarrollaron ascitis se drenaron diariamente. El sobrenadante de cultivo y el líquido de ascitis se almacenaron en condiciones estériles a -20°C hasta la purificación del mAb.

c) Los anticuerpos del sobrenadante de cultivo y el líquido de ascitis precipitados con una solución de sulfato de amonio a 50% de saturación, se dializaron contra PBS 1X. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad utilizando como matriz una columna de proteína A-sefarosa, a una velocidad de 20-30 mL/h. La levigación de la IgG se realizó con glicina-HCl 1.0 M, pH 2.4. Las fracciones colectadas se neutralizaron con 100 µL de TRIS 1.0 M, pH 8.0. La concentración final de las proteínas se determinó por espectrofotometría a 280 nm.

d) La funcionalidad de los mAb 2.06, L-14 y W6/32 se determinó por inmunofluorescencia indirecta incubando células MRC-5 infectadas con HCMV y lavadas dos veces con PBS-1X con los mAbs mencionados a 4°C por 30 min. Después de dos lavados con PBS-1X, las células se incubaron con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a fluoresceína, se lavaron dos ocasiones con PBS 1X y finalmente se fijaron con paraformaldehído 0.5%. La intensidad de fluorescencia de grupos de 5000 células se

determinó por citofluorometría de flujo analizando los resultados en el programa de cómputo Cell Quest.

e) La funcionalidad del mAb C-41 se comprobó mediante la técnica de Western Blot. Una muestra de antígeno (células U-373 o MRC-5 infectadas con HCMV) se corrió electroforéticamente en un gel de poliacrilamida bajo condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a un papel de nitrocelulosa bloqueando los sitios activos con leche 1.5% en PBS-Tween 0.05%. Después de tres lavados con PBS 1X-Tween 0.05% se incubó el mAb por 2 h a 37°C seguido de tres lavados con PBS-Tween 0.05%. Posteriormente se incubó con un anticuerpo anti-IgG humano conjugado a peroxidasa por 2 h a 37°C, revelando una banda de 130 KDa con diaminobencidina-peróxido correspondiente a la proteína de envoltura viral, gB.

C.3. Determinación del título viral.

Monocapas confluentes de células MRC-5 en botellas de cultivo de 75 cm² se lavaron dos veces con PBS-IX estéril, se infectaron por adsorción durante 2h con diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-7}) de una suspensión de HCMV. Posteriormente se adicionaron 5 mL de agarosa 0.6% en medio D-MEM al 2% de SFB y las células se incubaron a 37°C en 5% de CO₂ durante 7 días. Una segunda capa de agarosa 0.6% se adicionó sobre la primera; 7 días después la monocapa se fijó con 2 mL de paraformaldehído al 10%, y se tiñó con azul de bromofenol. El número de UFP se determinó mediante la relación (número de placas) X (1/dilución) y resultó de 10⁸ UFP/mL. Alícuotas del virus se mantuvieron a -70°C.

C.4. Diferenciación celular.

La viabilidad celular se comprobó por exclusión con azul tripán. 7×10^5 células U-937 estimuladas con PMA 160 nM se mantuvieron en medio RPMI-1640 al 10% de SFB y 5 mM de glutamina. Después de 48 h las células se cosecharon para someterlas a las pruebas de diferenciación o se infectaron con HCMV según se indica en el apartado de infección viral.

C.4.1. Adherencia.

La propiedad de adherencia se evaluó por microscopía óptica en las células U-937 sin estimular y con estímulo de PMA 160 nM.

C.4.2. Expresión de receptores FcR.

Una suspensión de eritrocitos de carnero al 2% sensibilizados con hemolisina y complemento, se mezclaron con la suspensión de células U-937 estimuladas y sin estimular ajustada a 20×10^6 por mL por 30 min a 37°C. Después de centrifugar a 5000 rpm por 1 min, una gota de la mezcla celular se colocó sobre un portaobjetos. La cuenta incluyó las células que unieron 3 o más eritrocitos sensibilizados.

C.4.3. Expresión de molécula de superficie CD14.

1×10^6 células U-937 que se estimularon y sin estimular se lavaron dos veces con PBS 1X y posteriormente se incubaron en la oscuridad con un anticuerpo anti-CD14 a 4°C, 30 min después se lavaron dos veces más y se fijaron con paraformaldehído 0.5%. La intensidad de fluorescencia se determinó como se menciona después.

C.4.4. Expresión de moléculas del MHC de clase II.

1×10^6 células U-937 con tratamiento y sin tratamiento de PMA se lavaron dos veces con PBS-1X, se incubaron en la oscuridad con el anticuerpo 2.06 a 4°C, por 30 min, después se lavaron dos veces más y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína (cabra anti-cadenas H de IgG de ratón), las células se resuspendieron en paraformaldehído 0.5%. La intensidad de fluorescencia de grupos de 5000 células se determinó por citofluorometría de flujo analizando los resultados en el programa de cómputo Cell Quest.

C.4.5. Actividad de esterasa no específica.

Células U-937 diferenciadas y sin diferenciar se fijaron sobre portaobjetos con metanol por 5 min dejando secar a temperatura ambiente, y se incubaron por 45 min a temperatura ambiente en una mezcla de amortiguador de fosfato, pararosanilina hexazotizada y α -naftil acetato. Las placas se lavaron con agua corriente y se contratiñeron con azul de toluidina al

1%. Posteriormente, se deshidrataron con cantidades crecientes de etanol y se decoloraron con xilol. Se contó el número de células con actividad de esterasa.

C.4.6. Fagocitosis.

Una muestra de células U-937 diferenciadas y sin diferenciar se ajustaron a una suspensión de 20×10^6 células/mL y se incubaron a 37°C por 15 min en una mezcla formada de amortiguador de Krebs-Henseleitt, KCN 0.01 M y NBT 0.1%. La reacción se detuvo con HCl. El formazán extraído con piridina se cuantificó por espectrofotometría a 515 nm ajustando a 0 con un blanco de piridina.

C.5. Infección viral.

A) Las células U-937 lavadas con PBS 1X se infectaron con 10 MOI de HCMV centrifugando a 1500 g durante 1 h a temperatura ambiente. Después de retirar el inóculo viral, las células infectadas se lavaron con PBS 1X y se mantuvieron en medio RPMI 1640 al 10% de SFB hasta la realización de las cinéticas de infección.

B) Células U-937 estimuladas por 48 h con PMA, se infectaron por adsorción con 10 MOI de HCMV durante 2 h. Se lavaron con PBS 1X y se mantuvieron en medio RPMI 1640 mas 10% de SFB y PMA 160 nM hasta la realización de las cinéticas de infección.

C.6. Cinéticas de infección.

Las células U-937, y los macrófagos derivados por su diferenciación se infectaron como se indicó. Se cultivaron a 37°C por tiempos definidos (0, 24, 48, 72, 96 y 120 h), se cosecharon y lavaron dos veces con PBS-BSA1% centrifugando a 1200 g por 5 min. Finalmente, se resuspendieron en PBS-BSA1% a una concentración de 10^6 /mL y se sometieron al marcaje con los anticuerpos para su análisis por inmunofluorescencia indirecta.

C.7. Inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo.

Para el estudio de la densidad de las moléculas de MHC-I y MHC-II, así como IE-1 y gB sobre superficie celular, a los diferentes tiempos de infección, 10^6 células se pusieron en contacto con el mAb de interés (W6/32, 2.06, L-14 y C-41, respectivamente) durante 30

min a 4°C. Después de tres lavados con PBS-BSA1% (centrifugando a 1200 g por 5 min), se incubó en oscuridad durante 30 min a 4°C con el anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína (cabra anti-cadenas H de IgG de ratón), las células se resuspendieron en paraformaldehído.

La intensidad de fluorescencia de grupos de 5000 células se determinó por citofluorometría de flujo analizando los resultados con el programa de cómputo Cell Quest.

VII. RESULTADOS.

A. Producción y purificación de anticuerpos monoclonales.

La producción de los mAbs W6/32, 2.06, L-14 y C-41 se llevó por cultivo de los respectivos híbridomas y por inducción de la producción de ascitis en ratones BALB/c. Los anticuerpos del sobrenadante de cultivo y del líquido de ascitis se precipitaron con sulfato de amonio y purificaron por cromatografía de afinidad a través de una columna de proteína A-sefarosa. A partir de la purificación se colectaron fracciones cuyas lecturas de absorbancia se representan en la figura 6, mismas que se convirtieron mediante la relación: 1 lectura de absorbancia = 0.8 mg de anticuerpo/mL; para así obtener la cantidad de anticuerpo contenida en cada fracción. Las fracciones agrupadas en un pool se ajustaron a una concentración final de 1 mg de mAb/mL.

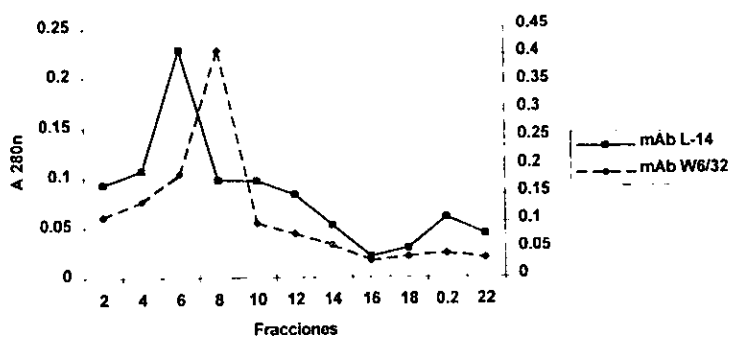


Figura 6. Lecturas de absorbancia obtenidas por espectrofotometría a 280 nm, de las fracciones de los mAbs W 6/32 y L-14 purificados por cromatografía de afinidad en una columna de proteína A-sefarosa

B. El PMA induce diferenciación a macrófagos en células U-937.

B.1. Cambios morfológicos en células U-937 estimuladas con PMA.

La diferenciación morfológica de los monocitos se basó en una estimulación con PMA 160nM durante 48 h. El número de células U-937 en suspensión cultivadas en presencia del estímulo, disminuyó rápidamente, con 100% de adherencia observada hacia las 48 h post-estímulo. Las células diferenciadas mostraron gran tendencia a agruparse entre sí (fig. 7A). Por otra parte, las células U-937 cultivadas en ausencia del estímulo, se mantuvieron en suspensión (fig. 7B).

B.2. Cambios fenotípicos en células U-937 estimuladas con PMA.

Para investigar el fenotipo morfológico, examinamos la expresión de varias moléculas de superficie asociadas con la diferenciación inducida con PMA en células U-937. Según se observó por microscopía óptica, aproximadamente 50% de las células U-937 cultivadas en presencia de PMA 160 nM formaron rosetas E con eritrocitos de carnero sensibilizados, es decir, expresan el receptor Fc (fig. 8A); en tanto que sólo 12% de las células que no se sometieron a estímulo son positivas para el mismo receptor (fig. 8B). Se consideró que una roseta fue aquella célula que unió 3 o más eritrocitos.

El efecto del PMA sobre la expresión del marcador de diferenciación CD14, se estudió por inmunofluorescencia directa con un anticuerpo monoclonal anti-CD14. Las células U-937 cultivadas en presencia de PMA 160 nM expresaron en su superficie la molécula CD14, mientras que las células U-937 control no lo expresan (fig. 9).

La expresión de la molécula de superficie MHC-II sobre las células U-937 se examinó después de 48 h de exposición al estímulo con PMA. No obstante los monocitos expresan moléculas del MHC-II, el tratamiento aumenta significativamente su expresión incrementando la intensidad de fluorescencia media de 46.42 a 241.64 (fig. 10).

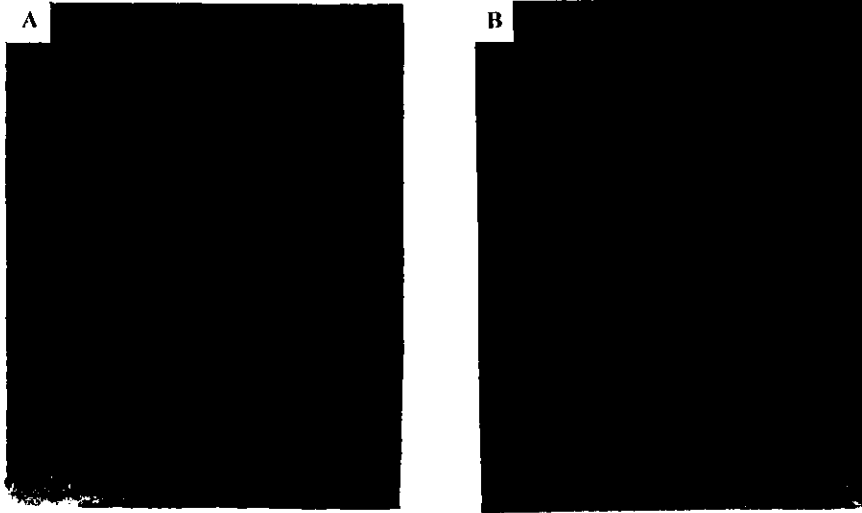


Figura 7. Efecto del PMA 160 nM sobre la diferenciación morfológica de células U-937. A) Células U-937 adherentes estimuladas con PMA por 24 h (X 100). B) Células U-937 no adherentes cultivadas en ausencia del estímulo (X 100).

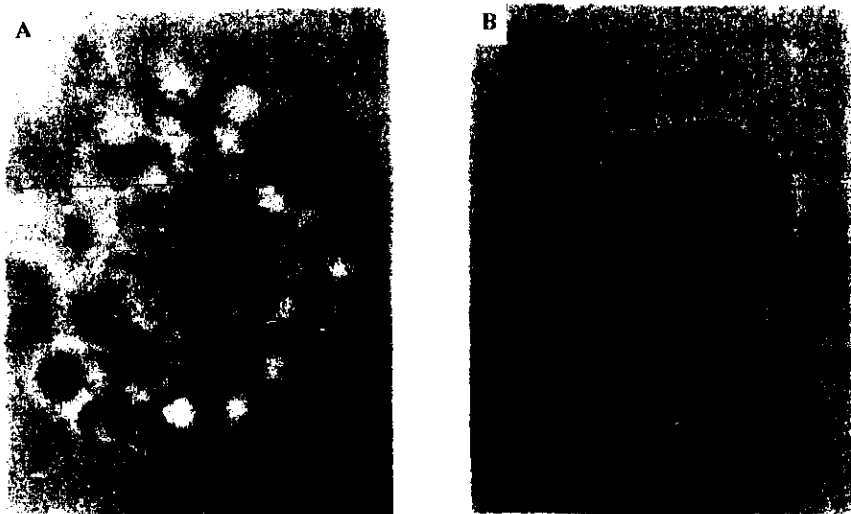


Figura 8. Efecto del PMA sobre la expresión del receptor Fc en células U-937. Las células U-937 estimuladas con PMA 160 nM por 24 h (A) y sin estimular (B) se incubaron con eritrocitos sensibilizados. 12% de los monocitos son positivos para el receptor, su expresión incrementa al 50% en las células tratadas con PMA.

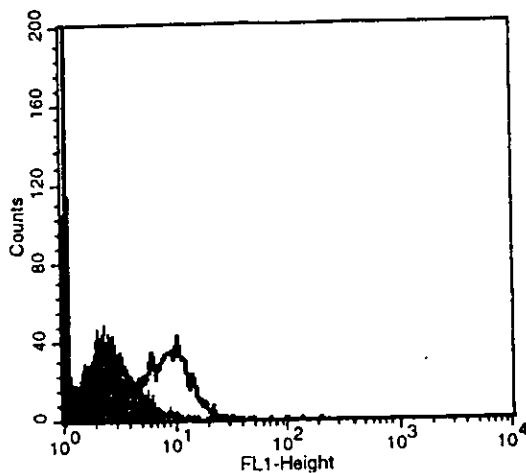


Figura 9. Regulación de la expresión de CD14 sobre células U-937 por PMA-160 nM. Las células U-937 se cultivaron con PMA por 48 h y se tiñeron con un mAb anti-CD14 conjugado con ficoeritrina. Los histogramas de un experimento representativo muestran sobre el eje de las abscisas el logaritmo de la intensidad de fluorescencia de células tratadas con PMA (perfil abierto) superimpuestas sobre células sin tratar (perfil cerrado). El eje de las ordenadas representa el número celular relativo.

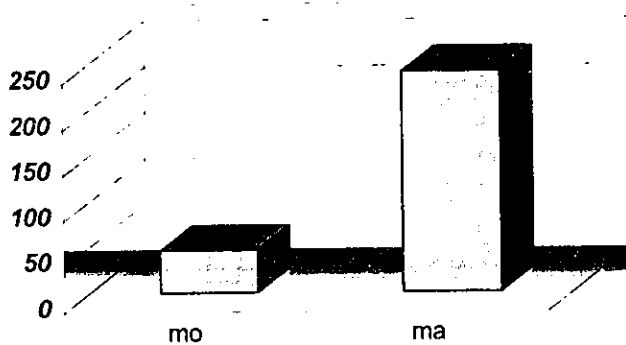


Figura 10. Expresión del MHC-II sobre la superficie de células U-937. La expresión del MHC-II se analizó sobre células U-937 sin tratar (mo) y células U-937 diferenciadas por 48 h con PMA 160 nM (ma). Las barras representan la intensidad de fluorescencia media.

B.3. Cambios funcionales en células U-937 estimuladas con PMA.

Las células de la línea U-937 sin estimular y estimuladas por 48 h con PMA 160 nM se ensayaron para marcadores funcionales característicos de células del linaje monocito/macrófago. En la figura 11A se observa que las células tratadas con PMA mostraron una intensa tinción citoplasmática para la enzima esterasa inespecífica; no así las células control, fig. 11B.

El tratamiento con PMA de las células U-937 induce una mayor actividad fagocítica como se observó por el aumento de la reducción del colorante NBT, comparado con las células sin diferenciar. Asimismo, se observó que tanto los monocitos como los macrófagos poseen actividad basal de reducción de dicho colorante; misma que se incrementó cuando se induce a las células a fagocitar el zimosán opsonizado (fig. 12).

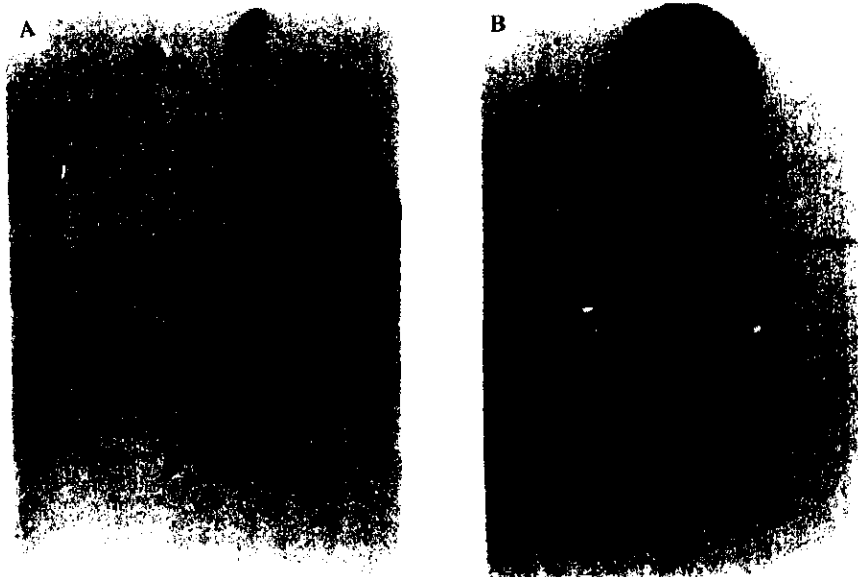


Figura 11. Actividad de esterasa inespecífica. Fijaciones de células U-937 estimuladas con PMA 160 nM (A) y no estimuladas (B) teñidas para la actividad de la enzima esterasa no específica.

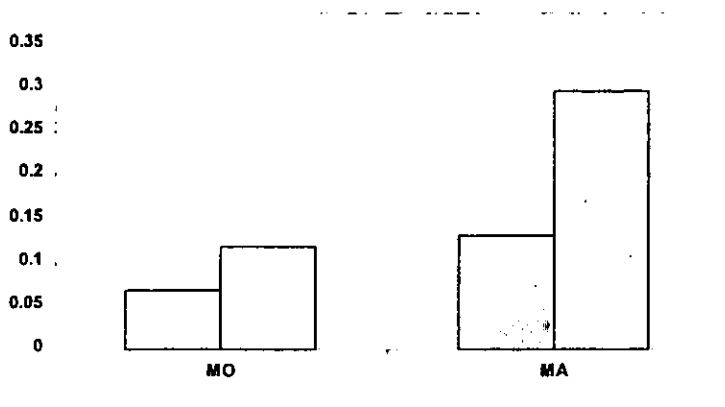


Figura 12. Influencia del PMA sobre la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT). Las células U-937 se cultivaron por 48 h en presencia de PMA 160 nM y se trataron por 15 min a 37°C con NBT (0.01 M) y zimosán opsonizado. La gráfica representa las lecturas de absorbancia obtenidas a 510 nm para la cantidad de NBT reducido por células U-937 sin tratamiento de PMA (MO) y con tratamiento de PMA (MA). Las barras en gris representan la cantidad de NBT reducido en ausencia de zimosán y las barras claras, en presencia de zimosán.

C. Las células U-937 diferenciadas a macrófagos son permisivas a la infección por HCMV.

La importancia de la diferenciación como un requisito para la replicación del HCMV se examinó en una cinética. Las células se tiñeron con mAbs específicos contra las proteínas IE y gB del virus y se analizaron por inmunofluorescencia indirecta a través de citometría de flujo. Los monocitos infectados inicialmente expresan el antígeno IE, alcanzando un pico máximo hacia las 24 h post-infección, mismo que decae con el tiempo. La proteína gB no se expresó en ningún tiempo de la cinética (fig. 13). Por otra parte, en la cinética de expresión de la proteína IE en células U-937 tratadas con PMA, es comparable a la obtenida en las células monocíticas, mientras que la expresión de gB se observa hacia las 72 h, con un aumento sostenido hasta las 120 h post-infección (fig. 14).

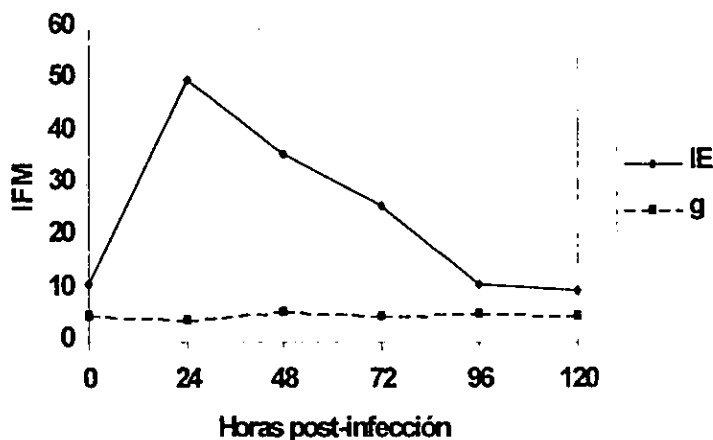


Figura 13. Expresión de las proteínas IE y gB del HCMV en monocitos infectados. Los monocitos U-937 no se infectaron (0h) o se infectaron durante 24, 48, 72, 96 y 120 h con 10 MOI de HCMV: La detección de las proteínas se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta con los mAb L-14 (IE-1) y C-41 (gB). La gráfica representa la intensidad de fluorescencia media (IFM) vs tiempo de infección.

D. Disminución de la expresión de moléculas del MHC-I en la superficie de macrófagos infectados por HCMV.

Para determinar el efecto de la infección *in vitro* por HCMV sobre la expresión de moléculas MHC-I en superficie celular, se realizó una cinética en macrófagos humanos. El análisis de la inmunofluorescencia indirecta utilizando el mAb W6/32 muestra una evidente disminución de las moléculas desde las 24 h p.i. misma que continúa de manera gradual, alcanzando hacia las 120 h p.i. una reducción de 80.6% de la densidad de expresión en comparación con las células sin infectar (0 h) (fig. 15).

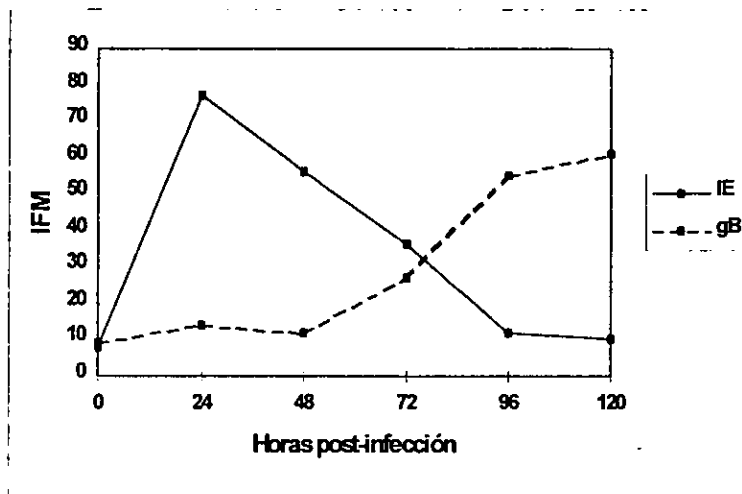


Figura 14. Expresión de las proteínas IE y gB del HCMV en monocitos U-937 estimulados con PMA 160 nM. Los monocitos fueron infectados durante 24, 48, 72, 96 y 120 h o no infectados (0 h) con 10 MOI de HCMV. El análisis de la densidad de las proteínas se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta a través de citometría de flujo, utilizando los mAAb mencionados. La gráfica representa la intensidad de fluorescencia media (MIF) vs tiempo de infección.

E. Disminución de la expresión de moléculas del MHC-II en la superficie de macrófagos infectados por HCMV.

Para determinar si el efecto de la infección *in vitro* con 10 MOI de HCMV en la expresión de moléculas de clase II era semejante al observado para las moléculas de clase I, se realizó una cinética de infección, cuyo análisis de la densidad molecular por inmunofluorescencia indirecta mediante citofluorometría de flujo, permite observar una importante reducción de la intensidad de fluorescencia de las moléculas de clase II en la superficie de los macrófagos hacia las 24 h p.i., siendo ésta de aproximadamente 31%. La disminución es gradual y continúa hasta las 120 h p.i. alcanzando una disminución de 72% (fig. 16).

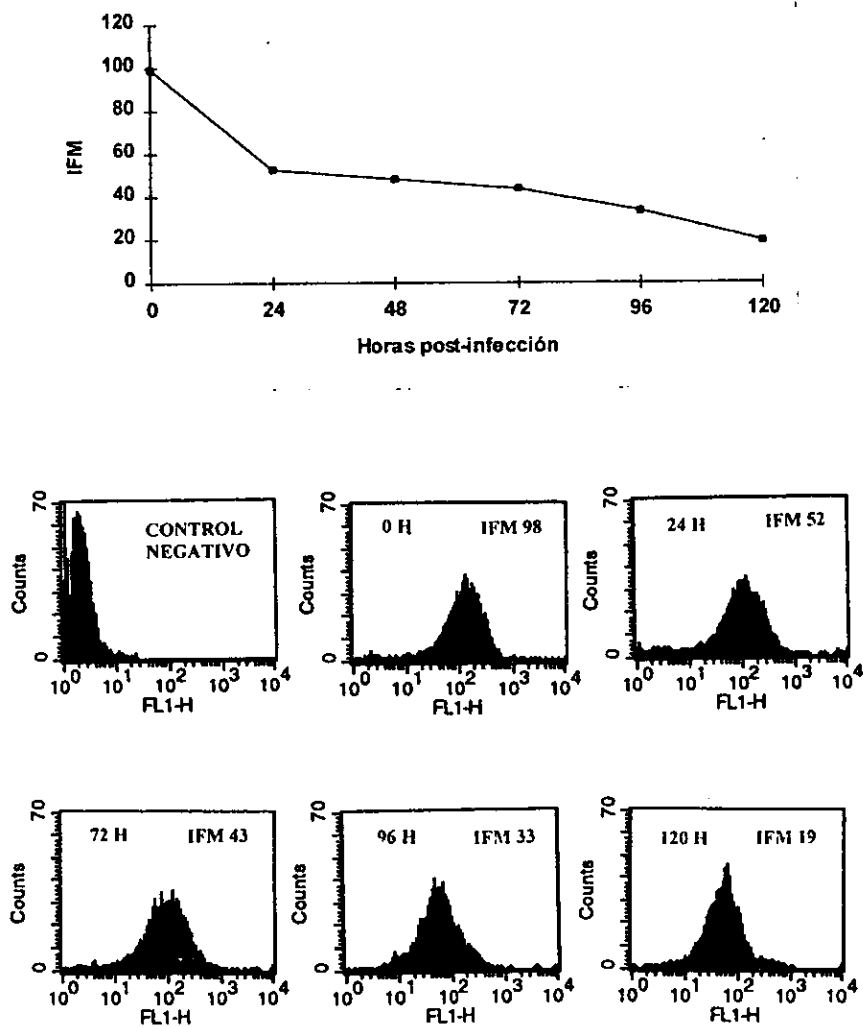


Figura 15. Disminución de la expresión de MHC-I en macrófagos humanos infectados con HCMV. Los macrófagos infectados con 10 MOI de HCMV por 24, 48, 72, 96 y 120 h, o no (0 h) y teñidos con el mAb W6/32. La densidad de las moléculas se realizó por inmunofluorescencia indirecta. Los histogramas representan la intensidad de fluorescencia contra el número celular relativo. (A) control negativo, (B) 0 h, (C) 24 h p.i., (D) 72 h p.i., (E) 96 h p.i. y (F) 120 h p.i.

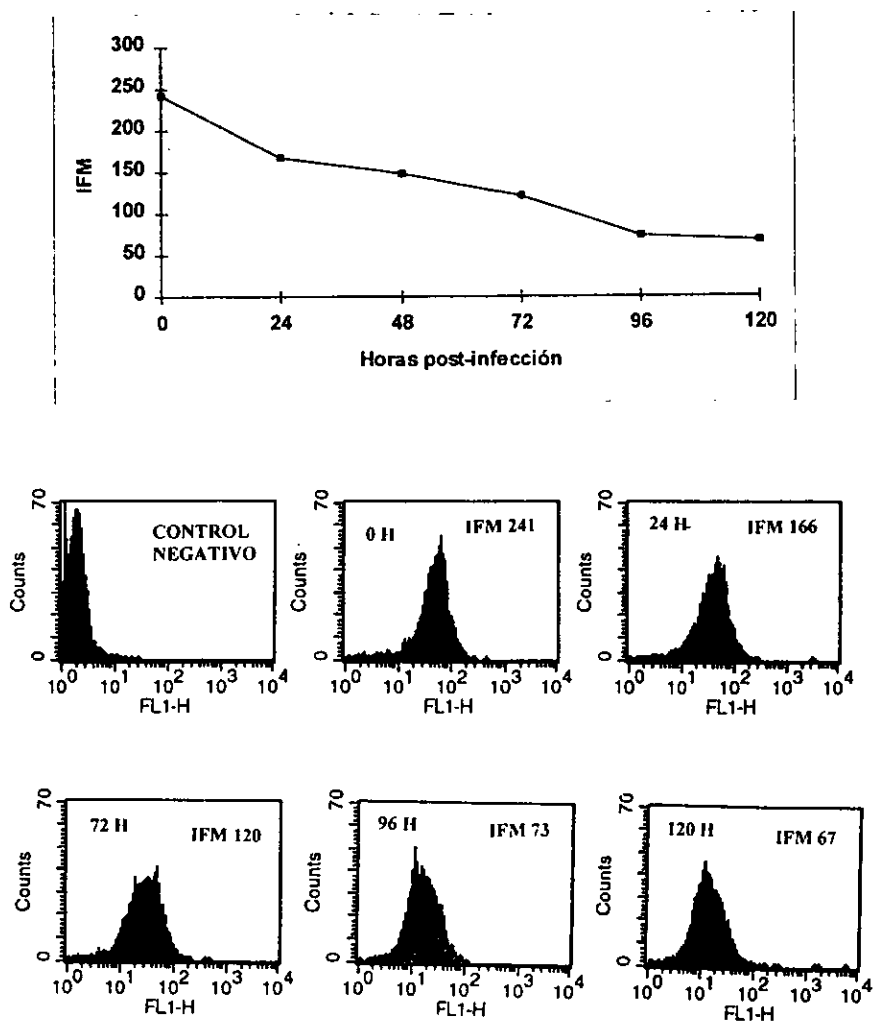


Figura 16. Disminución de la expresión de MHC-II en macrófagos humanos infectados con HCMV. Los macrófagos se infectaron o no con 10 MOI de HCMV en una cinética y teñidos con el mAb 2.06. El análisis de la densidad de las moléculas se realizó por inmunofluorescencia indirecta a través de citometría de flujo. Los histogramas representan la intensidad de fluorescencia contra el número celular relativo. Los histogramas representan la intensidad de fluorescencia contra el número celular relativo. (A) control negativo, (B) 0 h, (C) 24 h p.i., (D) 72 h p.i., (E) 96 h p.i. y (F) 120 h p.i.

VIII. DISCUSIÓN.

Durante la coevolución con sus huéspedes; los virus han modificado uno o más de los mecanismos efectores tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa, teniendo como resultado la permanencia viral en el organismo huésped. En este contexto, la disminución de la expresión de las moléculas del MHC en superficie celular es una estrategia común de muchos virus, a través de la cual las células que reconocen los antígenos cargados sobre tales moléculas son incapaces de eliminar las células infectadas.

El fenómeno de disminución de la expresión de moléculas de MHC-I se ha observado en algunas infecciones virales. Por ejemplo, en adenovirus el producto del gen E3-19K se encarga de retener y enlazar las cadenas pesadas de clase I en RE⁶⁶. Otros como el virus Herpes simplex producen proteínas que pueden unirse a los TAP's, evitando la translocación de los péptidos hacia el RE⁶⁷. Evidentemente, este evento contribuye a evadir la acción citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ asegurando la proliferación de la progenie viral.

En el caso de una infección por HCMV, se ha demostrado la existencia de varios mecanismos que contribuyen a la disminución de la expresión de moléculas de clase I sobre la superficie de fibroblastos humanos^{53,54,56-59}. La expresión de las moléculas de clase II en células presentadoras de antígeno tales como los macrófagos, es más efectiva en la generación de una respuesta inmune contra el virus, ya que los linfocitos T CD4⁺ tienen un papel protagónico en el control de la infección, pues además del desarrollo de CTLs y de IgG anti HCMV, producen linfocinas con función antiviral como IFN γ y TNF α . Sin embargo; actualmente se conoce poco sobre el efecto que los virus producen sobre la expresión de dichas moléculas.

En este trabajo demostramos que en un modelo de infección *in vitro* por HCMV, se produce una franca disminución de la expresión de moléculas de clase II en la superficie de células macrofágicas humanas.

Debido a que no existe una línea celular de macrófagos, y puesto que se ha demostrado que las células U-937 pueden inducirse a madurar a macrófagos; durante la

primera fase se caracterizaron los cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales adquiridos después de someterla a estímulos con el ester de forbol, PMA.

Los ester de forbol son productos naturales derivados de plantas de la familia *Euphorbiaceae*, principalmente del género *Croton*, los cuales son capaces de estimular la actividad de la protein cinasa C (PKC) a través de su unión al grupo funcional hidroxilo en las posiciones 4, 9 y 20 del forbol. Después de que los ester de forbol ocupan su receptor extracelular, activan la fosfolipasa C por un proceso mediado por la proteína de enlace a GTP. La fosfolipasa C a su vez degrada el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, para generar dos productos; inositol-1,4,5-trifosfato, que activa otras vías de señal de transducción, elevando la concentración de calcio intracelular y por tanto, activando otras cinasas dependientes de calcio y diacilglicerol, que activa y transloca protein cinasa C a la membrana de la célula donde está en contacto con los sustratos membranales⁶⁸.

Las células mieloides U-937 representan un paso en la diferenciación de los monocitos; los cuales después de tratamiento con PMA 160 nM sufrieron diferenciación máxima hacia las 48 h, en células adherentes con notable incremento de la actividad de la enzima esterasa⁶⁹. Los monocitos expresan moléculas de superficie que se unen a la región Fc de ciertas inmunoglobulinas. Por tanto, la función de tales moléculas es la de reaccionar con antígenos que están cubiertos por anticuerpos. No obstante las células U-937 expresan FcγRI y FcγRIIA, son inducidos a expresar de 1 a 5 veces más receptores FcγRI cuando se diferencian a macrófagos, mientras que la expresión del receptor FcγRII permanece sin cambios y no hay expresión de FcγRIII⁷⁰. Los resultados obtenidos después de incubar las células con eritrocitos de camero sensibilizados, indican un evidente aumento en la expresión de los receptores para la porción Fc de las IgG en las células que se sometieron a estímulos de PMA y correlacionan con datos mencionados anteriormente, no obstante se desconoce si la expresión de dichos receptores corresponde específicamente a FcγRI.

La diferenciación de las células mieloides también se asocia con la adquisición de una capacidad funcional para generar especies reactivas del oxígeno en el fagosoma, tales como aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo⁷¹. Para determinar si nuestros macrófagos derivados de monocitos habían adquirido dicha característica, se evaluó la capacidad de desarrollar un metabolismo oxidativo por medio de la activación de la hexosa-6-monofosfato; en la cual se produce NADPH (estallido respiratorio), uno de los

mecanismos más importantes en la actividad bactericida de los fagocitos. La integridad funcional de este paso se prueba mediante el empleo de NBT, un colorante amarillo aceptor de electrones que se convierte en formazán insoluble de color azul al reducirse la molécula. En nuestros experimentos, en las células U-937 tratadas con PMA se produjo mayor reducción del colorante y fué menos eficiente en las células que no se estimularon.

CD14, una glicoproteína de 55 KDa es un receptor de superficie celular para lipopolisacárido (LPS) y un marcador de diferenciación, el cual se expresa principalmente sobre las células mieloides. Las células monoblásticas (representadas por la línea celular U-937) carecen de expresión de tal molécula. La inducción de diferenciación por varios agentes, incluidos la vitamina D₃, el IFN- γ y los ésteres de forbol, favorecen la expresión de CD14 en esas células⁷²⁻⁷³. Los resultados obtenidos concuerdan con los ya mencionados, indicando que efectivamente después de tratamiento con el éster de forbol miristato, se induce expresión de la molécula CD14 en comparación con las células control.

Estudios realizados en células monocíticas han demostrado que la infección por el HCMV es abortiva, es decir, que la expresión de genes virales se restringe a los IE⁷⁴⁻⁷⁶. No obstante, la diferenciación de monocitos a macrófagos por cultivo con o sin señales de diferenciación específicas rompe el bloqueo en la expresión de genes IE resultando en la generación de nuevos viriones. Por ejemplo, cuando la línea celular de monocitos THP-1 se trata con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato, las células exhiben un fenotipo de macrófagos. Las células THP-1 sin diferenciar son resistentes a la infección por HCMV, mientras que las células diferenciadas son permisivas a la replicación viral⁷⁷. De manera similar; el HCMV se replica en células diferenciadas de teratocarcinoma humano N-tera-2, no así en las células sin diferenciar⁷⁸.

Los experimentos descritos en este estudio demuestran que en las células U-937 sin diferenciar, sólo se observan niveles detectables de expresión de los genes IE desde las primeras 24 h de infección. Sin embargo, en las células diferenciadas a macrófagos mediante estímulos con PMA, inicialmente se observa expresión de genes IE, misma que disminuye en el curso de la infección para dar paso a la expresión de las proteínas estructurales del virus, según se evidenció por la presencia de la proteína gB de la envoltura. Estos datos correlacionan con los descritos anteriormente, sugiriendo que

efectivamente los eventos de diferenciación están ligados a la infección productiva por el HCMV.

Interesantemente, se ha encontrado que la carencia de expresión de la región promotora/reguladora inmediata temprana principal (MIEP) de los tipos celulares no permisivos se debe, al menos en parte, a la represión del promotor IE principal del HCMV por secuencias 5' del promotor. Es probable que los cambios en la estructura de la cromatina alrededor de la región MIEP, los cuales son resultado de cambios en el enlace de proteínas celulares específicas de la diferenciación a ésta región del DNA, determinan la capacidad de la célula de expresar los genes IE del virus y por ende, la permisividad de la célula para la infección productiva. Se han identificado secuencias dentro de la región moduladora, las cuales enlazan factores celulares específicos de la diferenciación, denominados factores de enlace al modulador. El factor de transcripción celular YY-1 es un candidato a regulador negativo del MIEP, ya que previene el reclutamiento del factor de transcripción TFIIB al complejo de pre-inicio transcripcional sobre el MIEP. Consecuentemente, el control de la expresión de IE es claramente un mecanismo por el cual se mantiene la latencia viral en los monocitos⁷⁹⁻⁸⁰.

Habiendo demostrado la funcionalidad de las células diferenciadas y estableciendo que el HCMV completa ciclos replicativos en las mismas, la parte más importante del estudio se enfocó en determinar la capacidad que posee el HCMV de desregular la expresión de las moléculas del MHC. En este contexto, quizá lo más significativo es la drástica reducción en la expresión en superficie celular de las proteínas de clase I que se ha observado en células infectadas por el virus. Estudios previos han mostrado que el HCMV disminuye la expresión de las moléculas de clase I desde las primeras horas de la infección mediante la producción de la proteína US3, responsable de su retención en RE⁵³; continuada de la expresión de los productos de los genes US2 y US11^{54,57}, los cuales inducen la dislocación de las mismas para ser degradadas por el proteasoma. En este estudio observamos un importante efecto de disminución de la expresión de las moléculas de clase I sobre la superficie de los macrófagos derivados de la diferenciación, desde las primeras horas post-infección. Aunque dicha reducción no es total, se sabe que tan sólo se requiere de la expresión en superficie de cien moléculas de histocompatibilidad para activar a las

células T citotóxicas, de modo que dicha reducción sea suficiente para evadir la respuesta inmune. Por otra parte; si la disminución fuera completa, la célula infectada se volvería susceptible de ser eliminada por las células NK.

Evidencias presentadas por Sedmak y col. Indican que el HCMV reduce significativamente el efecto potenciador del IFN- γ sobre las glicoproteínas del MHC de clase II⁶⁰⁻⁶². De hecho, sólo unos pocos virus y oncogenes se ha reportado que inhiben la expresión de proteínas del MHC-II. En este estudio describimos un fenómeno de disminución de la expresión de las moléculas de clase II sobre la superficie de las células macrófágicas, que similar al mostrado en la reducción de las moléculas de clase-I se presenta en los tiempos inmediatos tempranos de la infección y no es absoluto. Posiblemente en dicho evento participan proteínas virales semejantes a US2, US3, US6 o US11 que inducen disminución de las moléculas de clase I. Actualmente se ha encontrado que la transducción de señales estimulada por el IFN- γ (vía Jak/Stat) se encuentra alterada en las células infectadas. Esta vía es el nivel más próximo que se requiere para la inducción de expresión de moléculas del MHC-II, y su alteración previene la sobreexpresión de CIITA y la activación de la transcripción de las moléculas⁶⁵. Las CPA's son una población importante en la generación de una respuesta inmune en contra del virus, por tanto, es importante para el HCMV escapar a la inmunovigilancia mediada por células T. Finalmente, dado que la activación de las células T CD4⁺ depende de la presentación de péptidos antigénicos del HCMV cargados sobre moléculas de clase II, en la superficie de CPA's, el efecto de disminución sugiere que el HCMV ha desarrollado un mecanismo más de evasión de la respuesta inmune. De esta manera, la modulación de la expresión de moléculas histocompatibilidad de clase II parece un evento importante, pues redundaría en la evasión de la mayoría de los mecanismos efectores de la respuesta inmune.

IX. CONCLUSIONES.

- ❖ El PMA induce cambios fenotípicos y funcionales en células monocíticas U-937 correspondientes a células macrofágicas.
- ❖ A diferencia de lo que ocurre en las células U-937 sin tratamiento, la diferenciación permite que en las células infectadas por HCMV se exprese la glicoproteína tardía gB (UL-55) del virus.
- ❖ La infección por el HCMV induce regulación negativa de la expresión de moléculas del MHC de clase I en macrófagos humanos.
- ❖ El HCMV induce disminución de la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase II en la superficie de macrófagos infectados.
- ❖ Similar a lo que ocurre con las moléculas del MHC de clase I, la desregulación de las moléculas de clase II, se produce en fases tempranas de la infección por HCMV.

X. PROPUESTAS.

- ◆ Identificar las proteínas virales implicadas en la disminución de la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase II.
- ◆ Caracterizar el mecanismo molecular involucrado en dicha disminución.

XI: ANEXOS.

REACTIVOS Y SOLUCIONES

1. Solución stock de PMA 1.6mM:

0.01 g de PMA se disuelven en 1 mL de etanol absoluto en esterilidad. A partir del stock se realiza una dilución 1:10000 para alcanzar la concentración final de 160 nM.

2. Hemolisina, una unidad subaglutinante:

La hemolisina (IgG de conejo contra GRC) se titula realizando diluciones en una microplaca de 96 pozos que contenga 500 μ L de suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2%. Se considera una unidad subaglutinante, la dilución inmediata a aquella en la cual se observa aglutinación de los GRC.

3. Paraformaldehído 2%:

Agregar 2 g de paraformaldehído a 100 mL de PBS 1X, calentar a 56°C en baño maría. ¡Cuidado, veneno!.

4. Amortiguador de fosfatos (PBS) 1X:

Cloruro de sodio (NaCl)	8,00 g
Cloruro de potasio (KCl)	0,20 g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4 Anh.)	1,15 g
Fosfato de potasio monobásico anhidro (KH_2PO_4)	0,07

Disolver en agua destilada ajustando el pH a 7.2 y aforar a 1000 mL.

5. Amortiguador de fosfatos:

Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4 Anh.)	2,4 g
Fosfato de potasio monobásico anhidro (KH_2PO_4)	6,8 g

Disolver en agua destilada ajustando el pH a 6.3 y aforar a 1000 mL.

6. α -naftil acetato:

Disolver 10 mg de α -naftil acetato en 2 mL de acetona. Preparar el día de su uso.

7. Pararosanilina hexazotizada:

a) Nitrito de sodio 4%. Disolver 0.4 g de nitrito de sodio en 10 mL de agua destilada. Preparar el día de su uso.

b) Pararosanilina. Disolver 1.0 g de pararosanilina en 20 mL de agua destilada y 5 mL de HCl 12 N. Solución estable por al menos dos meses.

La pararosanilina hexazotizada se prepara mezclando volúmenes iguales de las soluciones mencionadas, permitiendo reaccionar durante 1 min el día de su uso.

8. Mezcla de reacción:

Amortiguador de fosfatos pH 6.3	9.5 mL
Pararosanilina hexazotizada	0.1 mL
α -naftil acetato	0.5 mL

La mezcla de reacción se prepara el día de su uso. Filtrar.

9. Azul de toluidina 1%:

Colorante de contraste en la reacción de esterasa no específica. 1 g del reactivo se disuelve en 100 mL de agua destilada. Filtrar. Almacenar a temperatura ambiente.

10. Amortiguador de Krebs-Henseleit:

NaCl 0.154 M	100 partes
KCl 0.154 M	4 partes
CaCl ₂ 0.110 M	3 partes
KH ₂ PO ₄ 0.154 M	1 parte
MgSO ₄ 7H ₂ O 0.154 M	1 parte
NaHCO ₃ 3.25 g/250 mL	21 mL
Glucosa 260 mg/130 mL	

Mezclar todas las soluciones, excepto el bicarbonato. Adicionar 12 mL de NaHCO₃ sin burbujear para ajustar el pH a 7.2-7.4. Después agregar el bicarbonato burbujear por 20 min en CO₂.

11. Zimosán:

A 10 mg de zimosán adicionar 1 mL de agua destilada, centrifugar a 2000 rpm durante 5 min y resuspender el sedimento en 1 mL de suero fresco e incubarlo a 37°C por 20 min. Lavar el paquete con amortiguador de Krebs-Henseleit a 2000 rpm durante 5 min. Repetir la operación una vez más. Resuspender el sedimento en 1 mL de amortiguador.

12. KCN 0.01 M:

Disolver 0.0651 g de cianuro de potasio en agua destilada, aforar a 100 mL.

13. NBT 0.1%:

Disolver 0.01 g del colorante en 10 mL de agua destilada, adicionar una vez disuelto; 0.085 g de NaCl.

XII. REFERENCIAS.

1. Britt WJ and Alford ChA: Cytomegalovirus; in Fields BN, Jnipe DM, Howley PM (eds): Fields Virology. New York, Lippincott-Raven Publishers. 1996, pp2493-2523.
2. Cha T, Tom E, Kemble GW, Mocarski ES and Spaete RR. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 1996; 70:78-83.
3. Irmiere A and Gibson W. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* 1983; 130:118-133.
4. Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cenry R, Horsnell T, Hutchinson CA, Kouzarides T, Martignetti JA, Preddie E, Satchwell SC, Tomlinson P, Weston KM and Barrel BG. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD-169. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 154:125-169.
5. Duycknick-Smith J, and de Harven E. Herpes simplex virus and cytomegalovirus replication in WI-38 cells. *J Virol* 1974; 14:945-956.
6. Compton T, Nowlin DM and Cooper NR. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 1993; 193:834-841.
7. Kari B and Gehrz R. A human cytomegalovirus glycoprotein complex designed gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J Virol* 1988; 66:1761-1764.
8. Compton T. Towards a definition of the HCMV entry pathway. *Scand J Infect Dis* 1995; 99:30-32.
9. Söderberg C, Giugni TD, Zaia JA, Larsson S, Wahlberg JM and Moller E. CD13 (human aminopeptidase-N) mediates human cytomegalovirus infection. *J Virol* 1993; 67:6576-6585.
10. Keay S, Merigan TC and Rasmussen L. Identification of cell surface for the 86-kilodalton glycoprotein of the human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:10100-10103.
11. Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J and Pereira L. Glycoprotein B of the human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology* 1993; 197:143-158.
12. Compton T, Nepomuceno RR and Nowlin DM. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* 1992; 191:387-395.
13. Wathen M and Stinski M. Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection. *J Virol* 1982; 41:462-477.
14. Gibson W. Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 1996; 39:389-400.
15. Sinzger C, Plachter B, Stenglein S and Jahn G. Immunohistochemical detection of viral antigens in smooth muscle, stromal, and epithelial cells from acute human cytomegalovirus gastritis. *J Infect Dis* 1993; 167:1427-1432.
16. Hackman RC, Wolford JL, Gleaves CA, Myerson D, Beauchamp MD, Meyers JD and McDonald GB. Recognition and rapid diagnosis of upper gastrointestinal cytomegalovirus infection in marrow transplant recipients. A comparison of seven virologic methods. *Transplantation* 1994; 57:231-237.

17. Vasudevan VP, Mascarenhas DA, Klapper P and Lomvardias S. Cytomegalovirus necrotizing bronchiolitis with HIV infection. *Chest* 1990; 97:483-484.
18. Waldman WJ, Knight DA, Van Burskik A, Adams PW, Orosz CG and Sedmak DD. Endotelial HLA class II induction mediated by allogeneic T cells activated by cytomegalovirus-infected cultured endothelial cells. *Transplant Proc* 1993; 25:1439-1440.
19. Söderberg C, Fish KN and Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 1997; 91:119-126.
20. Ho M. *Cytomegalovirus: Biology and Infection*. 2nd ed. New York: Plenum Medical Book Co.,1991:37-56.
21. Echániz G, Tamayo E, Cruz A, Rangel H, Hernández P, Gatica R y Calderón E. Prevalencia de anticuerpos contra citomegalovirus en mujeres en edad reproductiva. *Salud Pública Mex* 1993; 35:20-26.
22. Reynoso E, Mohar A, Sánchez P, Sobrevilla P y Verástegui E. Prevalencia de seropositividad a citomegalovirus en pacientes con neoplasias hematológicas. *Cancerología* 1992; 38:1695-1699.
23. Medzhitov R and Janeway ChA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Op Immunol* 1997; 9:4-9.
24. Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y and Shaw S. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today* 1992; 13:106-112.
25. Van Snick J. Interleukin 6: An overview. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:253-278.
26. Sen GC and Lengyel P. The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry. *J Biol Chem* 1992; 267:5017-5020.
27. Reguciro JR y López LC. *Inmunología: biología y patología del sistema inmune*. España: Médica Panamericana, 1996:109-114.
28. Biron ChA. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Op Immunol* 1997; 9:24-34.
29. Reyburn H, Mendelboim O, Valés GM, Sheu EG, Pazmany L, Davis DM and Strominger JL. Human NK cells: their ligands, receptors and functions. *Immunol Rev* 1997; 155:119-125.
30. Timonen T. Natural killer cells: endothelial interactions, migration, and target cell recognition. *J Leukoc Biol* 1997; 62:693-701
31. Abbas AK, Lichtman AH, and Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia:W.B. Saunders Company, 1991:367-8.
32. Heemels M-T and Ploegh H. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:463-491.
33. Neefjes J. Antigen processing and presentation. *Res Immunol* 1995; 146:397-399.
34. Chapman HA. Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr Op Immunol* 1998; 10:93-102.
35. Pieters J. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr Op Immunol* 1997; 9:89-96.
36. Rusell SW and Gordon S. Macrophage biology an activation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 181.
37. Satgno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, Veren DA, Page F and Alford CA. Primary cytomegalovirus infection inpregnancy: incidence, transmission to fetus and clinical outcome. *JAMA* 1986; 256:1904-1908.

38. Rasmussen L. Immune response to human cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 154:221-254.
39. Borysiewicz LK, Hickling JK, Graham S, Sinclair J, Cranage MP, Smith GL and Sissons JG. Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T-cells. relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Exp Med* 1988; 168:919-931.
40. Laubscher A, Bluestein HG, Spector SA, and Zvaifler NJ. Generation of human cytomegalovirus-specific cytotoxic T-lymphocytes in a short-term culture. *J Immunol Methods* 1988; 110:69-77.
41. Davignon JL, Clément D, Alriquet J, Michelson S, and Davrinche C. Analysis of the proliferative T cell response to human cytomegalovirus major immediate-early protein (IE1): phenotype, frequency and variability. *Scand J Immunol* 1995; 41:247-255.
42. Grundy JE, McKeating JA and Griffiths PD. Cytomegalovirus strain AD169 binds β 2-microglobulin *in vitro* after release from cells. *J Gen Virol* 1987; 68:777-7684.
43. McKeating JA, Griffith PD, Grundy JE. Cytomegalovirus in murine specimens has host β -2 microglobulin bound to the viral envelope: a mechanism of evading the host immune response?. *J Gen Virol* 1987; 68:785-792.
44. Keller R, Peitchel R, Goldman JN and Goldman M. An IgG-Fc receptor induced in cytomegalovirus-infected human fibroblasts. *J Immunol* 1976; 116:772-777.
45. Rahman AA, Teschner M, Sethi KK and Brandis H. Appearance of IgG (Fc) receptor(s) on cultured human fibroblasts infected with human cytomegalovirus. *J Immunol* 1976; 117:253-258.
46. Rodgers BC, Scott DM, Munding J and Sissons JGP. Monocyte-derived inhibitor of interleukin 1 induced by human cytomegalovirus. *J Virol*. 1985; 55:527-532.
47. Michelson S, Alcamí J, Danielpour D, Bachelier F, Picard L, Bessia C, and Virelizier J. Human cytomegalovirus infection induces transcription and secretion of transforming growth factor β 1. *J Virol* 1994; 68:5730-5737.
48. Kapasi K, and Rice GPA. Cytomegalovirus infection of peripheral blood mononuclear cells: effects on interleukin-1 and -2 production and responsiveness. *J Virol* 1988; 62:3603-3607.
49. Gao JL, and Murphy P. Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a β chemokine receptor. *J Biol Chem* 1994; 269:28539-28542.
50. Ito M, Watanabe M, Ihara T, Kamiya H, and Sakurai M. Fas antigen and bcl-2 expression on lymphocytes cultured with cytomegalovirus and varicella-zoster virus antigen. *Cellular Immunol* 1995; 160:173-177.
51. Reyburn HT, Mandelboim O, Valés-Gómez M, Davis DM, Pazmany L and Strominger JL. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 1997; 386:514-516.
52. Spiller OB, Morgan BP, Tufaro F and Devine DV. Altered expression of host-encoded complement regulators of human cytomegalovirus-infected cells. *Eur J Immunol* 1996; 26:1532-1538.
53. Jones TR and Sun L. Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol* 1997; 71:2970-2979.
54. Wiertz EJHJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ and Ploegh HL. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 1996; 84:769-779.

55. Wiertz EJHJ, Tortorella D, Bogyo M, Yu J, Mothes W, Jones TR, Rapoport TA and Ploegh HL. Sec61-mediated transfer of a membran protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 1996; 384:432-438.
56. Ahn K, Angulo A, Ghazal P, Peterson PA, Yang Y and Fröh K. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Immunology* 1996; 93:10990-10995.
57. Jones TR, Wiertz EJHJ, Sun L, Fish KN and Nelson JA. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:11327-11333.
58. Hengel H, Koopmann JO, Flohr T, Muranyi W, Goulmy E, Hammerlig GJ, Koszinowski UH and Momburg F. A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity* 1997; 6:623-632.
59. Ploegh HL. Viral strategies of immune evasion. *Science* 1998; 280:248-253.
60. Sedmak DD, Guglielmo AM, Knight DA, Birmingham DJ, Huang EH and Ealdman WJ. Cytomegalovirus inhibits major histocompatibility class II expression on infected endothelial cells. *Am J Pathol* 1994; 144:683-692.
61. Knight DA, Waldman WJ and Sedmak DD. Human cytomegalovirus does not induce human leukocyte antigen class II expression on arterial endothelial cells. *Transplantation* 1997; 63:1366-1369.
62. Christine L, Bautista NG and Sedmak DD. Cytomegalovirus infection is associated with absence of alveolar epithelial cells. HLA class II antigen expression. *J Infect Dis* 1995; 171:39-44.
63. Heise MK, Pollock JL, O'Guin A, Barkon ML, Bromley Sh and Virgin IV HW. Murine cytomegalovirus infection inhibits IFN γ -induced MHC class II expression on macrophages: the role of type I interferon. *Virology* 1998; 241:331-344.
64. Heise MK, Connick M and Virgin IV HW. Murine cytomegalovirus inhibits interferon γ -induced antigen presentation to CD4 T cells by macrophages via regulation of expression of major histocompatibility complex class II-associated genes. *J Exp Med* 1998; 187:1037-1046.
65. Miller DM, Rahill BM, Boss JM, Lairmore MD, Durbin JE, Waldman WJ and Sedmak DD. Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J Exp Med* 1998; 187:675-683.
66. Wold WSM, Tollefson AE, and Hermiston TW. E3 transcription unit of adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1995; 199:237-273.
67. York IA, Roop C, Andrews DW, Riddell SR, Graham FL, and Johnson DC. A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8⁺ T lymphocytes. *Cell* 1994; 77:525-535.
68. Blumber PM. Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* 1988; 48:1-8.
69. Knowles DM, Hoffman T, Ferrarini M, and Kunkel HG. The demonstration of acid α -naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: usefulness as a T-cell marker. *Cell Immunol* 1978; 35:112-123.
70. Roitt IM and Delves PJ. *Encyclopedia of immunology*. London:Academic Press, 1992:vol.2:544.
71. Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS and Britigan BE. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J* 1995; 9:200.

72. Öberg F, Johan B and Nilsson K. Functional antagonism between vitamin D₃ and retinoic acid in the regulation of CD14 and CD23 expression during monocytic differentiation of U-937 cells. *J Immunol* 1993; 150:3487-3495.
73. Ziegler-Heitbrock HWL, and Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 1993; 14:121-125.
74. Rice GPA, Schrier RD, Oldstone MBA. Cytomegalovirus infects human lymphocytes and monocytes: virion expression is restricted to immediate-early gene products. *Proc Nat Acad Sci* 1984; 81:6134-6138.
75. Einhorn L, Ost A. Cytomegalovirus infection of human blood cells. *J Infect Dis* 1984; 149:207-214.
76. Lathey JL, Spector SA. Unrestricted replication of human cytomegalovirus in hydrocortisone-treated macrophages. *J Virol* 1991; 65:6371-6375.
77. Weinshenker BG, Wilton S and Rice GPA. Phorbol ester-induced differentiation permits productive human cytomegalovirus infection in a monocytic cell line. *J Immunol* 1988; 140:1625-1631.
78. Gonczol E, Andrews PW, Plotkin SA. Cytomegalovirus replicates in differentiated cells but not in undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Science* 1984; 224:159-161.
79. Shelbourn SL, Kothari SK, Sissons JGP, Sinclair JH. Repression of human cytomegalovirus gene expression associated with a novel immediate-early regulatory region binding factor. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:9165-9171.
80. Liu R, Baillie JE, Sissons JGP, Sinclair JH. The transcription factor YY-1 binds to negative regulatory elements in the HCMV major immediate early promoter/enhancer and mediates repression in non-permissive cells. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:2435-2459.