

11661



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

Detección del citomegalovirus mediante la técnica de  
reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en pacientes  
con afecciones hematológicas, tratados con trasplante de  
células progenitoras hematopoyéticas.

T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS  
(AREA MICROBIOLOGICA)  
P R E S E N T A :  
QFB. IDALIA CARMEN AVILA MIYAZAWA

DIRECTORES:

DRA. GABRIELA BARCENAS MORALES  
DR. ALEJANDRO ROSAS CABRAL



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

**Detección del citomegalovirus mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en pacientes con afecciones hematológicas, tratados con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.**

**TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS  
(ÁREA MICROBIOLÓGICA)  
PRESENTA  
QFB. IDALIA CARMEN AVILA MIYAZAWA**

**DIRECTORES:  
DRA. GABRIELA BARCENAS MORALES  
DR. ALEJANDRO ROSAS CABRAL**

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al programa de Maestría en Microbiología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Al Laboratorio de Inmunología de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por todas las facilidades otorgadas para realizar la parte experimental del presente trabajo.

Al Departamento de Hematología del Centro Médico Nacional La Raza IMSS, por la proporción de las muestras biológicas de los pacientes considerados en el presente estudio y de la información clínica proporcionada de los mismos.

Al Honorable Jurado Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo, Dr. Alvaro Aguilar Setién, Dr. Alfredo Sahagún Ruiz, Dr. Alejandro Rosas Cabral y Dra. Gabriela Barcenás Morales, por su disposición prestada en la revisión y por sus aportaciones en este trabajo.

A la Dra. Gabriela Barcenás Morales, un agradecimiento especial, por su amistad, por la orientación y consejos brindados para el trabajo de tesis y por compartir sus conocimientos y su experiencia.

Al Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo, por su gran apoyo, observaciones y sugerencias a lo largo del desarrollo del proyecto asociado a la presente tesis.

Al Dr. Alejandro Rosas Cabral, por su apoyo y guía en el desarrollo del presente trabajo.

## DEDICATORIAS

Especialmente a Jaime Sanabria, mi esposo y gran ser humano, por su apoyo de todos los días en mi vida

A mis padres Samuel y Josefina, por todo el amor que me brindaron y por todas las enseñanzas que me dejaron

A mis hermanos Alma, Samuel, Elsa, Edgar, Paty, Mercedes, Oscar, Myrna, Mony y Alfredo, por brindarme su bondad y buena disposición todo el tiempo

A mis cuñados, cuñadas y sobrinos por su cariño, confianza y respeto

A Marus por su apoyo y amistad

# INDICE

	Hoja
I. LISTA DE ABREVIATURAS .....	I
II. INDICE DE TABLAS .....	III
III. INDICE DE FIGURAS .....	IV
IV. RESUMEN .....	V
V. SUMMARY .....	VII
1.0. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Leucemias y otras afecciones hematológicas.....	1
1.1.1. Epidemiología.....	1
1.1.2. Etiología.....	2
1.1.3. Leucemias Agudas (LA).....	3
1.1.4. Leucemias crónicas (LC).....	4
1.1.5. Anemia aplásica (AA).....	5
1.1.6. Mieloma múltiple (MM).....	7
1.2. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.....	7
1.2.1. Obtención de células progenitoras hematopoyéticas.....	10
1.2.2. Complicaciones e infecciones del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.....	11
1.2.2.1. Enfermedad de injerto contra huésped (EICH).....	12
1.2.2.2. Complicaciones infecciosas.....	12
1.3. Citomegalovirus humano.....	13
1.3.1. Historia.....	13
1.3.2. Generalidades.....	14
1.3.3. Características del virus.....	14
1.3.3.1. Genoma viral.....	16
1.3.3.2. Replicación.....	17
1.3.4. Epidemiología.....	19
1.3.5. Patogenia.....	21
1.3.6. Persistencia y latencia.....	22

1.3.7. Aspectos inmunológicos.....	23
1.3.8. Transmisión y período de incubación.....	25
1.3.9. Diagnóstico.....	26
1.3.10. Tratamiento.....	29
1.3.11. Prevención.....	31
2.0. JUSTIFICACIÓN .....	32
3.0 HIPÓTESIS .....	34
4.0. OBJETIVOS.....	35
4.1. Objetivo General.....	35
4.2. Objetivos Particulares.....	35
5.0. METODOLOGÍA.....	36
5.1. Pacientes y diseño del estudio.....	36
5.2. Colección y tratamiento de las muestras clínicas.....	38
5.3. Extracción, detección y cuantificación de ADN a partir de muestras y de controles.....	38
5.4. Cultivo del Citomegalovirus humano <i>in vitro</i> y extracción del ADN.....	40
5.5. Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	42
5.6. Electroforesis en gel de agarosa.....	44
6.0. RESULTADOS.....	46
6.1. Pacientes y diseño del estudio.....	46
6.2. Colección y tratamiento de muestras clínicas.....	46
6.3. Extracción, detección y cuantificación de ADN a partir de las muestras de los pacientes.....	48
6.4. Cultivo del Citomegalovirus <i>in vitro</i> , extracción y cuantificación del ADN.....	51
6.5. Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)....	51
7.0. DISCUSIÓN.....	64
8.0. CONCLUSIONES.....	71
9.0. APÉNDICE.....	73
10.0. BIBLIOGRAFÍA.....	75

## I. LISTA DE ABREVIATURAS

AA = Anemia aplásica.

AAS = Síndrome anemia aplástica.

ADN = Ácido desoxirribonucleico.

CMN = Células mononucleares.

CMV = Citomegalovirus.

CMVH = Citomegalovirus Humano.

CPH = Células progenitoras hematopoyéticas.

E; Beta = Fase temprana de la replicación viral.

E de H = Enfermedad de Hodgkin.

EICH = Enfermedad de injerto contra el huésped.

ENC = Eritrocitos normales de carnero.

FA = Anticuerpos fluorescentes.

GAL = Globulina Anti Linfocito.

GAT = Globulina Anti Timocito.

G-CSF = Factor estimulante de colonias de granulocitos.

GM-CSF = Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

HLA = Human leukocyte antigen (designación genética para el MHC humano).

HPN = Hemoglobinuria paroxística nocturna.

ICM = Inclusión citomegálica.

IE = Inmediata-temprana.

I.V.= Intravenoso.

kbp = Pares de kilobases.

Kd = Kilodaltons.

LA = Leucemias agudas.

LC = Leucemias crónicas.

LCP = Células peludas o tricoleucemia.

LCR= Líquido cefaloraquídeo.

LGC = Leucemia granulocítica crónica.

LLA = Leucemia linfoblástica aguda.

LLC = Leucemia linfocítica crónica.

LMA = Leucemia mieloblástica aguda.  
LMC = Leucemia mielógena crónica.  
LNH = Linfoma no Hodgkin.  
L, gamma = Tardía.  
MHC = Complejo principal de histocompatibilidad.  
MIC = Clasificación morfológica, inmunológica y citogenética.  
MM = Mieloma múltiple.  
mm = milímetro.  
MO = Médula ósea.  
NK = Natural killer.  
nm = nanómetro.  
OKT4 = T helper.  
OKT8 = T supresoras.  
PBMC = Células mononucleares de sangre periférica.  
PBS = Solución buffer de fosfatos.  
PCR = Reacción en cadena de la polimerasa.  
RNA = Ácido ribonucleico.  
SMD = Síndromes mielodisplásicos.  
SNC = Sistema nervioso central.  
TACH = Trasplante alogénico de células hematopoyéticas.  
TCID<sub>50</sub> por gramo de tejido= 50% de dosis infectiva en cultivo celular.  
TCPH = Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.  
TK = Mutantes deficientes de timidincinasa.  
TMO = Trasplante de médula ósea.  
VZV = Virus Varicela Zoster.  
g/dL= gramos / decilitro.  
µl = microlitro.  
µg/ml = microgramos / mililitro.  
mg/kg = miligramos / kilogramo.  
g/ml = gramos / mililitro.

## II. INDICE DE TABLAS

1. Características clínicas de los pacientes.....	36
2. Calendarización de recolección de muestras sanguíneas.....	37
3. Registro de recolección de muestras sanguíneas por cada día del procedimiento del TCPH.....	37
4. Oligonucleótidos a emplear para la amplificación de ADN del CMVH y de la $\beta$ -actina como control interno.....	42
5. Condiciones estándares de volúmenes y concentraciones de cada uno de los reactivos para los iniciadores de C-D y los iniciadores de $\beta$ -actina.....	44
6. Concentración y pureza de ADN a partir de mononucleares y células leucocitarias de cada muestra sanguínea.....	49
7. Resultados de la PCR para iniciadores de C-D en las muestras sanguíneas.....	62

### III. INDICE DE FIGURAS

1. Arreglo estructural del genoma del Citomegalovirus humano.....	17
2. Conteo de leucocitos de pacientes trasplantados en los diferentes días del procedimiento.....	47
3. Comparación de la detección de ADN a partir de muestras sanguíneas de pacientes por electroforesis en gel de agarosa.....	48
4. Titulación de MgCl <sub>2</sub> en el sistema de iniciadores C-D.....	525.
Titulación de MgCl <sub>2</sub> en el sistema de iniciadores de β actina.....	53
6. PCR con y sin precalentamiento en el sistema de iniciadores de β actina.....	54
7. Corrimiento de la PCR con los iniciadores C-D, con precalentamiento y sin precalentamiento.....	55
8. Corrimiento de la PCR con los iniciadores de β actina, con diferentes cantidades de ADN plantilla.....	56
9 A. Corrimiento de la PCR con los iniciadores de C-D, con diferentes cantidades del ADN plantilla de controles y de muestras de pacientes.....	57
9 B. Corrimiento de la PCR con los iniciadores de C-D, con diferentes cantidades del ADN del control positivo.....	58
10. PCR con diferentes cantidades de ADN de mononucleares y de células leucocitarias.....	59
11. Corrimiento de la técnica de PCR para los iniciadores C-D en las muestras de pacientes.....	60
12. Corrimiento de la técnica de PCR para los iniciadores C-D en las muestras de pacientes.....	61

## IV. RESUMEN

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) ha sido una importante herramienta terapéutica en diversas enfermedades neoplásicas y no neoplásicas. Los agentes infecciosos que más a menudo causan complicaciones serias después de este procedimiento son el Citomegalovirus humano (CMVH) y *Aspergillus spp.*

El CMVH se caracteriza por estar presente en el organismo en latencia; por lo tanto, resulta importante detectar por el laboratorio la reactivación para aplicar la terapia adecuada.

Algunos de los métodos de diagnóstico para la detección del CMVH son: aislamiento del virus en cultivo celular, inmunofluorescencia y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este último, es importante para el diagnóstico por su elevada sensibilidad, sin embargo, el diseño de oligonucleótidos que permitan identificar al CMVH en un estado activo sigue considerándose un problema.

Por ende, en el presente trabajo se desarrolló e implementó la técnica de PCR como una prueba de diagnóstico rutinario para la detección de un segmento específico del genoma del CMVH, realizando un estudio de campo clínico en pacientes con afecciones hematológicas tratados con TCPH.

Se identificaron casos clínicos de individuos que fueron sometidos a un tratamiento de TCPH, recolectándose muestras sanguíneas para la obtención de leucocitos y células mononucleares, que se utilizaron para la extracción de ADN y la aplicación de la técnica de PCR empleando el par de iniciadores C-D (UL123) que amplifican una región localizada en el cuarto exón del gen IE 1 del fragmento J en la región Eco RI del CMVH.

La PCR se utilizó a lo largo del seguimiento de los pacientes, en muestras colectadas previas al TCPH, en las fechas del trasplante (día cero) y del post-trasplante (aproximadamente a los 7, 14, 21, 28, 60 y 100 días).

Se cuantificaron los leucocitos en las muestras, obteniéndose un comportamiento acorde a lo esperado, dado que en promedio tuvieron un conteo inicial superior a los encontrados después de realizado el TCPH, que evidencia el efecto de haber sido sometidos a inmunosupresión; para posteriormente ir elevando sus niveles a lo largo de los diferentes días post-trasplante.

La muestra biológica del paciente es importante para la identificación del virus por técnica de PCR, por lo que se obtuvieron células mononucleares y células leucocitarias de los pacientes estudiados, considerándose más conveniente el uso de éstas últimas como fuente de ADN.

Fue necesario el contar con el cultivo de fibroblastos de pulmón de embrión humano (MRC-5), como línea celular para la replicación del CMVH y como control negativo en la técnica de la PCR. El tiempo para alcanzar una monocapa confluyente fue de 6 a 8 días. Las células fueron infectadas con el virus *in vitro* (MRC-5/CMVH), como control positivo, resultando necesario un periodo de 12 a 15 días para su replicación significativa. Cultivos celulares infectados y no infectados fueron criopreservados para futuras investigaciones.

Se establecieron las condiciones de trabajo para la técnica de PCR aplicada a la detección del ADN de CMVH empleando el par de iniciadores C-D e iniciadores de  $\beta$ -actina (control interno del sistema de la PCR), resultando que la concentración óptima de trabajo de cloruro de magnesio fue 10mM; otra condición en el uso de éstos iniciadores es que no se requiere un paso inicial de precalentamiento, paso indispensable para los iniciadores de  $\beta$ -actina.

Tanto en los pacientes y en los controles, la cantidad óptima de ADN blanco en la PCR fue de 0.5 a 1  $\mu$ g para los iniciadores C-D, mientras que para los iniciadores de  $\beta$ -actina,

fue de 0.5  $\mu\text{g}$ .

La detección del producto específico para  $\beta$ -actina fue positiva para todas las muestras de los pacientes (excepto en las muestras 3-5 A y 6-6A). En tanto que no se detectó el ADN de CMVH por medio de la técnica de PCR con los iniciadores C-D en las 51 muestras recolectadas de los 11 pacientes analizados en el presente estudio, implicando la ausencia de infección en las diferentes etapas del pre- y post-trasplante. Estos resultados coinciden con la información médica respecto a los pacientes, los cuales no presentaron manifestaciones clínicas de la infección por CMVH.

El desarrollo e implementación de la técnica de la PCR para identificar al CMVH en pacientes trasplantados es una valiosa aportación para permitir un adecuado tratamiento temprano para el control de la infección, sin embargo el tamaño de la muestra de pacientes resultó ser muy pequeño y por lo tanto insuficiente para detectar la incidencia del CMVH durante el periodo de realización del presente trabajo.

Antes de implementar la técnica de PCR para el diagnóstico de CMVH en pacientes con afecciones hematológicas tratados con TCPH en el Centro Médico La Raza, IMSS, es conveniente continuar con un estudio de campo clínico que incluya un número mayor de muestras de pacientes. Esto permitirá determinar con mayor exactitud la eficiencia del sistema, así mismo se recomienda incluir otros pares de iniciadores específicos para CMVH y llevar a cabo la correlación de los resultados de la PCR con los métodos serológicos, microbiológicos tradicionales y con la manifestación clínica de la infección en los pacientes.

## V. SUMMARY

The transplantation of hematopoietic precursor cells (THPC) is an important therapeutic tool in the treatment of a variety of neoplastic and non-neoplastic diseases. Pathogens, which cause most frequently complications are human Cytomegalovirus (HCMV) and *Aspergillus spp.*

HCMV may persist in a latent inactive state and it is therefore important for the diagnostic laboratory to detect its reactivation in order to permit adequate therapy.

Some of the diagnostic methods for detection of HCMV include *in vitro* cultivation and isolation, immunofluorescence, and polymerase chain reaction (PCR). The latter is because of its high sensitivity of specific diagnostic importance. However the design of specific primers, which allow the identification of activated HCMV is difficult.

Therefore, the aim of this study was to develop and to implement a PCR-based routine diagnostic test for the detection of a specific genomic segment of HCMV in a clinical cohort of patients with haematological diseases, treated by THPC.

Peripheral blood samples were taken from individuals, who underwent THPC. Leucocytes and mononuclear cells were isolated and used for DNA extraction. PCR was performed using the primer pair C-D (UL123) which amplify a region of the fourth exon of the IE 1 gene within the J fragment of the Eco RI region of HCMV.

PCR was performed on samples prior to and on the day of transplantation (day zero) and post transplantation on the days 7, 14, 21, 28, 60 and 100.

The leucocytes were quantified in the samples. Numbers varied according to the medical condition of the patients and were as expected for patients undergoing THPC with immunosuppression, with a subsequent rise in numbers post-transplantation.

The nature of the patient's sample is important for the virus identification by the PCR technique. We obtained mononuclear cells and leucocytes from the patients. The leucocytes were the better source for DNA extraction.

A human embryonal pulmonary fibroblast line (MRC-5) was used to cultivate HCMV and also served as a negative control in the PCR analysis. The line formed a confluent monolayer within 6 to 8 days. The cells were then infected (MRC-5/HCMV) and could serve as positive control after further of 12-15 days. Infected and non-infected cultures were cryopreserved for further investigations.

PCR conditions for the detection of HCMV using the C-D primers were established. Amplification of  $\beta$ -actin was used as an internal control of the PCR reaction. The optimal magnesium chloride concentration was found to be 10mM; the PCR reaction does not need an initial preheating step, essential step for the primers belong to the  $\beta$ -actin.

In both, patients and controls, the optimal amounts of template DNA in the PCR using the C-D primers were found to be between 0.5 and 1  $\mu$ g, and 0.5  $\mu$ g in case of the of  $\beta$ -actin specific PCR.

A positive  $\beta$ -actin PCR signal was obtained for all patient samples (except sample 3-5A and 6-6A). HCMV specific DNA was not detected in any of the 51 samples, which had been collected from 11 patients, thus indicating absence of pre- and post transplantational infections. These results are in agreement with the medical history of these patients, who did not show any clinical signs of HCMV infection.

The development and diagnostic implementation of the PCR technique for the detection of HCMV in transplant patients is a valuable contribution, which allows adequate management and treatment to control infection. However, considering the incidence of HCMV infection, the number of investigated patients was small, which explains that no HCMV-positive samples were identified.

Before implementing the PCR technique into the HCMV diagnostic on patients with hematologic disorders treated with TCPH in the Centro Médico La Raza, IMSS, it is important to extend this clinical study on a larger number of patient samples. This would allow to determine the efficiency of the system with greater accuracy. Further pairs of HCMV-specific primers should be included to improve the correlation of the PCR results with the traditional serologic and microbiologic methods, and the clinical manifestation of the patients infection.

## 1.0. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Leucemias y otras afecciones hematológicas.

En 1845, a John Bennet y Rudolf Virchow por sus observaciones en pacientes con leucemia se les acredita con la definición de la leucemia y su significado como una entidad patológica. Describieron síntomas de debilidad creciente, aumento del perímetro del abdomen y hemorragias nasales intensas. En la autopsia, encontraron el bazo agrandado y un aspecto peculiar en la consistencia y color de la sangre. Virchow, describió el color excepcionalmente blanco de la sangre con el nombre de sangre blanca, este se tradujo al griego convirtiéndose en " *leuce zmia* ". También observó que no todas las leucemias se acompañaban con un aumento del mismo tipo de célula blanca. Estas diferencias se asocian a la clasificación actual entre leucemias mieloides y linfoides, verificándose con la tinción que Erlich introdujo para diferenciar a las células sanguíneas. En 1889, Ebstein sugirió una clasificación adicional porque un tipo era de un pronóstico malo y no respondía al tratamiento denominándola leucemia aguda y el segundo tipo se llamó leucemia crónica debido a que el paciente podía aliviarse temporalmente de los síntomas (McKenzie, 2000).

Actualmente se describe a la leucemia como una forma de cáncer que inicia en las células progenitoras hematopoyéticas en médula ósea. Su proliferación descontrolada, el desplazamiento de los precursores medulares normales y la posible invasión del resto de los órganos de la economía son los mecanismos principalmente responsables de los efectos devastadores de la enfermedad. Hay más de una docena de variedades de leucemia, pero los siguientes cuatro tipos son los más comunes: leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloblástica aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC) y leucemia mielógena crónica (LMC), también llamada Leucemia granulocítica crónica (LGC) (Ruiz, 1998).

#### 1.1.1. Epidemiología.

En general, la leucemia tiene una incidencia 10 veces mayor en adultos que en niños. En un trabajo de la Sociedad Americana de Cáncer se reporta que de aproximadamente 30,200 nuevos casos de leucemia, 27,900 fueron adultos y 2,300 niños en 1999, siendo la LMA la más

frecuente en adultos; además, alrededor del 41% de los casos totales referidos fueron leucemias crónicas, con un estimado de 25.8% de LLC y 14.9% de LMC (Ruiz, 1998).

La edad predominante de cada leucemia es diferente, la LLA en general se presenta como una enfermedad pediátrica, usualmente en niños menores de 10 años; en tanto que la LMA es la forma adulta más común; la LMC se presenta en pacientes que están entre los 40 y 50 años de edad y finalmente la LLC se presenta en individuos de alrededor de 70 años. Además, en general, la leucemia afecta más a hombres que a mujeres en todo el mundo (Ruiz, 1998).

### 1.1.2. Etiología.

Se ha reportado que la exposición a ciertas sustancias químicas y a la radiación puede inducir cáncer en el ser humano. Sin embargo, los mecanismos patógenos de malignidad han permanecido oscuros.

En 1976, Bishop y Varmus descubrieron que las células normales contenían genes capaces de causar cáncer si se alteran o se activan. Estos se conocen como oncogenes, mientras que las contrapartes celulares normales no alteradas de los oncogenes se conocen como protooncogenes, los cuales se pueden activar como consecuencia de mutación o arreglo de genes; con ello altera la expresión del gen, la actividad o la estructura de su producto proteínico. Hasta la fecha se han identificado más de 60 protooncogenes (*SRS, ABL, SIS, ERB, RAS*, entre otros). Los protooncogenes dirigen el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular al codificar proteínas implicadas en cada nivel de la regulación del crecimiento; sin embargo, cuando se alteran estos genes tienen la capacidad de inducir y mantener la transformación celular (McKenzie, 2000).

En base a estudios realizados en animales de laboratorio se han sugerido cinco factores que desempeñan una función causal de leucemia:

- 1) Susceptibilidad genética, existe evidencia de que factores hereditarios y material genético anormal (extra cromosomas de tinción homogénea, translocaciones, inversiones y anormalidades cariotípicas) pueden estar relacionados con el desarrollo de leucemia. Cada acontecimiento genético puede activar potencialmente protooncogenes.

- 2) Mutación somática, es un cambio adquirido en el material genético de células distintas a las que están implicadas en la reproducción. Con el descubrimiento de los protooncogenes, es probable que las mutaciones en el cromosoma cercano a éstos puedan predisponer a leucemia.

Esto ayuda a explicar la función desempeñada por la radiación y las toxinas químicas en la leucemia aguda, causando mutaciones cromosómicas.

3) Infección viral, se ha comprobado que los retrovirus son causantes de leucemia en animales de laboratorio, pero no hay evidencia definitiva en humanos. Los retrovirus contienen una transcriptasa inversa que les permite producir una copia de ácido desoxirribonucleico (ADN) de la porción central de ácido ribonucleico (ARN) viral, el ADN entonces puede copiarse para producir más porciones centrales virales, o puede incorporarse en el ADN nuclear de la célula huésped. No es clara la manera en que los virus inducen leucemia, pero se sospecha que la incorporación del genoma viral al ADN del huésped puede activar los protooncogenes.

4) Inmunitarios, se ha observado una incidencia creciente de leucemia linfocítica en trastornos inmunitarios tanto congénitos como adquiridos, también existe un vínculo entre el tratamiento prolongado de pacientes con inmunosupresores. Quizá una alteración en el sistema de auto vigilancia inmunitaria mediada por células, o la producción deficiente de anticuerpos contra antígenos extraños, o ambas, conducen a la supervivencia de células neoplásicas.

5) Ciertas enfermedades hematológicas que pueden constituir un riesgo para el desarrollo de leucemia que puede vincularse con el tratamiento usado para la enfermedad primaria.

Ningún factor único es responsable de la leucemia sino por una diversidad de factores etiológicos que incluyen factores genéticos y exposición ambiental. La causa varía de un paciente a otro y es posible que algunos individuos sean más susceptibles que otros a la activación de los oncogenes (McKenzie, 2000).

### **1.1.3. Leucemias Agudas (LA).**

Siendo un grupo heterogéneo de padecimientos que suponen la proliferación desordenada de una clona de células hematopoyéticas, la falla de los mecanismos de control negativo del crecimiento clonal mutante casi siempre se debe a cambios en los genes reguladores, lo que conduce a sobreproducción sin sentido de células incapaces de madurar y funcionar normalmente. Un término más adecuado que el de LA sería el de leucemia de "blastos", dado que en éstos trastornos el tipo predominante de célula maligna proliferante es una célula inmadura poco diferenciada conocida como blasto. Existe la subdivisión de leucemia linfoblástica aguda (LLA) y la leucemia mieloblástica aguda (LMA), dependiendo de la célula maligna que predomine, el linfoblasto o el mieloblasto, respectivamente; y las dos modalidades

más importantes que se utilizan para diferenciar LMA de LLA son el examen morfológico y la citoquímica (Ruiz, 1998).

El criterio para diferenciar a las LA, es la clasificación morfológica, inmunológica y citogenética (MIC) (Wood, 1999; Taylor, *et al.*, 1996).

#### **1.1.4. Leucemias crónicas (LC).**

Se caracterizan por su curso indolente, larga evolución y por ausencia de células muy indiferenciadas lo que las distinguen de las LA. Las LC de importancia en México son tres, linfocítica (LLC), mielocítica (LMC) y de células peludas o tricoleucemia (LCP) (Enright, 1997).

La LMC es uno de los síndromes mieloproliferativos, que se caracteriza por una expansión clonal de células progenitoras hematopoyéticas. De manera característica, hay leucocitosis con incremento de granulocitos y basófilos, pero también llegan a aumentar las cifras de eritrocitos y plaquetas. Con frecuencia, la LMC progresa a una crisis de blastos que resulta mortal. En más del 90% de los pacientes se encuentra el cromosoma Filadelfia, que resulta de la translocación balanceada entre los cromosomas 9 y 22 (Enright, 1997).

En forma general, el tratamiento de los tipos de leucemias descritas anteriormente se basa en la quimioterapia, que tiene como objetivo erradicar todas las células malignas dentro de la médula ósea para permitir la repoblación con precursores hematopoyéticos normales. La desventaja de este tratamiento es que los fármacos usados no son específicos para las células leucémicas, por lo que también se destruyen muchas células normales. Los fármacos que se usan para tratar la leucemia se incluyen en los siguientes grupos: antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos, alcaloides de la vinca y medicamentos misceláneos. Los primeros son antagonistas de las purinas o de las pirimidinas los cuales actúan inhibiendo la síntesis del ADN; ejemplos de ellos son: arabinósido de citosina, 5- azacitidina, 6- tioguanina, metotrexato, 6- mercaptopurina. Estos fármacos matan a las células en ciclo celular y afectan a cualquier célula en rápida división, como sucede con las células que recubren el intestino, las del epitelio germinal de los folículos pilosos y las células hematopoyéticas normales, causando respectivamente complicaciones gastrointestinales, pérdida de pelo y citopenias; éstas últimas pueden poner en peligro la vida.

Los segundos (compuestos químicos que tienen grupos alquilo) no son específicos para células en división, pero matan a las células tanto en reposo como proliferantes. El fármaco se enlaza

con moléculas del ADN para interferir con su síntesis, sus efectos adversos incluyen mielosupresión, estomatitis, náusea y vómito; ejemplos son la ciclofosfamida y el busulfán.

Los terceros (antibióticos) se enlazan con moléculas tanto de ADN como de ARN e interfieren con la división celular, como ejemplos de éstos últimos están la daunorrubicina, la doxorrubicina y la daimpríbocina. Los efectos tóxicos son similares a los de los agentes alquilantes.

El cuarto grupo está constituido por alcaloides de la vinca, como la vincristina y la vinblastina; los que son inhibidores de la mitosis.

El quinto grupo, incluye los corticosteroides, interferones, L-asparaginasa, entre otros.

Varias combinaciones de fármacos son más eficaces que la administración de uno sólo (McKenzie, 2000; Ruiz, 1998).

#### **1.1.5. Anemia aplásica (AA).**

Entre las afecciones hematológicas no neoplásicas una de las más importantes es la AA, que se caracteriza por pancitopenia debida a aplasia de la médula ósea. Los sujetos con el padecimiento grave no tienen células precursoras hematopoyéticas presentes en su médula ósea. Su diagnóstico se establece cuando la médula ósea presenta menos del 25% de celularidad y hay una combinación de dos hallazgos en la sangre periférica: granulocitos, menores de  $0.5 \times 10^9/l$ ; plaquetas, menores de  $20 \times 10^9/l$ ; y cuenta corregida de reticulocitos, menor del 1%, con la progresión de la enfermedad las tres líneas celulares se encuentran finalmente disminuidas.

La producción de células sanguíneas en la médula ósea depende de la presencia de un número adecuado de células progenitoras funcionalmente normales, que implica tener la capacidad de proliferar y diferenciarse en sus descendientes normales. En muchos casos se piensa que la AA se debe a células progenitoras deficientes o defectuosas. Sin embargo, también puede resultar por anomalías en los factores de crecimiento, o por un microambiente defectuoso en la médula ósea.

Se puede clasificar en 2 grupos: el primero es considerado de origen adquirido, vinculado con la exposición a fármacos o sustancias químicas tóxicas (benceno, cloranfenicol, arsenicales, oro, anticonvulsivos), con radiaciones ionizantes o con agentes infecciosos; los fármacos son causantes del 30% de los casos de AA adquirida, debido al mecanismo de acción dañina a la célula progenitora. Sin embargo, los estudios recientes indican que la mayoría de los sujetos no presentan esta asociación, de manera que se clasifican como individuos con anemia aplásica

idiopática; y el segundo grupo es la anemia aplásica constitucional que es la insuficiencia crónica de la médula ósea por una disposición congénita (anemia de Fanconi, anemia aplásica familiar, disqueratosis congénita, síndrome de Shwachman-Diamond).

El inicio de los síntomas de AA es insidioso y vinculado con las citopenias. El signo inicial más común es la hemorragia de tipo petequial y retiniana; puede presentarse anemia e infección, no hay hepatoesplenomegalia ni linfadenopatía (McKenzie, 2000).

Los datos de laboratorio en sangre periférica nos revelan que la pancitopenia es un signo distintivo, aunque la intensidad puede variar, la hemoglobina suele ser inferior a 7 g/dl, los eritrocitos son normocíticos y normocrómicos, o pueden ser ligeramente macrocíticos, hay anisocitosis y poiquilocitosis de leve a moderada.

El pronóstico es adverso, con una recuperación completa en solo 10% de los casos. El 70% de los pacientes muere dentro de los cinco años posteriores al diagnóstico. Clínicamente los pacientes que se vinculan con exposición a una toxina tienen un mejor pronóstico que quienes tienen una anemia aplásica idiopática, o en quienes la AA se desarrolló durante mucho tiempo después de la exposición continua a la toxina. En general mientras más intensos sean la pancitopenia y la hipoplasia de la médula ósea, más grave es el pronóstico (McKenzie, 2000).

El primer objetivo en el tratamiento de la AA adquirida es la eliminación del agente causal, y el tratamiento de apoyo con transfusiones múltiples de eritrocitos, plaquetas y leucocitos; o puede realizarse en algunos pacientes la esplenectomía que ha reducido la necesidad de transfusiones.

El trasplante de médula ósea (TMO) se ha convertido en un procedimiento relativamente común en el tratamiento de AA, aunque el reemplazo de las células progenitoras en suficiente número tiene éxito en la mayor parte de los casos; algunos trasplantes no inducen remisión. Sugiriendo la posibilidad que el microambiente de la médula ósea del receptor no soporte crecimiento celular, o que el crecimiento de la célula progenitora esté inmunosuprimido (McKenzie, 2000).

El TMO origina remisiones prolongadas en 50 a 80 % de los individuos con AA grave, y el TMO temprano actualmente se considera el tratamiento de elección en enfermos con donador histocompatible igualado (Marsh and Gordon, 1998).

El tratamiento inmunosupresor se recomienda a pacientes que no responden a trasplante de médula ósea. La terapéutica inmunosupresora con globulina antilinfocito (GAL) o globulina antitimocito (GAT) es eficaz en algunos pacientes.

### **1.1.6. Mieloma múltiple (MM).**

Entre las afecciones hematológicas neoplásicas, distinta a las leucemias, se encuentra el MM, que se caracteriza por una proliferación maligna de células plasmáticas con forma anormal y atípica, que primariamente sucede en la médula ósea, y que presenta inmunoglobulinas anormales. Las células plasmáticas están aumentadas de tamaño con menos aglutinación de cromatina de las que se observan en las células benignas. Presentan multinúcleos centrados con proporción núcleo citoplasma grande y nucléolos notables. Su causa exacta no se conoce. El comienzo de esta enfermedad es entre los 40 y 70 años de edad; no obstante, se han reportado casos en adultos jóvenes y raramente en la infancia. La incidencia es mayor en hombres que en mujeres, incluye lesiones osteolíticas múltiples, infiltración de la médula ósea, gamapatía monoclonal e hipogamaglobulinemia generalizada con proteinuria de Bence Jones. En contraste, una persona normal sintetiza las cinco clases de inmunoglobulinas, mientras que en individuos con mieloma múltiple se produce un exceso de una sola clase, por lo tanto, se dice que el paciente tiene una gamapatía monoclonal. Son características fundamentales de la enfermedad, la presencia de eritrocitos que se disponen como "pilas de moneda" y la sedimentación eritrocitaria rápida causadas por la hiperglobulinemia. Los frotis sanguíneos teñidos con Wright muestran un fondo azul debido al exceso de proteína plasmática. Los pacientes sintomáticos se tratan con alquilantes, radioterapia y prednisona (McKenzie,2000). Otra de sus opciones terapéuticas es el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) alogénico o autólogo; siendo la infección la causa más frecuente de muerte (Brown,1993,Wood,1999).

### **1.2. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.**

El trasplante de médula ósea (TMO) se ha desarrollado en los últimos años como una importante arma terapéutica para diversas enfermedades neoplásicas y no neoplásicas. Desde los años treinta y cuarentas, en que se realizaron los primeros intentos empíricos de administración intramedular e intravenosa de médula ósea; hasta la actualidad, en donde gran cantidad de trabajos de laboratorio y clínicos han establecido bases cada vez más sólidas que permiten realizar el TMO en forma segura y eficaz. En 1969, pacientes con padecimientos como leucemia aguda y anemia aplásica fueron sometidos a TMO de gemelo univitelino, utilizando quimioterapia y radioterapia de condicionamiento, así como suero antilinfocito. Desde entonces

las indicaciones para TMO se han incrementado y abarcan enfermedades congénitas, enfermedades no malignas adquiridas, neoplasias hematológicas y tumores sólidos, con resultados variables de acuerdo a la enfermedad de que se trate y al estadio clínico en el momento del trasplante; algunas de estas enfermedades son: LMA, LLA, LMC, síndromes mielodisplásicos (SMD), AA, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), talasemias, linfoma no Hodgkin (LNH) y enfermedad de Hodgkin (E de H) (Vázquez, 1999; Thomas, *et al.*, 1972; Scharzenberg, *et al.*, 1972).

De manera tradicional se recolectan células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea, pero cada vez se obtienen de sangre periférica con mayor frecuencia. Actualmente el TMO se denomina en forma más apropiada y genérica trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH).

La transferencia de células madre de un donador a otra persona se denomina trasplante alogénico. Cuando el donador es idéntico desde el punto de vista genético (un gemelo idéntico) se llama trasplante singénico. En algunos casos se utilizan células madres del mismo paciente; la nueva aplicación de estas células constituye un trasplante autólogo (Wood, 1999).

Como se mencionó anteriormente el TCPH puede curar a pacientes con enfermedades malignas y no malignas. Las afecciones no malignas de la hematopoyesis, que incluyen AA, talasemias y trastornos de inmunodeficiencia que ponen en peligro la vida, suelen curarse mediante trasplante alogénico o singénico de células progenitoras. En principio todos los trastornos genéticos de los sistemas inmunitario y hematopoyético pueden curarse con el TCPH alogénico.

Los pacientes con enfermedades malignas también son candidatos para TCPH, que representa la única posibilidad de curación de enfermos con LMC, LLA, LMA, LNH ó E de H que recaen a pesar de la quimioterapia previa. Es el único tratamiento curativo para individuos con LLC, LMC, SMD y MM. Cada vez se aplica más el trasplante autólogo para restaurar la hematopoyesis después de la administración de dosis altas de quimioterapia o de quimio/radioterapia en tumores sólidos (Lee, *et al.*, 1997; Lemoli, *et al.*, 1998, Ringden, 1997).

El TCPH alogénico es utilizado en LLA refractaria con buenos resultados, el éxito obtenido con este tipo de trasplante en dichos pacientes ha estimulado a algunos investigadores a estudiar esta terapia en pacientes con LLA en primera remisión. Actualmente se recomiendan trasplantes alogénicos en primera remisión a pacientes con LLA de alto riesgo, especialmente a individuos que poseen el cromosoma Filadelfia basado en el pobre pronóstico que tienen éstos, en los que se ha reportado una sobre vida libre de enfermedad mayor a dos años en el 70% de los casos aproximadamente (Ruiz y San-Miguel, 1996; Vázquez, 1999).

Sólo un tercio de los pacientes con LLA cuentan con donantes relacionados; además, de que muchos de ellos son considerados de edad avanzada para recibir trasplantes alogénicos o tienen condiciones médicas que dificultan este tipo de terapia. Por lo que estos pacientes tienen el trasplante autólogo como una buena alternativa, por tener como ventaja la ausencia de la enfermedad injerto contra huésped (EICH), la cual es una causa importante de morbilidad y mortalidad asociada al trasplante alogénico. Las desventajas del trasplante autólogo incluyen la posibilidad de reinfundir células malignas y la ausencia del efecto injerto contra leucemia, este último fenómeno benéfico asociado a trasplantes alogénicos; con respecto a la primera desventaja, actualmente se investigan múltiples técnicas de purgado como intento para disminuir el número de células viables de tumor (Mossad, *et al.*, 1996).

El TMO singénico ha sido utilizado en pacientes con LLA, no existiendo diferencia en la supervivencia libre de enfermedad a tres años entre pacientes con LLA en primera remisión tratados con trasplantes alogénicos.

El TMO utilizado en LMA puede ser autólogo, alogénico o singénico, respetando sus indicaciones para las diversas fases evolutivas de la enfermedad. El TMO alogénico puede ser de donador relacionado o no relacionado, HLA totalmente compatible o con un sólo antígeno incompatible, y también puede ser de sangre de cordón umbilical de donador emparentado o no (Ruiz y San-Miguel, 1996).

En México, la LMA se trata a base de trasplante alogénico de células hematopoyéticas (TACH), en 1999 se estudiaron 46 pacientes teniendo como régimen de acondicionamiento la quimioterapia, el procedimiento se hizo en diferentes hospitales del Distrito Federal, Monterrey y Puebla. La media de supervivencia libre de enfermedad fue de 60.6 meses, y la media de supervivencia global fue de 61.3 meses. Las infecciones posteriores a TACH en LMA fue, con bacterias el 26%, *Aspergillus* 13%, Citomegalovirus 9%, Varicela-Zoster 4% y Candidiasis 2% (Vela-Ojeda, 2000)

El uso del TMO alógeno para el tratamiento de la LMC fue iniciado en 1970. Actualmente se ha establecido que su uso es la única modalidad terapéutica para curar la enfermedad, y se ha reportado que conduce al alargamiento de la sobrevida libre de enfermedad en todas las etapas de la LMC. Los pacientes en fase crónica presentan mejores resultados con sobre vida de 50 a 60% a largo plazo (Kalaycio, 2001). En México sin duda alguna, la LMC es la patología que con mayor frecuencia se trata a base de TACH, en 1999 se estudiaron 111 pacientes teniendo como régimen de acondicionamiento la quimioterapia. El procedimiento se hizo en diferentes hospitales del Distrito Federal, Monterrey y Puebla. La media de supervivencia libre de enfermedad fue de 49.7 meses, y la media de supervivencia global fue de 82.2 meses. Las

infecciones posteriores a TACH en LMC fue con bacterias el 28%, Citomegalovirus 16%, Candidiasis 9%, Aspergillus 6%, Varicela-Zoster 5% y Tuberculosis 2% (Vela-Ojeda, 2000b). El TMO autólogo con médula ósea purgada para eliminar clonas con cromosoma Filadelfia, no ha dado resultados alentadores. En la experiencia de 200 pacientes con LMC que se les ha aplicado TMO autólogo, teniendo una mediana de supervivencia de 42 meses, con mejores resultados en pacientes que se encontraban en fase crónica (Kalaycio,2001).

Los resultados de TACH en LMA y LMC obtenidos en México, son comparables a los de otros grupos de trasplantes; sin embargo, la alta incidencia de enfermedad por citomegalovirus, aspergilosis y enfermedad injerto contra huésped aguda, son importantes problemas por resolver. Es necesario contar con mejores esquemas de profilaxis y detección oportuna de estas complicaciones en nuestro país (Vela-Ojeda, 2000a,b).

Por todo lo mencionado anteriormente, la elección entre un procedimiento de TMO alogénico y el autólogo depende del tipo de enfermedad del paciente, del estado o fase de la afección, de la edad, del género, del régimen de condicionamiento, de problemas médico concomitantes y disponibilidad del donador, así como del número de células CD34 infundidas. El TMO alogénico se acompaña de mayor riesgo de complicaciones infecciosas y de EICH, en tanto que el autólogo tiene mayor riesgo de recaída de la enfermedad (Alessandrino, 2000).

Por otro lado, el éxito de un injerto está precedido por incremento de la cifra de leucocitos y aparición de neutrófilos circulantes maduros, de 2 a 4 semanas después del trasplante. Las muestras de médula ósea a las 2 y 4 semanas presentan incremento de la celularidad, y la cifra de plaquetas y reticulocitos también comienza a aumentar; en general, todas las células hematopoyéticas e inmunitarias del receptor son reemplazadas por células del donador. Al mejorar las cifras celulares de sangre periférica, se pueden discontinuar los antibióticos y ya no ser necesarias las transfusiones. Los pacientes pueden ser dados de alta cuando puedan vigilarse estrechamente como pacientes externos, al menos los primeros 100 días, después del trasplante (Stites, 1998).

### **1.2.1. Obtención de células progenitoras hematopoyéticas.**

Las CPH se obtienen de médula ósea o de sangre periférica. La médula se recolecta de la parte posterior de las crestas ilíacas del paciente o del donador mediante aspiraciones repetidas bajo anestesia general. El número de células recolectadas es de alrededor de 2 a  $4 \times 10^8$ /kg del peso corporal.

El descubrimiento de la presencia de células hematopoyéticas totipotenciales en sangre periférica en animales de experimentación y posteriormente su obtención en humanos mediante procedimientos de aféresis, permitió las primeras acciones terapéuticas en algunos pacientes con neoplasias hematológicas y tumores sólidos, con una recuperación de la cuenta plaquetaria y leucocitaria más rápida que aquellos que reciben médula ósea (Vázquez, 1999).

La movilización de CPH hacia la circulación periférica puede lograrse por medio de quimioterapia con recolección en la fase de recuperación de la médula ósea o con la administración de factores de crecimiento hematopoyéticos (citocinas), como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Las CPH circulantes se reúnen y concentran por aféresis. La capacidad de los factores estimulantes de colonias aumentan la liberación de CPH hasta en 100 veces los valores basales, con niveles máximos entre el cuarto y octavo día después de iniciada la estimulación y un promedio de cuatro procedimientos de aféresis para obtener  $8-13 \times 10^8$  células mononucleares/kg,  $1-16 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias de granulocito/macrófago/kg y  $2-7 \times 10^6$  CD34/kg, permitiendo la recolección de CPH sin las complicaciones derivadas de la toxicidad por quimioterapia (Sheridan, *et al.*, 1992; Stadtmayer, *et al.*, 1994).

Los equipos modernos procesan 1.5 a 3 volúmenes recolectados de sangre en varias horas y el procedimiento debe repetirse cada 2 a 5 días. En donadores alogénicos de CPH, una adecuada movilización se ha logrado usando exclusivamente citocinas (G-CSF y GM-CSF) (Padley, *et al.*, 1991).

### **1.2.2. Complicaciones e infecciones del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.**

Los principales obstáculos para un TMO exitoso son: la EICH, infecciones, neumonía intersticial, enfermedad hepática venooclusiva y recaídas de la enfermedad subyacente. Además de la mielosupresión, después del trasplante se observan varias toxicidades únicas, que incluyen las de órganos (renal, hepática, cardíaca y pulmonar) atribuibles a la quimioterapia en dosis altas o a los regímenes de quimioradioterapia utilizados en la preparación para el trasplante (Mossad, *et al.*, 1996; Roy and Weisdorf, 1997; Serody and Shea, 1997).

Usando fludarabina combinado con alemtuzumab o globulina antitimocito (GAT) en el régimen de acondicionamiento, algunos autores han encontrado el incremento de la prevalencia de la

enfermedad de CMVH, mientras que otros autores usando diferentes programas de acondicionamiento han observado una disminución en la prevalencia; como sucede en el régimen de acondicionamiento mexicano el cual emplea fludarabina, ciclofosfamida y busulfán, teniendo una mínima toxicidad y costos reducidos (Ruiz-Arguelles GJ, 2004).

Se ha observado que la EICH y las infecciones son las responsables de 10 a 30% de la morbilidad y mortalidad en los primeros 100 días después del trasplante.

#### **1.2.2.1. Enfermedad de injerto contra huésped (EICH).**

Es un proceso patofisiológico ocasionado por una reacción inmunológica de células (linfocitos T) aloreactivas del donador contra tejidos del huésped, que culmina en una disfunción y destrucción sistémica, complicando el trasplante alogénico y causando una gran morbilidad. El factor más importante que rige la presentación de la EICH es el grado de incompatibilidad HLA entre el donador y el receptor (Jaksch M, 2004). La EICH puede dividirse en fases aguda y crónica. La EICH aguda ocurre en el transcurso de los 100 primeros días del trasplante y suele incluir piel, hígado y tubo gastrointestinal. La EICH crónica se presenta a más de 100 días post-trasplante y puede limitarse a la piel e hígado o incluir múltiples órganos, y su presencia o ausencia es el principal factor que determina la calidad de vida después del trasplante alogénico de células progenitoras (Nikaien, et al., 1994).

La combinación de metotrexato y ciclosporina (con esteroides o sin ellos) es un régimen preventivo con que se cuenta en la actualidad para reducir la incidencia de EICH. También se emplea la eliminación de células T del injerto del donador para disminuir la incidencia y gravedad de la EICH. (Blazar, *et al.*, 1997; Radillo, 1999).

#### **1.2.2.2. Complicaciones infecciosas.**

Las complicaciones infecciosas que siguen al TCPH, se deben a la carencia de granulocitos y linfocitos después de su eliminación por el régimen de acondicionamiento previo al trasplante y también a alteraciones en la integridad de la mucosa (Robinson, 1994).

La primera fase y más peligrosa, es el periodo de 2 a 4 semanas previo al prendimiento del injerto. Los agentes infecciosos que se encuentran frecuentemente durante este periodo comprenden tanto bacterias gramnegativas como grampositivas, hongos y el virus herpes

simple (HSV-1), que pueden infectar con rapidez y provocar la muerte (Wood,1999). La segunda fase de complicaciones infecciosas potenciales se debe a la escasez e inmadurez de linfocitos, y el mayor riesgo es debido a infecciones por hongos y virus durante el segundo y tercer mes post-trasplante. Un agente micótico frecuente es *Aspergillus fumigatus*, capaz de provocar invasión vascular de pulmones y cerebro; mientras que el agente viral más importante es Citomegalovirus humano (CMVH), los pacientes negativos a este se vigilan de manera rigida para disminuir el riesgo de que adquieran una infección primaria por CMVH. Los productos hematológicos para trasplante o transfusión a receptores negativos a CMVH son de donadores seronegativos a CMVH, sin leucocitos y radiados para disminuir el peligro de infección por CMVH y la inducción de EICH mediada por los productos utilizados. La tercera fase de las complicaciones infecciosas ocurre después del tercer mes y dura hasta la maduración de la porción linfocitaria del sistema inmunitario. Esto semeja al periodo neonatal y toma de 6 a 18 meses, las infecciones que ocurren en esta fase incluyen las secundarias a bacterias grampositivas y por virus Varicela-Zoster (VZV, HHV-3) (Hirsch HH, 2003; Wood,1999, Stites,1998; Roy and Weisdorf,1997).

La infección por el Citomegalovirus humano está documentada en más de la mitad de los pacientes después del trasplante de órganos; y su replicación viral puede persistir por largo tiempo, pudiendo afectar la capacidad del hospedero a defenderse contra esta infección (Rubin RH, 1999).

### **1.3. Citomegalovirus humano.**

#### **1.3.1. Historia.**

El primer hallazgo de inclusiones celulares asociadas a virus fueron descubiertas por Ribbert, en 1881, en riñones de niños con sífilis, describiéndolos como cuerpos homogéneos en el núcleo que son separados por un área clara de la membrana nuclear. En 1921, Goodpasture y Talbert fueron los primeros en sugerir que la citomegalia puede ser debida a un agente viral. Lipschut, en el mismo año, reporta inclusiones similares asociadas con lesiones en humanos y conejos infectados con Herpes simple. Von Glahn y Pappenheimer, Farber y Wolbach son los primeros en usar el término de enfermedad viral de las glándulas salivales, por aparecer estas inclusiones en este tipo de glándulas. Smith y Vellios, en 1950, encontraron que la infección puede ocurrir en útero. Rowe y colaboradores, en 1957, aislaron cepas de CMVH en cultivos de fibroblastos humanos. Séller, en 1960, propuso el término citomegalovirus y lo aisló de orina de

infantes con enfermedad generalizada. CMVH es uno de los patógenos oportunistas más comunes encontrado en pacientes inmunocomprometidos por causas congénitas o adquiridas, como son por procedimientos de trasplante o por SIDA (Riley, 1997).

### 1.3.2. Generalidades.

El CMVH es un agente ubicuo que comúnmente afecta a muchas especies animales y al hombre, pertenece a la familia Herpetoviridae, que incluye a los patógenos para humanos, denominados Herpes Virus Humanos (HVH): Herpes simple tipo 1 y 2 (HVH 1 y HVH 2), Varicela-Zoster (HVH 3), Epstein Barr (HVH 4), Citomegalovirus (HVH 5); HVH 6, HVH 7 y HVH 8 (Hudnall SD, 2004). Es característica común de la familia, tener ADN envuelto; la subfamilia y herpesvirinae (HVH 4 y HVH 8) y el HVH 2, perteneciente a la subfamilia  $\alpha$  herpesvirinae presentan potencial oncogenicidad. Las células infectadas con citomegalovirus humano (CMVH) se caracterizan por ser muy grandes y mostrar enormes cuerpos de inclusión intracelulares (citomegalia) (Belshe, 1991). Después de la primera infección con éste virus ya nunca puede ser eliminado y se mantiene en latencia por el resto de vida del hospedero; la reactivación del virus está correlacionada en individuos inmunosuprimidos, particularmente cuando la deficiencia afecta la respuesta inmune mediada por células; se incluyen como individuos inmunosuprimidos a los que han recibido injertos (pacientes con alto riesgo de desarrollar la citomegalia). Para prevenir la enfermedad, la temprana identificación del virus es esencial en individuos con alto riesgo, ya que la terapia preventiva reduce la incidencia y la severidad de la enfermedad; por lo que el desarrollo de técnicas de laboratorio de alta sensibilidad, especificidad y rápidas son esenciales para el diagnóstico de la misma.

### 1.3.3. Características del virus.

El CMVH es un  $\beta$ -herpes virus, tiende a presentar relativa restricción por su hospedero. Es un virus de doble cadena de ADN con:

**cápside icosaédrica**, constituida por MCP (proteína principal de cápside), también llamada pUL86, nombre proveniente del gen que la codifica, es estructural y presenta una baja inmunogenicidad, por mCP (proteína menor de cápside), se codifica por UL46, se localiza internamente en la cápside y participa en el anclaje del ADN viral, pUL49 y pUL85 (proteínas

asociadas) para la formación de la precápside, pUL80 (proteína de ensamble), para la maduración del virión.

En las cápsides icosaédricas los protómeros se disponen en grupos de 5 o 6, formando subestructuras que reciben el nombre de capsómeros, los cuales forman, a su vez, la cápside (Britt and Alford, 1996). Su estructura tridimensional fue determinada por microscopía electrónica con resolución de 18 Angstroms y por reconstrucción por computadora, observándose que está compuesta de pentonas, hexonas y triplexes (Chen, 1999).

**Envoltura**, constituida principalmente por fosfolípidos y algunas proteínas, a menudo unidas en forma covalente a hidratos de carbono llamadas glucoproteínas, como:

-gB o gp UL55. heterodimero, precursor importante en la transmisión célula-célula y fusión de célula infectada.

-gH , proteína codificada por UL75 que participa en la adhesión al receptor de la célula; tanto esta proteína como la anterior son candidatos como subunidades para vacunas.

La envoltura contiene numerosas copias de unos pocos tipos de cadenas polipeptídicas. Generalmente, una proteína rica en aminoácidos hidrófobos se une de forma no covalente a los lípidos para formar la membrana básica. Las glicoproteínas se hallan situadas en la superficie externa, generalmente en forma de proyecciones que reciben el nombre de espículas. La presencia de lípidos hace que los virus cubiertos sean sensibles a la acción de los disolventes de grasas, como el éter (Davis, 1979).

**Proteínas tegumentarias**, hasta el momento se han dilucidado más de 25, muchas de las cuales están fosforiladas y cuya función aun no está bien definida pero se piensa juegan un papel en la evasión inmune, en la activación de promotores tanto virales como celulares y en el ciclo de modulación celular. Entre algunas de las proteínas con función establecida tenemos las siguientes:

- ppUL123 ( pp72) , proteína de etapa inmediata temprana (IE1), que tiene un peso molecular de 55,101 daltones, interviene como regulador transcripcional. El gen UL123, tiene una longitud de 1760 nucleótidos.

- ppUL83 (pp65) llamada también proteína matriz, es la más abundante, aunque no es esencial para la replicación en cultivos de tejidos, puede ayudar en la evasión viral de detección inmune en vivo causando una proteína inmediata-temprana (IE1) que al ser fosforilada, da resistencia a la presentación del complejo principal de histocompatibilidad clase I.

- ppUL82 (pp71) proteína transactivadora, puede incrementar la infectividad de ADN viral en la transmisión dentro de los fibroblastos diploides humanos (Jill T, 2002).

- ppUL32 (pp150) proteína fuertemente inmunogénica (Nii S, 1998).

- ppUL28 (ICP18.5) proteína de maduración viral.

**Otras proteínas.** Los genes US27, US28, UL33 y UL78 codifican 4 proteínas que son homólogas a receptores de quimiocinas de la subfamilia CC, como la reguladora de la activación de células T normales expresada y secretada (RANTES), la proteína quimioatrayente del monocito (MCP-1) y la proteína inflamatoria del macrófago (MIP); por medio de los receptores homólogos secuestran a las quimiocinas anteriores, disminuyendo su disponibilidad y evitando el reclutamiento de linfocitos, por lo que se les asocia a mecanismos de inmuno-evasión generados por el CMVH.

En particular el receptor homólogo de quimiocina (CCR-1) codificado por el gen US28, también reconoce a quimiocinas de la subfamilia CXC asociadas a membrana, favoreciendo la fusión célula-célula en las células infectadas por CMVH, demostrando su potencial importancia en la propagación del virus *in vivo*. Así mismo el receptor de US28, se ha vinculado con enfermedades vasculares, como la arterioesclerosis (Streblov, 1999).

En contraste con los receptores de quimiocinas de origen celular, las proteínas de US27, US28, UL33 y UL78 están localizadas en las membranas intracelulares y solo pequeñas cantidades están presentes en la superficie celular ( Vanciková, 2001).

**Núcleo,** es simple, contiene poliaminas (espermina y espermidina).

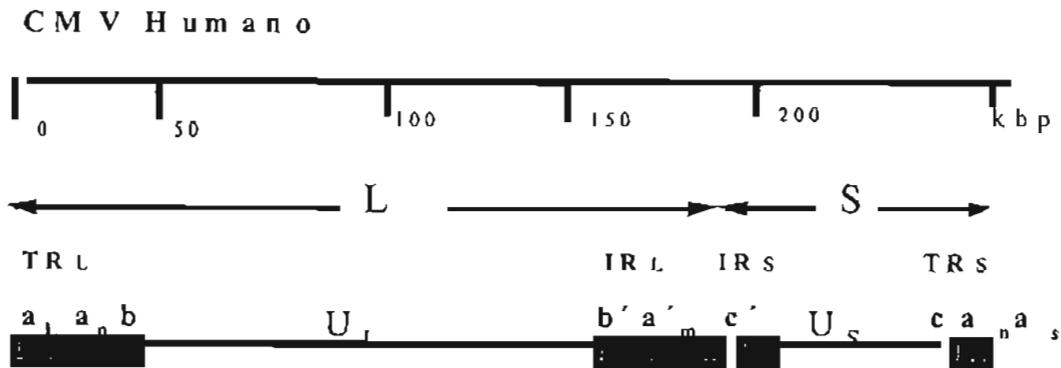
### 1.3.3.1. Genoma viral.

Se han secuenciado 6 cepas de CMVH, dos de laboratorio: AD169 y Towne, y cuatro aislados clínicos; Toledo, FIX, PH, y TR ( Murphy E, 2003).

El genoma es grande (230 kpb.) y está constituido por un alto contenido de G + C (54%-59%), su expresión se divide en: temprana inmediata, temprana tardía y tardía (Britt and Alford, 1996). EL CMVH es el único Betaherpesvirus que tiene una estructura genómica clase E, con un ordenamiento complejo de repeticiones únicas e invertidas, incluyendo la existencia de 4 isómeros genómicos, esto fue apreciado en estudios de mapeo de restricción (Britt, 1996).

El genoma, representado en la Figura 1, consiste de dos componentes: uno largo y uno corto, cada uno tiene una secuencia única UL y US respectivamente, estando limitado cada uno por secuencias repetidas terminales (TR), que se denominan respectivamente TRL y TRS y por secuencias repetidas internas invertidas (IR) que se denomina respectivamente IRL e IRS.

TRL está constituido por la secuencia *ab*, en tanto que TRS contiene la secuencia *ca*; la IRL presenta la secuencia *b'a'* y finalmente IRS presenta la secuencia *a'c'*.



**Fig. 1. Arreglo estructural del genoma del Citomegalovirus humano  
(Fields, 3ª edición, 1995 ,pag. 2450)**

El virión completo tiene 150 a 200 nm de diámetro y consiste de un genoma, una cápside, un tegumento y una envoltura. El genoma tiene 64 nm de diámetro y presenta una doble cadena lineal con un peso molecular de  $100 \times 10^6$  a  $150 \times 10^6$ . La cápside tiene 110 nm de diámetro, está formada de proteínas y tiene 162 capsómeros. La envoltura contiene lipoproteínas y tiene una doble capa.

El CMVH es un virus lábil que es fácilmente inactivado por solventes de lípidos, por pH inferior a 5, por calor a  $56^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, y con luz ultravioleta durante 5 minutos (Belshe, 1991).

### 1.3.3.2. Replicación.

Los virus requieren la interacción con las células para multiplicarse, estableciéndose una nueva entidad que puede abarcar dos casos extremos: a) lisis de célula con liberación del virus progenie y b) integración del genoma viral en el genoma celular del huésped, este último se da en CMVH.

Los virus infectan células en las que para multiplicarse cumplen tres etapas claramente diferenciadas:

1. Etapa de iniciación, es inmediatamente después de la infección y puede detectarse por una pequeña cantidad de virus parental (etapa de eclipse)
2. Etapa de expresión y replicación del genoma (síntesis de ácidos nucleicos-genes-proteínas) es sometido para su expresión a la maquinaria celular pero aún no se detectan virus progenie.
3. Etapa de ensamble y liberación de los virus progenie, hay acumulación en la célula o en el medio extracelular de cantidades crecientes exponencialmente de virus progenie (etapa de maduración) y luego de varias horas, las células que fueron infectadas con CMVH pueden continuar produciendo virus progenie por tiempos prolongados sin dañar ostensiblemente a la célula.

En la primera etapa, se presentan: la adsorción, la penetración y el desnudamiento. En la etapa de iniciación, primero ocurre la adsorción del virus a la superficie celular, constituyendo la unión específica de una proteína viral con un constituyente de la membrana celular denominado receptor; es un proceso que requiere iones pero es prácticamente independiente de la temperatura y de la energía.

Dicha etapa continúa con la penetración, proceso que requiere energía y ocurre inmediatamente después de la adsorción y se realiza por el mecanismo de fusión por ser un virus con envoltura que contiene a las glicoproteínas gB y gH, para las que tiene receptores la célula huésped, ingresando la nucleocápside directamente al citoplasma.

La liberación de la nucleocápside viral se logra por el proceso de desnudamiento que se produce a nivel de los poros de la membrana nuclear, liberándose el genoma al interior del núcleo de la célula infectada.

La segunda etapa es la de expresión y replicación del genoma; dado que el CMVH presenta un genoma ADN doble cadena, lineal; la transcripción y la replicación ocurren en el núcleo, y la síntesis proteica en citoplasma.

La generación de proteínas virales está ordenada en una secuencia en cascada; sus genes virales están colocados dentro de tres categorías llamadas: temprana inmediata (IE; alfa), temprana (E; beta) y tardía (L; gamma).

Los primeros genes en ser transcritos después de la infección de una célula son los genes *IE*, que expresan a las proteínas alfa; éstos no requieren de síntesis proteica viral precedente y por consecuencia, son transcritos en la presencia de un inhibidor de síntesis de proteínas. Una de las proteínas alfa es necesaria para la síntesis del siguiente grupo de proteínas, las beta.

En la fase temprana (E), se producen las proteínas beta, entre las que se encuentran la DNAasa, la timidincinasa y la DNA polimerasa.

En esta fase la cromatina se degrada y se desplaza hacia la membrana nuclear y el ADN viral se replica por un mecanismo de círculos giratorios.

En la fase tardía (L), un nuevo ciclo de transcripción - traducción da lugar a la síntesis de proteínas gamma, que son básicamente proteínas estructurales del virus, que migran al núcleo para constituir las cápsides.

La tercera etapa, incluye que el ADN viral recién formado se empaque en la cápside vacía en el núcleo de la célula, proceso denominado ensamble o armado, después la maduración que sucede por gemación de la nucleocápside a través de la membrana nuclear y finalmente la liberación de los virus de la célula infectada, por exocitosis (Ackermann, 1998).

#### 1.3.4. Epidemiología.

El reservorio del CMVH es el hombre, existen reportes en los cuales se mencionan que el 50 % de la población rural se encuentra infectada, mientras que en la población urbana es hasta de un 90%. Así mismo existe una variación en la prevalencia según el estrato socioeconómico, esto es, de un 40% en estrato superior, mientras que hasta de un 100% en estrato inferior (Britt and Alford, 1996; ). La prevalencia de la infección se eleva con la edad (Riley, 1997).

En mujeres seronegativas a CMVH que tienen seroconversión durante el embarazo, el índice de transmisión intrauterina es de 35 a 40%, comparada con el 0.2 a 2 % en mujeres seropositivas. Entre el 8 a 60% de infantes son infectados en los primeros 6 meses de vida, y aproximadamente el 80% de niños entre los 12 a 18 meses presentan CMVH (Griffiths and Whitley, 1996).

La epidemiología de esta infección involucra del 1 al 2 % de los recién nacidos y del 5 al 25 % de mujeres embarazadas (Riley, 1997).

La prevalencia de anticuerpos es más alta en negros que en blancos, en mujeres que en hombres y en personas con mayor actividad sexual; y en personas con grupo sanguíneo A que en otros grupos sanguíneos ( Belshe, 1991).

Su fuente de procedencia incluye: saliva, leche, lágrimas, secreciones (oro-faríngeas, cervicales y vaginales), orina, semen, heces y sangre. Su propagación requiere contacto directo de persona a persona, pero puede ser posible la transmisión indirecta por juguetes contaminados (Riley, 1997).

La prevalencia de anticuerpos para CMVH entre donadores de sangre es de 24 a 75% en Estados Unidos y Europa. En México, en donadores altruistas de sangre que acuden al Banco

de Sangre del Centro Médico Nacional, se documenta que el 90 al 95% son positivos por serología para el CMVH, por esta vía la enfermedad se produce entre el 0.4 a 12%, y la infección ocurre en 20 a 30% de los enfermos que reciben un trasplante de células hematopoyéticas (Gómez Morales, 2003).

Existen dos fuentes principales de infección: la adquirida en la comunidad (contacto directo con infantes infectados y por transmisión sexual), y la adquirida en centros hospitalarios (donadores seropositivos y exposición a productos sanguíneos contaminados) (Britt and Alford, 1996).

La infección con el CMVH puede dar como resultado varias enfermedades, dependiendo esto del estado inmunitario de la persona; en individuos sanos la infección es subclínica, existe la tendencia a desarrollar erupción cutánea alérgica; si la infección se adquiere vía uterina el niño puede nacer con enfermedad por inclusión citomegálica (ICM); y la infección perinatal asintomática puede adquirirse como resultado de la exposición al CMVH en el canal del parto o a través de la leche materna. Los individuos con inmunodeficiencia celular, ya sea por enfermedad o por tratamiento con inmunosupresores, tienden a una infección diseminada de CMVH; también se ha observado que la reactivación del CMVH parece desencadenarse en la enfermedad de injerto contra huésped, esto es, los receptores de trasplantes de órganos desarrollan enfermedad de CMVH generalizada (Saltzman et al., 1988).

Una alta prevalencia de infección por CMVH ha sido encontrada en varios hospederos inmunocomprometidos. En trasplante renal los rangos fueron de 60 a 96%; en receptores de médula ósea, corazón o hígado la infección fue encontrada en más del 50%; en pacientes con enfermedades del tejido conectivo y malignidades que toman agentes inmunosupresores tienen una alta prevalencia de 30 a 60%.

La reactivación de CMVH latente puede relacionarse a inmunosupresión y a reacción de injerto contra huésped. La importancia de agentes inmunosupresores se presenta en las siguientes observaciones: 1) infección con CMVH es vista en casi todos los pacientes que son tratados con agentes citotóxicos, 2) pacientes con injerto de médula ósea que no recibieron estas drogas no tuvieron una alta incidencia de infección por CMVH, 3) tiene esto una relación temporal entre terapia inmunosupresora y la aparición de infección por CMVH, y 4) tiene una directa correlación entre el grado de inmunosupresión y la morbilidad. La enfermedad de injerto contra huésped puede jugar un papel en la reactivación del virus latente, como se ha observado en estudios con animales, pero no es conocido en humanos (Belshe, 1991).

Desde 1990 se ha reducido la infección por CMV en un 80 % por la introducción de terapia antiviral, los pocos casos se han observado en ciudades del oeste de E.U. que ocurren en pacientes inmunosuprimidos, por nuevas herramientas para su detección, incluyendo PCR, por

terapia farmacéutica como ganciclovir, foscarnet, cidofovir y el desarrollo de valganciclovir (Salmon, 2001).

### 1.3.5. Patogenia.

Después de entrar al organismo el CMVH se difunde a varios órganos por el torrente sanguíneo, el transporte en la sangre son los leucocitos ya sean mononucleares o polimorfonucleares. La infección puede ocurrir en individuos sin una exposición previa (infección primaria) o en una exposición previa al virus (infección recurrente). La infección primaria está demostrada por la ausencia de anticuerpos específicos a CMVH previo a la infección. La infección recurrente es resultado de la reactivación de virus endógeno latente o de una reinfección con un virus exógeno. La diferencia entre primaria y recurrente en el campo clínico no es posible. Cualquiera de las dos puede ser asintomática o causar severa enfermedad o muerte, sin embargo la recurrente es más frecuentemente sintomática y severa.

La interacción entre CMVH y la célula hospedera en infección productiva es el resultado de la replicación viral. La comparación de las características de CMVH en la infección lítica y en la infección latente es la siguiente: en la lítica la duración de la infección es limitada, el destino de las células infectadas causa su muerte, si tiene replicación viral, la estructura del virus está completa, presenta cuerpos de inclusión, el virión puede ser visto por microscopio electrónico, se detectan antígenos por anticuerpos fluorescentes (FA), hay detección de ADN del virus por hibridación, el virus puede ser aislado en cultivo de tejidos y puede tener un cambio de estado a persistencia (latencia). Mientras que las características en la infección latente son: la duración de la infección es de larga vida, el destino de las células infectadas es normal o de vida prolongada, no tiene replicación viral, la estructura de virus esta incompleta, ausencia de cuerpos de inclusión, el virión no puede ser visto por microscopio electrónico, no se detectan antígenos por anticuerpos fluorescentes (FA), el virus no puede ser aislado en cultivo de tejidos y puede tener un cambio de estado a reactivación (lítica).

La infección productiva es causada por el virus lítico, resultando la muerte de las células infectadas. La replicación del virus en el núcleo, produce los cuerpos de inclusión, y causa lisis celular. El virus puede esparcirse a otras células para continuar su ciclo de replicación, en este mecanismo, la infección puede ser crónica. La diversidad de órganos blancos para la inducción de enfermedad por CMVH en infección lítica es alta, dependiendo de la edad (Belshe, 1991).

En pacientes con trasplantes de órganos sólidos o de médula ósea, la enfermedad diseminada por CMVH es causal de morbilidad y mortalidad significativamente alta; dependiendo del tipo de afección que ocasione, presentará manifestaciones típicas.

Los efectos de la infección con CMVH en pacientes trasplantados pueden clasificarse como directos e indirectos. Los efectos directos clínicamente, son manifestaciones activas de la enfermedad, debida a la reactivación del virus latente endógeno o de la adquisición de un virus exógeno por el órgano recibido o por transfusiones, su cuadro clínico incluye: fiebre, leucopenia, hepatitis, colitis, retinitis, nefritis, neumonitis, esofagitis y encefalitis. Los efectos indirectos son más delicados (sutiles) y se cree que conducen al rechazo del injerto, así como al incremento de susceptibilidad a infecciones con otros microorganismos (Fishman and Rubin, 1998).

### **1.3.6. Persistencia y latencia.**

El término latencia se refiere a una infección persistente en la que el genoma viral está presente, pero la expresión de genes está limitada y el virus infeccioso no se produce.

No es claro si el CMVH existe en algunas células y sólo se producen partículas virales hasta que la célula recibe un estímulo externo o si se establece una infección persistente y crónica, produciendo niveles indetectables de virus; las evidencias favorecen el primer planteamiento. Los sitios de latencia han sido detectados en paredes arteriales, tejido uterino, glándulas salivales, pulmón, corazón, sangre completa, hígado, bazo, cerebro, próstata y riñones (Clive, 1999).

En la infección aguda, los ductos de las células epiteliales son sitios de replicación, así mismo también se ha observado en células endoteliales y en fibroblastos. El tropismo hacia diferentes tejidos blancos es influenciado tanto por determinantes virales como por características del hospedero, como es el caso de la inmunodeficiencia, la inmunosupresión y una edad joven (infancia) que predisponen al individuo a que la enfermedad sea más severa con una pequeña cantidad de inóculo viral y a que la enfermedad sea persistente.

En la infección latente el individuo es portador del CMVH por toda la vida, no se sabe si el virus entra en latencia por depósito del genoma en una línea de células desconocidas o si continúa con su replicación a muy bajo nivel; por otro lado, se considera a los monocitos como las principales células sospechosas de ser reservorios. En modelos *in vitro* se han descrito hormonas, inhibidores celulares y baja temperatura como necesarios para el establecimiento de estos modelos.

El CMVH ha sido aislado de una de 43 líneas de fibroblastos derivados de la piel. Se ha observado en células linfoides después de una infección congénita y en linfocitos de individuos seropositivos; sin embargo, aislados de CMVH de células sanguíneas no implican que éstas sean un sitio de latencia, simplemente pueden ser el resultado de su actividad fagocítica (Belshe, 1991).

La reactivación de CMVH latente resulta en una infección productiva la cual puede o no ser asociada con manifestaciones clínicas, documentado por observaciones en modelos animales. Por otro lado, se ha asociado a CMVH con transformación celular y oncogenicidad, por reportes de vinculación con carcinomas de próstata, de colon, de cérvix y sarcoma de Kaposi's (Belshe, 1991).

Adicionalmente se evidenció la alteración en actividad de genes en células progenitoras mieloides, que son reservorio del CMVH (Slobedman B., 2004).

### **1.3.7. Aspectos Inmunológicos.**

El CMVH afecta tanto la respuesta humoral como la respuesta celular en hospederos normales e inmunocomprometidos. Aunque la inmunidad mediada por células (IMC) parece jugar un papel más importante que la inmunidad humoral, ambas son más protectoras cuando se conjuntan. En general la inmunidad frente a CMVH, solo es un marcador de infección previa por lo que individuos con evidencia de inmunidad humoral y celular frente al virus, pueden ser reinfectados por otra cepa.

Respecto a la respuesta inespecífica, el CMVH puede inducir la síntesis de interferón alfa y de interferón beta *in vitro*. El interferón alfa ha sido encontrado en secreciones alveolares y en plasma de pacientes con neumonía por CMVH, pero leucocitos de niños con enfermedad por CMVH no son capaces de producir interferón.

Hay evidencia de que las células natural killer (NK) participan limitando la severidad de la infección viral enseguida de la entrada del virus y previo al desarrollo de inmunidad por células T específicas. Aún más, en individuos receptores de TMO que han tenido la infección por CMVH y se han reestablecido, dicha recuperación se asocia tanto con células NK como con células T citotóxicas.

En relación a la respuesta humoral casi todas las proteínas estructurales de CMVH se han encontrado que son inmunogénicas. Anticuerpos monoclonales contra algunas de estas

proteínas son capaces de neutralizar al virus. Hospederos normales e inmunocomprometidos desarrollan anticuerpos IgG, IgM e IgA para CMVH seguido de una infección activa.

Esta respuesta juega un papel protector pero imperfecto en la defensa del huésped contra la infección viral. Anticuerpos IgA contra CMVH están presentes en orina, leche, y saliva de individuos infectados pero no previenen la distribución de éstos a otros sitios.

La enfermedad y viremia ocurren en la presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes. Además, se tiene una alta incidencia de infección de CMVH en receptores de órganos que son seropositivos antes del trasplante que en los que no lo son, y los primeros pueden ser reinfectados con una nueva cepa de CMVH del donador.

Sin embargo algún papel protector tienen los anticuerpos en infección por CMVH, lo que es sugerido por algunas observaciones: los neonatos infectados congénitamente por madres con inmunización frente a CMVH, tienen baja incidencia de enfermedad cerebral.

Los pacientes con trasplante cardíaco o renal seropositivos a CMVH, no son protegidos contra infección por el virus, pero son protegidos contra enfermedad de CMVH, como se indica por el hecho que la mayoría de la infección en estos pacientes es asintomática (Belshe, 1991).

En tanto que la inmunidad mediada por células, desempeña un importante papel para limitar la diseminación de la infección de CMVH y en prevención de enfermedad causada por infección reactivada en pacientes inmunocomprometidos. Todas las condiciones asociadas con una alta prevalencia de infección de CMVH involucran la depresión de la respuesta inmune celular, como son: trasplante de órganos, malignidades, SIDA, y embarazo.

Linfocitos T específicos aparecen en sangre periférica y en secreciones corporales con infección activa de CMVH y pueden dar protección contra la enfermedad con CMVH, dichas células T son usualmente HLA restringidas. Un papel protector de éstos linfocitos citotóxicos específicos frente al virus, ha sido observado en pacientes con TMO y trasplante de riñón, quienes desarrollaron la enfermedad pero menos severa, cuando estos linfocitos aparecían en su sangre periférica.

Ocurren alteraciones de células T en infección por CMVH, que induce una inversión del cociente de células T helper (CD4) y células T supresoras (CD8) en la sangre periférica de individuos con infección aguda. La inversión es el resultado de un decremento en el número de células CD4 y un incremento en el número de células CD8. Además, *in vitro* la producción de interferón se encuentra disminuida (Belshe, 1991).

Es sorprendente que las células T CD4 y no las CD8, tengan un papel central en el control de la replicación de CMV en glándulas salivales (Jonjic S, 1990) y que este control este influenciado por niveles de interferón gamma (Lucin P, 1992).

El bajo nivel de expresión del CMH clase I en tejido parenquimatoso, así como en glándulas salivales puede limitar la importancia de las células CD8 de CMH clase I en dichos tejidos. (Lucin P, 1992).

Las células T citotóxicas humanas responden contra el CMVH, por ejemplo ante productos de genes tardíos. La contribución de proteínas estructurales, sobre todo las de tegumento como la pp65 y la pp150, pueden ser procesadas y presentadas en la superficie de las células infectadas y ser reconocidas por las células citotóxicas humanas (Riddell SR, 1991).

Cuando se toma en cuenta la diversidad de genotipos CMH clase I en la población humana, la variabilidad de las cepas virales y el gran número de proteínas virales que pueden servir como blanco, resulta entonces incierto que la respuesta inmune celular protectora se limite a una o a unas pocas proteínas virales.

Un dato importante es la disminución de la expresión de CMH clase I durante la infección viral, la que tiene un impacto en la habilidad de las células infectadas de ser reconocidas y eliminadas (Fields, 1996).

Agentes inmunosupresores y particularmente globulina antitimocito, deprimen notablemente la inmunidad celular mientras que la respuesta humoral está relativamente intacta. Esta supresión es general, no específica, y limitada a los primeros meses seguidos de la iniciación de una terapia; es durante este periodo que más infecciones por CMVH ocurren en pacientes inmunosuprimidos. La viremia y la enfermedad de CMVH son más comunes en pacientes que recibieron globulina antitimocito, presumiblemente porque su inmunosupresión es más severa y más prolongada (Belshe, 1991).

### **1.3.8. Transmisión y periodo de incubación.**

La transmisión puede ser natural o iatrogénica, la primera puede ser por la ruta orofaríngea, la genital o la transplacentaria y la segunda por transfusión y trasplante de órganos.

Siendo de interés la debida a trasplante de órganos, ésta ruta de transmisión suele suceder cuando el donador es seropositivo y el receptor es seronegativo. Después de un trasplante de riñón, algunos centros hospitalarios han reportado que pacientes receptores seronegativos a CMVH, que reciben riñones de donadores seropositivos tienen una gran incidencia de infección por CMVH a diferencia de los receptores seronegativos que se les trasplanta el riñón de donadores seronegativos. Resultados similares han sido reportados después de trasplantes de corazón. El fracaso para aislar CMVH de donadores de riñón sugiere que el virus está presente

en el riñón en forma latente, lo que conlleva a la posibilidad de que los leucocitos que son atrapados en el órgano injertado y no el parénquima del órgano a trasplantar, son la fuente de la transmisión viral.

El periodo de incubación exacto de CMVH es desconocido, pero puede ser estimado del intervalo entre el tiempo de exposición al virus y el desarrollo de síntomas o detección de viruria en individuos sin ninguna exposición previa a CMVH. Este periodo es de 4 a 8 semanas y es similar en infantes expuestos a CMVH en el tracto genital, en niños expuestos por la leche materna y en adultos que recibieron una transfusión sanguínea (Belshe, 1991).

### 1.3.9. Diagnóstico.

La diseminación del CMVH en sangre es un importante factor en la patogénesis de la enfermedad, tanto en la primaria como en la reactivación; ésta diseminación en pacientes trasplantados alogénicamente es un factor de riesgo alto que conduce a una viremia y posteriormente a las manifestaciones clínicas de la enfermedad, por lo que adquiere importancia el avance en los métodos de diagnóstico.

Los métodos de diagnóstico se dividen en directos e indirectos; entre los primeros se encuentra el histológico, que permite observar los "cuerpos de inclusión" característicos denominados "ojo de lechuza", en células obtenidas de biopsias *post mortem* o *in vivo*, usando tinciones como Giemsa; los cuerpos de inclusión pueden ser observados en cualquier tejido infectado por CMVH, aunque su sensibilidad es baja (Belshe, 1991).

Otro método directo, es el clásico aislamiento de CMVH en cultivo celular, que requiere el uso de cultivo de fibroblastos de piel (prepucio) o de pulmón de embrión humano; teniendo como muestra del paciente a: leucocitos, secreciones cervicales, semen, leche materna, orina, exudado faríngeo o lágrimas. El virus, dependiendo de su concentración en el inóculo, produce cambios citopáticos (áreas focales de células redondeadas hinchadas) que se evidencian entre 2 a 4 semanas después de inoculada la monocapa de fibroblastos.

Este método requiere infraestructura para cultivos celulares y un periodo largo de espera para obtener resultados, por lo que resulta inconveniente como método de rutina (Wentworth and French, 1970).

El cultivo rápido denominado shell vial, es otro método directo que se desarrolló posteriormente al descrito en el párrafo anterior, combina el aislamiento en monocapa de cultivo celular con la detección, por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales, del antígeno pp72

("immediate early antigen"), que el CMVH expresa después de 2 a 3 días de que las células fueron infectadas *in vitro* y antes de la aparición del efecto citopático. Las muestras que se utilizan son las mismas que para el aislamiento por método clásico. Este método tiene la ventaja de reducir el tiempo de resultados de 2 a 4 semanas, a 24 a 72 horas (Belshe, 1991; Mihailidi F 2003).

Otro método directo, es el ensayo de antigenemia pp65, que consiste en su detección en PMN del paciente. En este caso se identifica una fosfoproteína de tegumento (proteína estructural de 65kd de CMVH) denominada pp65. Este antígeno se detecta en el núcleo de los polimorfonucleares por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos (Forbes, 1988). Tiene una sensibilidad y especificidad similares al cultivo rápido y presenta la ventaja de que puede ser cuantitativo, por lo que es un equivalente de la carga viral. Esta técnica consiste en la tinción directa con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la pp65, que se lleva a cabo en los siguientes pasos: aislamiento de PMN y su preparación en laminillas, fijación, inmunotinción, lectura y cuantificación (Grefte et al, 1992). Este método es de realización laboriosa, rápida ( 5 a 6 horas) y no requiere de un equipo sofisticado, presenta la ventaja de no requerir cultivos celulares, es de gran utilidad en el seguimiento de los pacientes con trasplantes para el diagnóstico rápido de infección activa por CMVH, lo cual indicará la necesidad del tratamiento antiviral específico (Van der Bij et al. 1988; Kusne et al. 1999); sin embargo, tiene la gran desventaja de que las muestras deben ser procesadas inmediatamente (Pancholi P,2004), además de presentar baja reproducibilidad y no ser aplicable en pacientes neutropénicos, situación frecuente en pacientes inmunosuprimidos. (Carballall G, 1998; Mihailidi F, 2003).

Otro método directo, es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); que cumple con los requerimientos para establecerse como una técnica óptima para monitorear al CMVH, entre los más importantes serían: 1) poseer una alta sensibilidad que permite una detección temprana en individuos con alto riesgo; 2) tener la habilidad de cuantificar el incremento en resultados positivos y medir la carga viral durante un tratamiento antiviral; 3) permitir que se realice un inicio temprano, o bien un cambio en el tratamiento, y 4) tener un alto grado de reproducibilidad. Hasta este momento ha sido muy difícil de obtener resultados rápidos y reproducibles; sin embargo, los métodos de cuantificación de antígeno y los métodos de amplificación molecular, como la técnica de PCR, serían capaces de cumplir con estos cometidos, pues permiten diferenciar entre infecciones subclínicas e infecciones sintomáticas (Amorín et al. 2001).

La PCR es un procedimiento que permite amplificar *in vitro* una secuencia seleccionada de ADN de un genoma, un millón de veces o más. Sin embargo, el procedimiento sólo puede aplicarse

cuando se conoce la secuencia de nucleótidos de al menos un segmento corto de ADN a cada lado de la región de interés; y el procedimiento de la PCR implica utilizar oligonucleótidos sintéticos (iniciadores) complementarios de las secuencias conocidas que flanquean el gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación enzimática de este segmento de ADN. El procedimiento de la PCR incluye tres pasos, cada uno de los cuales se repite muchas veces para producir ciclos de amplificación; primero, el ADN genómico que contiene la secuencia que va a ser amplificada se desnatura por calor, segundo, el ADN desnaturado se hibrida con un exceso de los iniciadores, tercero, se usa la DNA polimerasa para duplicar el segmento de ADN entre los sitios complementarios de los iniciadores. El iniciador proporciona el 3'-OH libre que se requiere para la extensión covalente; el ADN genómico desnaturado proporciona la función de molde que se requiere. Luego, los productos del primer ciclo de duplicación se desnaturan, se hibridan con los oligonucleótidos iniciadores y se duplican nuevamente con la DNA polimerasa. Este ciclo se repite muchas veces hasta que se logra el nivel deseado de amplificación, la que tiene lugar exponencialmente.

La tecnología PCR ofrece muchas aplicaciones para la clonación y secuenciación de fragmentos de ADN; estos procedimientos permiten obtener datos definitivos de la estructura de genes y secuencias de ADN cuando solo están disponibles cantidades muy pequeñas de ADN. Asimismo, esta técnica de PCR es un método molecular que se ha desarrollado como una herramienta de diagnóstico para la detección de microorganismos a partir de muestras del individuo infectado.

La alta sensibilidad y especificidad, además de rapidez, inherentes a la amplificación enzimática de ADN de microorganismos a través de la PCR *in vitro* ofrecen una excelente alternativa a los métodos de cultivo tradicionales para detectar tipos específicos de microorganismos en una gran variedad de muestras.

La especificidad en gran medida está determinada por las secuencias de los iniciadores, los cuales son diseñados exclusivamente para un determinado ADN blanco, así como también por las condiciones de hibridación, las cuales deben ser optimizadas con el fin de minimizar aquellas amplificaciones inespecíficas.

La infección primaria y recurrente producida por CMVH causa una enfermedad severa en individuos con infección por HIV, en receptores de órganos y de médula ósea, así como pacientes con terapia inmunosupresora (Kanj, et al., 1996). Para prevenir la enfermedad por CMVH, una identificación temprana y un tratamiento adecuado a los pacientes de alto riesgo es esencial.

La terapia preventiva reduce la incidencia y severidad de la enfermedad por CMVH, y este aspecto depende del desarrollo de los ensayos del laboratorio, los cuales si son sensibles, específicos y rápidos pueden ofrecer un diagnóstico temprano, para que posteriormente constituyan un método rutinario en el laboratorio.

La tecnología de PCR ha sido una prueba invaluable de diagnóstico en virología, ya que permite detectar cantidades mínimas de ácidos nucleicos virales en muestras clínicas. Los protocolos para llevar a cabo ésta técnica difieren en muchos aspectos, incluyendo tipo de muestra y preparación, oligonucleótidos, reacciones y controles de amplificación.

El ADN de CMVH puede ser detectado en distintas fracciones de leucocitos durante la infección activa, tanto en mononucleares como en polimorfonucleares, se ha observado que se obtiene mayor cantidad de ADN de fagocitos; y aunque el virus está asociado a su célula blanco, su ADN puede ser detectado en suero o plasma (Aspin et al., 1994; Brytting et al., 1992). La existencia de las glicoproteínas B (gB) y H (gH) en células y fluidos extracelulares indican que el ADN extracelular es derivado de células infectadas, adicionalmente se ha observado que el ADN de CMVH puede ser detectado en plasma de pacientes con neutropenia absoluta posterior al trasplante de médula ósea (Boeckh et al., 1997).

Finalmente, los métodos indirectos se refieren a las técnicas serológicas que se emplean actualmente, como el inmunoensayo (ELISA).

En los pacientes inmunocomprometidos, la serología tiene un valor limitado dada la inmunosupresión, y además no permite diferenciar claramente infección latente de infección activa, excepto en el caso de detectar IgM específica, la cual puede elevarse o no en las reactivaciones. Cuando se realiza detección de IgM específica es necesario descartar la presencia de factores reumatoideos, que pueden dar falsos positivos.

#### **1.3.10. Tratamiento.**

Diversos agentes antivirales se han usado para tratar la enfermedad causada por CMVH, incluyendo, interferón, factor de transferencia, drogas nucleósidas (iododeoxiuridina, fluorodeoxiuridina, arabinósido de citosina, arabinósido de adenina; y aciclovir). Estos regímenes terapéuticos han tenido mínimo o nulo beneficio clínico; y presentan significativa toxicidad.

El aciclovir, es un derivado acíclico de la guanosina. Debido a que requiere cinasa viral para la fosforilación inicial el aciclovir se activa de manera selectiva y acumula trifosfatos sólo en células infectadas e inhibe la síntesis de ADN.

El ganciclovir (GCV), es el primer compuesto antiviral específico para tratamiento de infecciones ocasionadas por el CMVH, es un nucleótido acíclico que inhibe la replicación de los virus de la familia herpesviridae, (CMVH, VHS1, VHS2, VH6, Epstein- Barr, Varicela-Zoster tanto *in vitro* como *in vivo* (Lorenzi, 2003). Su actividad antivírica parece obedecer a la inhibición de ADN viral y su actividad contra CMVH es 100 veces mayor que la del aciclovir (Bertram, 2000).

Este medicamento ha sido indicado para tratar a individuos con síndromes asociados a CMVH, como son: retinitis, neumonitis, hepatitis, colitis y esofagitis; en pacientes inmuno comprometidos y en los que han recibido un trasplante (Demmler, 1992). El uso de GCV a menudo es benéfico, de manera particular cuando se combina con inmunoglobulina.

Este medicamento puede causar efectos secundarios serios como: neutropenia, anemia y trombocitopenia, por lo que no deberá administrarse si el recuento absoluto de neutrófilos es inferior a 500/µl, o si la cifra de plaquetas es menor de 25 000/µl. Además de poder afectar a nivel de los sistemas: digestivo, cardiovascular, nervioso central, urinario y locomotor, afectando los sentidos de la vista y oído; además de causar trastornos metabólicos y nutricionales.

El foscarnet es un pirofosfato inorgánico, se ha empleado por inhibir directamente a la polimerasa del ADN del CMVH, su uso es para la inducción y mantenimiento de pacientes con infección de CMVH en tracto intestinal superior e inferior (esofagitis y colitis), para el tratamiento de retinitis por CMVH en pacientes inmunocomprometidos. Las cepas de CMVH resistentes a ganciclovir pueden ser sensibles a foscarnet.

Otros fármacos, son el cidofovir y el valganciclovir (Salmon, 2001). El primero es un análogo del nucleótido citosina con actividad *in vitro* contra CMVH; en contraste con ganciclovir, la fosforilación del cidofovir para activar al difosfato es independiente de las enzimas virales; su reacción adversa más importante es la nefrotoxicidad dependiente de la dosis (Bertram, 2000).

El segundo, tiene actividad *in vitro*, mecanismo de acción y farmacocinética idénticas a las del aciclovir. En ocasiones se reportan náuseas, diarrea y cefalea; los efectos colaterales más frecuentes son confusión y alucinaciones no dependientes de la dosis ( Bertram, 2000).

Excepto por la mayor incidencia de neutropenia con valganciclovir 8.2% contra ganciclovir 3.2 %, la prevención contra CMVH se encontró similar entre ambos fármacos (Paya C, 2004).

### 1.3.11. Prevención.

En la década de los 60' y los 70' se estudiaron dos modelos experimentales para explorar la eficacia de las vacunas de CMV en ratones y cobayos, las vacunas eran atenuadas y vivas, preparadas a partir de virus CMV específicos. Teniendo protección contra las cepas salvajes del CMV respectivo; sin embargo, por la especificidad de los CMV hacia un huésped determinado, estos resultados tienen un valor limitado en humanos (Belshe, 1996).

Así mismo se ha utilizado la cepa vacunal Towne-125 (vacuna atenuada), la cual ha sido segura e induce tanto inmunidad humoral como celular y se ha observado que protege a individuos trasplantados, con un mínimo de efectos colaterales estimulando la producción de IgM y anticuerpos para antígenos tempranos causando una elevación en la respuesta inmune en individuos seropositivos a CMVH (Plotkin et al., 1975). La eficacia de la vacuna en la prevención para pacientes con trasplante renal ha sido demostrada. Hay dos problemas principales asociados con la vacuna para CMVH, el virus persiste en el hospedero en un potencial estado infeccioso (latencia), pudiendo reactivarse posteriormente y segundo el potencial oncogénico de CMVH es todavía incierto y debe ser sopesado contra los beneficios obtenidos por la vacuna (Belshe, 1996).

Recientemente se han considerado candidatos a vacunas, la glicoproteína B (gB), principal blanco de los anticuerpos neutralizantes, la gB obtenida de la cepa AD 169 de CMVH, estimuló la formación de anticuerpos que han neutralizado tres diferentes genotipos de cepas de CMVH (Wang Z, 2004).

Otras proteínas han sido consideradas como candidatas de vacunas, como la proteína de tegumento pp65 (UL83) y la glicoproteína de envoltura gH (UL75)(Britt, 1996).

## 2.0. JUSTIFICACIÓN

El trasplante de médula ósea (TMO) es una importante herramienta terapéutica contra diversas enfermedades neoplásicas y no neoplásicas. Tradicionalmente se recolectaban células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea, pero cada vez se obtienen con mayor frecuencia de sangre periférica; actualmente el TMO se denomina en forma más apropiada y genérica como trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH).

El trasplante alogénico consiste en la transferencia de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de un donador a otra persona, el cual puede ser relacionado o no relacionado, HLA totalmente compatible o con un solo antígeno no compatible; así mismo, puede ser también de sangre de cordón umbilical de donador emparentado o no.

En la actualidad se ha establecido que el uso del TCPH alogénico es la única modalidad de tratamiento para curar alguna de éstas afecciones, permitiendo de esta manera remisiones y sobrevida a largo plazo. Así mismo este tipo de trasplante es considerado como una terapia alternativa para el control de otras afecciones hematológicas, en las que ha sido necesaria la administración de altas dosis de quimioterapia o de quimioradioterapia.

Algunos de las principales complicaciones del TCPH alogénico son el alto riesgo de la presencia de enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y de las complicaciones infecciosas. La EICH es un proceso patofisiológico ocasionado por una reacción inmunológica de células (linfocitos T) aloreactivas del donador contra los tejidos del huésped, que culmina en una disfunción y destrucción sistémica, complicando el trasplante alogénico y ocasionando una gran morbilidad. Por lo tanto, un régimen preventivo con que se cuenta en la actualidad para reducir la incidencia de EICH es la combinación de metotrexato y ciclosporina (con esteroides); sin embargo, esta medida preventiva afecta en cierto grado al sistema inmune del paciente.

Las complicaciones infecciosas que siguen al TCPH se deben a la carencia de granulocitos y linfocitos después de su eliminación por el régimen de acondicionamiento previo al trasplante y también a alteraciones en la integridad de la mucosa. Dentro de los agentes infecciosos que se encuentran más a menudo causando complicaciones serias después del TCPH se encuentran el citomegalovirus (CMVH), como patógeno viral prominente, y *Aspergillus spp* como agente micótico, ambos asociados a una alta morbilidad y mortalidad. Por lo tanto, los pacientes negativos a estos patógenos se vigilan de manera estricta para disminuir el riesgo de que originen una infección primaria, con la utilización de una terapia preventiva; o en caso de ser positivo, administrando un tratamiento intensivo para el control de las infecciones producidas por éstos patógenos.

Los métodos principales para la detección del CMV humano que se han reportado son: el cultivo del virus *in vitro* (método cuantitativo ó cualitativo), la cuantificación de leucocitos polimorfonucleares que expresan la proteína pp65 por el ensayo de antigenemia y por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Con respecto al primer método, queda implícito el largo periodo requerido para obtener los resultados; en tanto que los otros dos métodos, antigenemia y PCR, son considerados altamente sensibles y específicos lo que contribuye a la identificación de pacientes que se encuentran al borde del desarrollo de la enfermedad por CMVH. Sin embargo, una dificultad asociada con la prueba de antigenemia es la interpretación de resultados inesperados debido a las variaciones que se presentan entre los diferentes equipos comerciales; así mismo, la utilidad de esta prueba está limitada por la rápida pérdida de detección del virus durante el almacenamiento de la muestra, la cual debe ser procesada dentro de las 6 primeras horas después de su recolección. Por otro lado, se ha reportado una mayor reproducibilidad, uniformidad y control de calidad de los resultados obtenidos por la técnica de PCR para CMVH, por lo cual la terapia preventiva con ganciclovir basada en el diagnóstico por PCR ha demostrado reducir la incidencia de la enfermedad por CMVH, después del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

Por todo lo mencionado anteriormente, y considerando que el Centro Médico Nacional La Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) es uno de los hospitales del país donde se lleva a cabo el procedimiento terapéutico de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en el mayor número de pacientes, consideramos que es una necesidad estandarizar e incorporar la técnica de PCR para la detección del CMVH que complemente y enriquezca el diagnóstico en dicho centro hospitalario, lo cual deberá traducirse en la aplicación más oportuna y específica del tratamiento antiviral, con lo que la estancia hospitalaria, y la posibilidad de sobrevivir de estos pacientes mejorará en forma notable.

### 3.0. HIPÓTESIS

Sí la amplificación enzimática del ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa *in vitro* permite la detección del citomegalovirus humano, será considerada como una técnica de diagnóstico útil en pacientes con afecciones hematológicas tratados con trasplante autólogo o alogénico de células progenitoras hematopoyéticas.

## 4.0. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Implementar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como una herramienta de diagnóstico rutinario para la detección del Citomegalovirus humano realizando un estudio de campo clínico en pacientes con afecciones hematológicas tratados con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

### 4.2. Objetivos Particulares

- Comparar diferentes tratamientos de las muestras sanguíneas que permita seleccionar el tipo de material biológico más adecuado para la obtención del ADN.
- Estandarizar las condiciones de cultivo y conservación de la línea celular MRC-5 (fibroblastos de pulmón de embrión humano) y del Citomegalovirus humano *in vitro* para su uso como controles.
- Establecer las condiciones de trabajo para la técnica de PCR empleando ADN purificado de CMVH usando un par de iniciadores seleccionado.
- Aplicar la técnica de PCR a un estudio de campo clínico, empleando muestras de pacientes con afecciones hematológicas tratados con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

## 5.0. METODOLOGÍA

### 5.1. Pacientes y diseño del estudio.

Los pacientes de interés para el presente estudio fueron aquéllos que recibieron trasplante alogénico o autólogo de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH), como un tratamiento por afecciones hematológicas, todos los receptores de TCPH menores a tres meses post-trasplante tratados en el Hospital de Especialidades del Centro Médico La Raza en el periodo comprendido entre el 25 de febrero al 18 de agosto de 2003, fueron incluidos en este estudio. En la Tabla 1 se indican las características clínicas de los pacientes estudiados.

**Tabla 1. Características clínicas de los pacientes**

<b>Rango de edad (Promedio)</b>	De 17 a 49 años (32 años)		<b>Total</b>
<b>Sexo</b>	Masculino	Femenino	
<b>LMC</b>	4	1	5
<b>LMA</b>	1	3	4
<b>LLA</b>	1	1	2
<b>Trasplante alogénico</b>	6	3	9
<b>Trasplante autólogo</b>	0	2	2
<b>Total</b>	6	5	11

LMC = Leucemia Mielocítica Crónica

LMA = Leucemia Mieloblástica Aguda

LLA = Leucemia Linfoblástica Aguda

Se planearon ocho recolecciones de muestras sanguíneas a cada paciente, la primera en la fase de acondicionamiento (cuatro a cinco días antes del trasplante), la segunda el día del trasplante, considerado como día 0, de la tercera a la sexta toma de muestra fueron en el primer mes post-trasplante (una cada semana), la séptima y octava recolecciones, se realizaron a los 60 días y 90-100 días post-trasplante, respectivamente. En la Tabla 2, se indica la calendarización de recolección de muestras sanguíneas de los 11 pacientes estudiados, con el diagnóstico y tipo de TCPH que les realizaron.

**Tabla 2. Calendarización de recolección de muestras sanguíneas**

Código de Paciente	Dx	TCPH	Pret.	Basal 0 d.	7 d	14 d	21 d	28 d	60 d	100 d
			1	2	3	4	5	6	7	8
1	LLA	ALO								
2	LMA	ALO								
3	LMC	ALO								
4	LMA	ALO								
5	LMA	AUT								
6	LMC	ALO								
7	LMC	ALO								
8	LLA	ALO								
9	LMA	AUT								
10	LMC	ALO								
11	LMC	ALO								

Pret = Pretrasplante d = días post-trasplante

AUT= Autólogo ALO= Alogénico

■ Obtención de muestra sanguínea  
Dx=Diagnóstico

En la Tabla 3, se presenta el acumulado de las recolecciones de muestras sanguíneas, a partir de los días previos al procedimiento del TCPH hasta los 90–100 días posteriores al mismo.

**Tabla 3. Registro de recolección de muestras sanguíneas por cada día del procedimiento del TCPH**

Día asociado al procedimiento de TCPH	Nº de identificación de la recolección de muestra	Nº total de muestras
4 a 5 antes	1	5
0	2	9
+ 7	3	9
+ 14	4	11
+ 21	5	6
+ 28	6	7
+ 60	7	2
+ 100	8	2

+ Post-TCPH

## **5.2. Colección y tratamiento de las muestras clínicas.**

Se obtuvieron un total de 51 muestras de 11 diferentes pacientes, de los cuales se colectaron 10 ml de muestra sanguínea con EDTA, se dividió en dos, con el objeto de contar con 2 tipos de material celular como fuente de ADN, por los siguientes métodos:

**i)** gradiente de densidad para obtener células mononucleares (CM); a partir de 5 ml de muestra de sangre se diluyó 1:2 en PBS (pH=7.2), se agregó posteriormente de manera lenta por la pared de un tubo conteniendo 5 ml de Histopaque 1.083 (Sigma Diagnostics), después se centrifugó a 214 x g/25 min; la interfase obtenida (anillo de células mononucleares de la muestra de sangre) se transfirió a otro tubo, se lavó con PBS (pH=7.2) y se centrifugó a 1520 x g/12 min. Se decantaron y conservaron a las CM en 200 µl de PBS.

**ii)** lisis celular para obtener a los leucocitos totales; 5 ml de muestra de sangre, se trabajaron con buffer de lisis de eritrocitos, diluyendo previamente la sangre 1:2 con PBS (pH=7.2), centrifugando después a 855 x g/15 min, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 5 ml de buffer de lisis de eritrocitos, se mezcló suavemente por 2 min, posteriormente se mantuvo en refrigeración hasta observar lisado rojo traslúcido, se centrifugó a 1520 x g/12 min, se eliminó sobrenadante, observando el paquete celular libre de eritrocitos y se lavó con PBS; se centrifugó a 1520 x g/12 a 15 min, se decantó y se generaron 200 µl de suspensión con el paquete celular sedimentado, usando como diluyente PBS.

Ambos materiales biológicos obtenidos, fueron posteriormente usados para la extracción de ADN.

Adicionalmente a 46 de las 51 muestras sanguíneas, se les cuantificaron los leucocitos, usando la solución de Turck (ácido acético glacial al 3%), que mantiene a las células nucleadas intactas, lisando las que no presentan núcleo (eritrocitos y plaquetas); el conteo se hizo en el hemocitómetro, usando el microscopio de campo claro.

## **5.3. Extracción, detección y cuantificación de ADN a partir de muestras y de controles.**

El procedimiento para el aislamiento del ADN se llevó a cabo utilizando la técnica descrita por Chomncinzki y Sacci mediante DNAzol (Gibco BRL, Life Technologies. No. Cat. 10503), constituido por una solución lisante de detergente-guanidina que permite la precipitación selectiva de ADN desde un lisado de células.

El primer paso fue la lisis de células, que se logró adicionando a los 200 µl de paquete celular, 1 ml del reactivo DNAzol, pipeteando suavemente. Después se centrifugó (este paso es opcional) durante 10 min a 10,000xg (4 ° C ó a temperatura ambiente), el sobrenadante viscoso resultante se transfirió a un tubo nuevo. Este paso remueve fragmentos de tejido insoluble, RNA y exceso de polisacáridos del lisado.

El ADN se precipitó del lisado por la adición de 0.5 ml de alcohol etílico al 100% por cada ml de reactivo DNAzol usado para el aislamiento. Las muestras se mezclaron por inversión y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1-3 min, el ADN puede ser visible rápidamente como un precipitado blanquecino. Se removió el ADN precipitado con la punta de la pipeta y se transfirió a un tubo limpio. Si un pipeteo excesivo ha sido usado para facilitar la lisis antes de la precipitación con etanol o si existen cantidades muy bajas de ADN (<15 µg), entonces se recomienda la centrifugación de la muestra a 4,000xg durante 1-2 min a temperatura ambiente ó a 4 °C para obtener el paquete de ADN.

El lavado del ADN precipitado se logró con la adición de 1 ml de alcohol etílico al 75%, en 2 ocasiones. En cada lavado se suspendió el ADN, invirtiendo los tubos de 3-6 veces. Se mantuvieron los tubos verticalmente durante 2 min y posteriormente se centrifugaron a 4,000xg durante 1-2 min a temperatura ambiente o 4° C, finalmente se removió el alcohol etílico por decantación.

El ADN se secó a temperatura ambiente manteniendo el tubo abierto por 5-15 segundos después de remover el etanol. (sí el ADN es expuesto al aire por más tiempo, éste será mucho más difícil de disolver). Posteriormente, el ADN se disolvió adicionando la cantidad adecuada de TE con (pH 7.7) pipeteando lentamente. El ADN es estable en esta solución por varios meses a 4 °C y más de un año a -20 ° C.

La presencia de ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (GIBCO) al 1%, teñido con bromuro de etidio para su visualización en lámpara de luz ultravioleta, dando el resultado como positivo por banda nítida ó tenue. Para ello en cada carril del gel de agarosa, se colocó la mezcla de 5 µl de la suspensión de ADN con 2 µl de solución de carga (azul de bromofenol con glicerol). La escalera de pares de bases (pb), llamada también marcador, fue de 123 pb (GIBCO). La preparación del gel de agarosa y el corrimiento electroforético se describen más adelante (5.6).

Para la cuantificación de ADN, se mezcló 1 µl del purificado de cada muestra solubilizado con 500 µl de agua bidestilada (1:501), a esta solución resultante se le midieron los valores de absorbancia (A) a 260 nm y a 280 nm. La lectura a 260 nm permitió calcular la concentración de ADN en la muestra, una DO de 1 corresponde a 50 µg/ml de ADN de doble cadena. La

proporción  $A_{260}/A_{280}$  del ADN aislado proporciona un estimado de su pureza y debe estar dentro del rango de 1.6-1.9, si existe contaminación con proteína éstos valores son más bajos.

El procedimiento para la extracción de ADN de los controles, es decir de las células MRC-5 y de las células MRC-5 infectadas con el CMVH, así como los procedimiento de detección y de cuantificación de ADN, fueron los mismos que se indicaron para las muestras de pacientes.

#### **5.4. Cultivo del Citomegalovirus humano *in vitro* y extracción del ADN.**

Para cultivar al CMVH (cepa AD 169) *in vitro*, se requirió contar primero con fibroblastos de pulmón de embrión humano (línea celular MRC-5)(*In vitro*, S.A), la botella de cultivo celular contiene el Medio Mínimo Esencial de Eagle con base de sales Earle, suplementado con 0.11% de bicarbonato de sodio a pH 7.3-7.5, además de 10% de suero fetal bovino y antimicrobiano (antibiótico-antimicótico, Penicilina 10,000  $\mu\text{g/ml}$ -Anfotericina B 25  $\mu\text{g/ml}$ ) al 1%.

El manejo de la botella de cultivo celular requiere condiciones de esterilidad, aportadas por el uso de la campana de flujo laminar, el procesado consistió en eliminar el MEM dejando alrededor de 8 ml en botella de 25  $\text{cm}^2$  de superficie o 15 a 20 ml en botella de 80  $\text{cm}^2$  de superficie, conservándola a 36.5° C en incubadora (5% de  $\text{CO}_2$  ) por 2 a 3 días para que continúe el crecimiento de células y se complete la monocapa celular con 100% de confluencia. A partir de una botella con 100% de confluencia de células MRC-5 se realizó un subcultivo, primero se eliminó el medio nutritivo, lavando la monocapa celular con 2 ml de PBS, conteniendo antibiótico en proporción 500:1; se eliminó el PBS y se adicionaron 2.5 ml de solución tripsina-verseno (tripsina al 0.05% en verseno sódico al 0.05%) (*In vitro*, S.A), entre 45 y 60 segundos después, se eliminó esta mezcla; posteriormente se incubó la botella a 36.5°C durante 5-10 minutos, observando en el microscopio invertido, hasta la completa disgregación celular, después se hizo una suspensión de células, adicionando medio nutritivo( MEM) fresco, homogenizando por pipeteo suave para distribuir en nuevas botellas de cultivo celular. Se realizaron pases 1:2 a 1:4, completando el volumen con MEM, dependiendo de las dimensiones de la botella de cultivo celular, se llevó a incubación a 36.5°C con (5% de  $\text{CO}_2$ ) monitoreando el crecimiento celular cada 24 a 48 horas, haciendo cambio del medio nutritivo cada 48 a 72 horas, hasta observar la formación de la monocapa celular (100% de confluencia).

Para contar con reserva de las células MRC-5 se hizo su crioconservación a partir de una botella de 25  $\text{cm}^2$  que presentó 100% de confluencia; siguiendo la metodología descrita en el párrafo anterior hasta la disgregación celular; posteriormente se adicionó 1 ml de medio nutritivo (MEM) fresco, homogenizando; después se colocó la suspensión en un criovial y se centrifugó a

1252 x g/10 min, descartando el medio y adicionando mezcla de Dimetilsulfóxido (DMSO)-suero fetal bovino, proporción de 10% a 90% respectivamente. El criovial se lleva a congelamiento paulatino; primero a  $-20^{\circ}\text{C}$ /15 min, después a  $-70^{\circ}\text{C}$  varias horas para finalmente llevarlo al contenedor de nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) y en él conservarlas.

El uso de células MRC-5 crioconservadas para generar un subcultivo se logró retirando el criovial del nitrógeno líquido y dejándolo a temperatura ambiente para descongelarse, posteriormente se realizaron dos lavados centrifugando a 2817 x g/10 minutos para eliminar el DMSO, se observó el botón de células al que se le agregó 1 ml de MEM, homogenizando cuidadosamente por pipeteo; finalmente se colocó la suspensión celular en botella de cultivo de  $25\text{ cm}^2$ , dejando a  $36.5^{\circ}\text{C}$ /30 minutos, después se agregaron 5 ml de MEM, se incubó a  $36.5^{\circ}\text{C}$  (5% de  $\text{CO}_2$ ), observando el crecimiento y la confluencia en microscopio invertido cada 24 a 48 horas, cambiando el medio nutritivo si fuera necesario hasta observar la confluencia celular al 100%.

Para infectar la línea celular con CMVH, la botella de  $25\text{ cm}^2$  con la monocapa de fibroblastos de pulmón de embrión humano (MRC-5) con confluencia de alrededor del 80%, y sin medio nutritivo (MEM) se adicionó el virus descongelado y posteriormente se incubó la botella a  $36.5^{\circ}\text{C}$  (5% de  $\text{CO}_2$ ) por 30 minutos, homogenizando la botella cada 10 minutos, para permitir la adsorción del virus, favorecer su distribución y mantener la monocapa celular húmeda. Se agregaron alrededor de 4 ml de medio nutritivo (MEM), se llevó a incubación a  $36.5^{\circ}\text{C}$  (5% de  $\text{CO}_2$ ), observando al microscopio invertido cada 48 horas, buscando el efecto citopático (formación de focos bien delimitados de células redondas), agregando cada 4 días alrededor de 2 ml de MEM; hasta observar una infección significativa de las células.

Las células infectadas (MRC-5/CMVH) se pueden usar para reserva, haciendo una crioconservación, igual a la realizada para las células MRC-5 no infectadas, por lo tanto al observar la disgregación celular, se adicionó 1 ml de medio nutritivo (MEM) fresco, homogenizando, después se colocó la suspensión en un criovial y se centrifugó a 1252 x g/10 min, descartando el medio y adicionando mezcla de: DMSO como criopreservador al 10% con suero fetal bovino al 90%. El criovial se llevó a congelamiento paulatino; primero a  $-20^{\circ}\text{C}$ /15 min, después a  $-70^{\circ}\text{C}$  varias horas para finalmente llevarlo al contenedor de nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) y en él conservarlas.

Para la extracción de ADN de células infectadas (MRC-5/CMVH), se cosechó la línea celular infectada, usando un raspador estéril y recolectando el cultivo en un tubo cónico de 15 ml, después se llevó a centrifugación a 1252 x g/10 min, decantando y resuspendiendo en PBS a un volumen de 200  $\mu\text{l}$ .

Para la extracción de ADN de células MRC-5 no infectadas, se sigue el mismo procedimiento de cosecha que para las células MRC-5/CMVH, llevando a un volumen de 200  $\mu$ l con PBS.

Haciendo en ambos controles la extracción de ADN por el método de DNAzol, como se indicó anteriormente para las muestras sanguíneas.

### 5.5. Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los iniciadores utilizados en el presente trabajo se han reportados en la literatura (Brytting, 1991), caracterizándose por ser específicos para el CMVH y no dar amplificaciones con virus de la familia herpetoviridae. En la Tabla 4 se indica su secuencia y tamaño del producto que amplifican.

**Tabla 4. Oligonucleótidos a emplear para la amplificación de ADN del CMVH y de la  $\beta$ -actina como control interno**

Designación del iniciador	Secuencia de iniciadores	Tamaño del producto (pb)
C	5'-TGA GGA TAA GCG GGA GAT GT-3'	242
D	5'- ACT GAG GCA AGT TCT GCA GT-3'	
S- $\beta$ -actina	5'-GGA AAT CGT GCG TGA CAT TAA GG-3'	274
A- $\beta$ -actina	5'-TGT GTT GGC GTA CAG GTC TTT ACG-3'	

Los iniciadores C-D detectan secuencias conservadas de la región temprana inmediata (UL123) del CMVH.

El corrimiento de la PCR, fue de una desnaturalización inicial a 92°C durante 5 minutos y 40 ciclos posteriores, cada uno con desnaturalización a 92° C por 30 segundos, alineamiento a 53° C por 30 segundos y la extensión a 72° C por 30 segundos; un último paso de extensión final a 72° C durante 10 minutos. Condiciones de corrimiento que aplicaron también para los iniciadores de la  $\beta$ -actina, éstos últimos se usan con el objeto de comprobar el funcionamiento del sistema de la PCR, debido a que los iniciadores de la  $\beta$ -actina amplifican su producto específico en un rango amplio de temperatura y de concentraciones de los componentes de la técnica.

El establecimiento de las condiciones de trabajo de la PCR incluyó la definición de la mejor concentración del  $MgCl_2$  para los iniciadores C y D. Para establecer dicha concentración, el  $MgCl_2$  fue titulado a las concentraciones de 2.5, 5 y 10mM.

Así mismo, para establecer la concentración más adecuada del  $MgCl_2$  en la PCR para  $\beta$  actina, primero fue titulado a las concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 5 y 10mM en las condiciones ya indicadas de la PCR, pero además se hizo un precalentamiento a 95°C durante 3 minutos antes de agregar la Taq polimerasa al corrimiento de la PCR, después de esto se continuó con los pasos y ciclos indicados arriba.

Debido a la intención de uniformar las condiciones de corrimiento de la PCR tanto de iniciadores C-D, como de los iniciadores de la  $\beta$ -actina, también se corrió la PCR para los iniciadores C-D sin y con precalentamiento previo al procedimiento de la PCR.

Habiendo establecido la concentración adecuada de  $MgCl_2$  para ambos pares de iniciadores, se definió la cantidad adecuada del ADN plantilla, para lo que se hicieron corrimientos del control positivo (MRC-5/CMVH) y del control negativo (MRC-5) con 0.5, 1.0 y 2.0  $\mu$ g, en tanto que para las muestras de pacientes se realizaron corrimientos con cantidades de ADN blanco de 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0  $\mu$ g.

En la Tabla 5 se indican las condiciones estándares de cada uno de los componentes de la PCR, manejando un volumen final de 50  $\mu$ l.

Respecto a las concentraciones de cada componente en la reacción de PCR; el buffer de reacción fue de 1X, la mezcla de dNTPs fue de 0.5 mM, es decir 125  $\mu$ M de cada desoxinucleótido: dATP, dTTP, dCTP y dGTP; y de Taq polimerasa se usaron 2 Unidades, (todos Promega), respecto a cada iniciador se trabajó a 0.2  $\mu$ M (Sigma, Aldrich,Química, C= Cat. 90605-001 y D=Cat. 90605-002;  $\beta$ -Actina =3760-4001639).

Los controles que se incluyeron en cada corrimiento de la PCR, se caracterizaron por incluir a todos los componentes del sistema, pero en el primer control no se adicionan los iniciadores correspondientes, en tanto que en el segundo control no se agrega ADN blanco.

Se incluyó en cada corrimiento de PCR, el ADN de células MRC-5 no infectadas como control negativo y el ADN de células MRC-5 infectadas con CMVH (MRC-5/CMVH), como control positivo.

**Tabla 5. Condiciones estándares de volúmenes y concentraciones de cada uno de los reactivos para los iniciadores de C-D y los iniciadores de  $\beta$ -actina**

Componente	Volumen ( $\mu$ l)	Volumen ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O miliQ estéril	csp 50	csp 50
Buffer PCR stock (10X)	5	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	20	20
dNTP's (10mM)	2.5	2.5
Iniciador C 10 <sup>-5</sup> M	1.0	No
Iniciador D 10 <sup>-5</sup> M	1.0	No
Iniciador S $\beta$ -Actina 10 <sup>-5</sup> M	no	1.0
Iniciador AS $\beta$ -Actina 10 <sup>-5</sup> M	no	1.0
ADN plantilla	varió	varió
Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0.8(1:2)	0.8(1:2)

csp=cuanto es suficiente para.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Biometra T Gradient).

Establecidas las condiciones adecuadas para la PCR, se evaluaron inicialmente los dos ADN de las muestras de los pacientes, ya sea el obtenido a partir de células mononucleares así como el obtenido a partir de sangre completa (células leucocitarias).

Sin embargo posteriormente se evaluaron solo una de las dos muestras por toma de sangre por paciente, debido a que se obtuvieron resultados similares, independientemente de la fuente original para extracción de ADN.

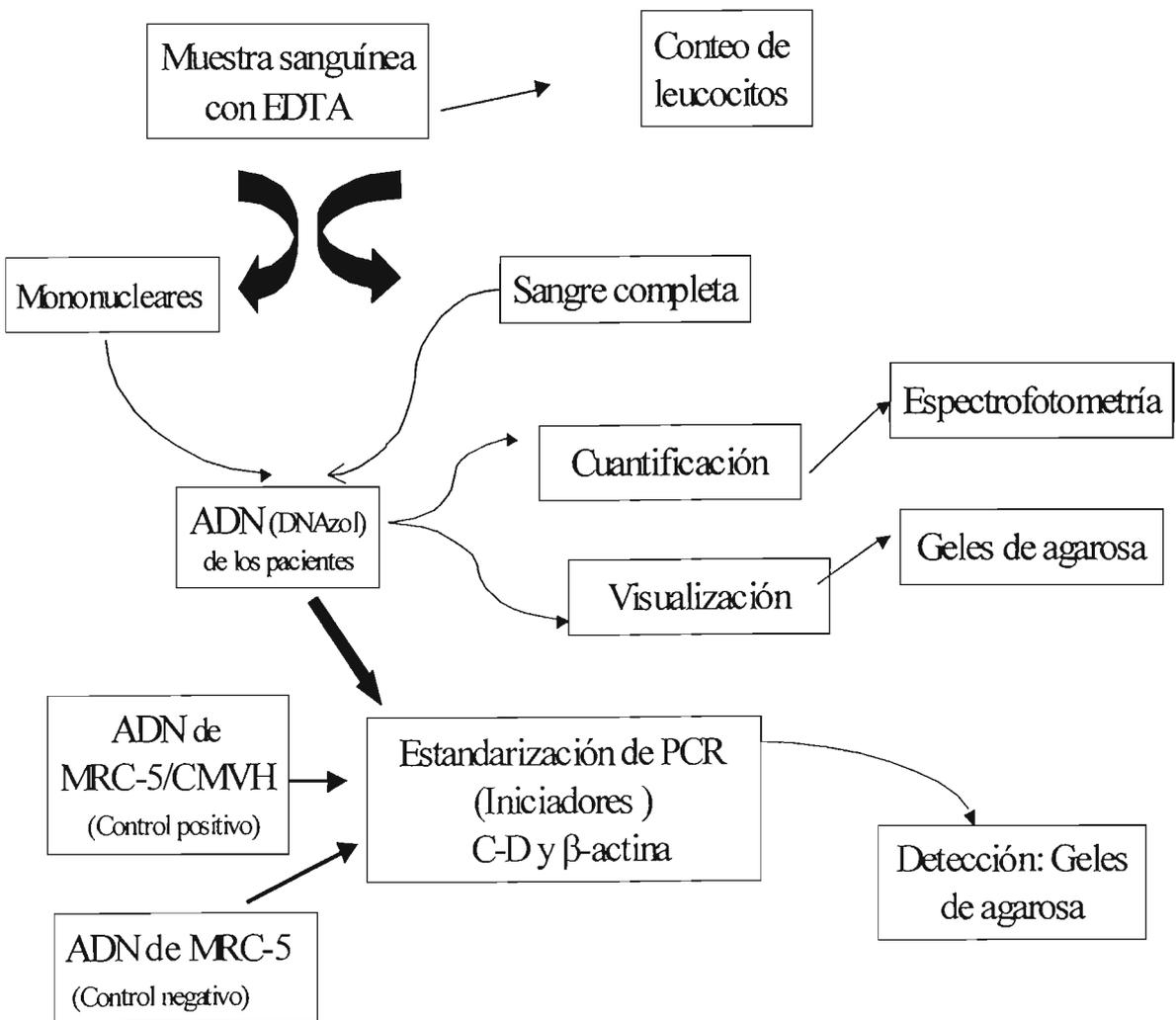
Para observar los productos resultantes de la PCR, éstos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

## 5.6. Electroforesis en geles de agarosa.

Para confirmar la integridad del ADN obtenido, así como para observar los productos resultantes de la PCR se realizó el corrimiento electroforético de las muestras correspondientes en geles de agarosa. El gel de agarosa (Gibco BRL, N°.Cat. 15510-019) al 1%, se preparó en una solución de TBE (0.5X) disolviéndola por calor, se dejó que alcanzara 50-60° C y se adicionaron 11.7  $\mu$ l de bromuro de etidio (10 mg/ml solución stock; ICN, No. Cat. 802511) considerando un volumen de 70 ml de agarosa; posteriormente se vertió en el molde de la cámara de electroforesis con el peine correspondiente y una vez polimerizado, se llenó la cámara con solución TBE 0.5X.

Por separado, se mezclaron 5  $\mu$ l de cada producto de PCR y 2  $\mu$ l de solución de carga 6x, y se depositaron en cada carril; así mismo, para confirmar la eficiencia de la amplificación de la PCR, el producto del cDNA de la  $\beta$ -actina (control interno) fue utilizado; además se incluyó una escalera (marcador) de 123 pares de bases (pb) (GIBCO), para verificar el tamaño del producto obtenido. Concluida la electroforesis, el gel se observó sobre un haz de luz ultravioleta. Reportando la prueba como positiva cuando se presentaba una banda de producto de 242 pb para los iniciadores C-D específicos para la detección del CMVH.

En el esquema se integra la metodología realizada.



## 6.0. RESULTADOS

### 6.1. Pacientes y diseño del estudio.

Se estudiaron a 11 pacientes, con un rango de edad de 17 a 49 años; 6 hombres y 5 mujeres, con las siguientes afecciones hematológicas: leucemia mielocítica crónica (LMC) 4 hombres y 1 mujer, leucemia mieloblástica aguda (LMA) 1 hombre y 3 mujeres, y leucemia linfoblástica aguda (LLA) 1 hombre y una mujer. A todos se les realizó trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH), en 9 fue alogénico y en 2 fue autólogo, éstos últimos con LMA (ver Tabla 1).

En base al plan de recolección de 8 muestras por paciente, la primera fue en la fase de condicionamiento (de cuatro a cinco días antes del trasplante), la segunda el día del trasplante, considerado como día 0, de la tercera a la sexta muestras fueron recolectadas en el primer mes post-trasplante en los días 7, 14 21 y 28 (una cada semana), la séptima y octava recolecciones, se realizaron a los 60 y 90-100 días post-trasplante respectivamente, el número recolectado por paciente fue de 3 a 6 muestras sanguíneas, dando un total de 51 muestras sanguíneas de los 11 pacientes estudiados.

### 6.2. Colección y tratamiento de muestras clínicas.

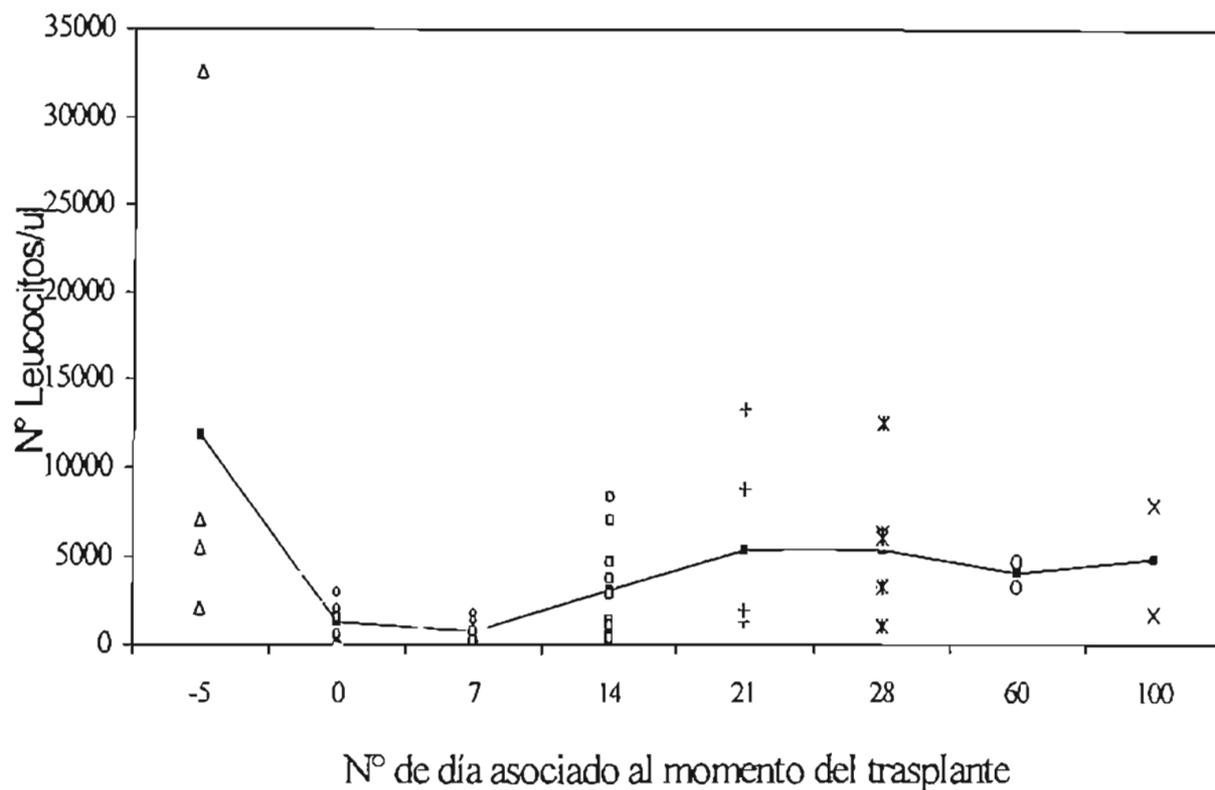
El tratamiento de las muestras de los pacientes, tuvo por objetivo contar con material biológico fuente de ADN para su posterior extracción. Las muestras sanguíneas se procesaron por 2 métodos, el primero para obtención de células mononucleares por gradiente de densidad, que se aplicó en todas las muestras y el segundo, para obtención de todas las células leucocitarias, que se realizó a partir de sangre completa de 49 muestras.

La cuantificación de leucocitos se realizó por el método de Turck, para evaluar el nivel de recuperación de la población de leucocitos en los pacientes a lo largo del presente estudio

En la Figura 2 se presenta el conteo de leucocitos/ $\mu$ l de cada muestra (46 cuantificadas) y el promedio en los diferentes días de recolección de muestras, asociadas al procedimiento del TCPH; observándose la concentración mayor en el periodo previo al procedimiento y una baja significativa al momento del procedimiento y 7 días después, para presentarse una recuperación paulatina posteriormente.

V=5000 a 10.000/ul

**Figura 2. Conteo de leucocitos de pacientes trasplantados en los diferentes días del procedimiento**



Promedio	11856	1334	804	3142	5487	5443	4050	4825
Desv. std	13990	910	518	2864	5359	4029	989	4348
Nº Muestras	4	8	9	10	5	6	2	2

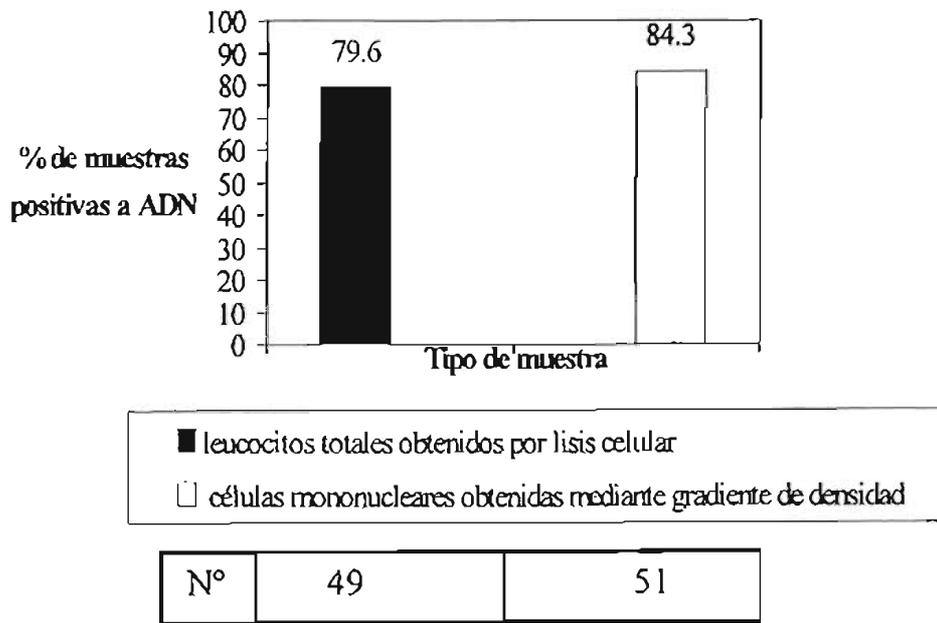
Día - 5 (5 días antes del TCPH) se les aplicó tratamiento para inmunosupresión (acondicionamiento)

### 6.3. Extracción, detección y cuantificación de ADN a partir de las muestras de los pacientes.

Se realizó la extracción de ADN a partir de células mononucleares y de células leucocitarias en cada muestra sanguínea, obteniendo 2 concentrados de ADN por muestra.

Para detectar la presencia del ADN de las muestras se usó el método de electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio como medio de tinción, considerando el resultado positivo por presencia de banda evidente o por presencia de banda tenue. En la Figura 3, se observan los resultados promedio obtenidos de la detección de ADN, habiendo usado células leucocitarias (método de lisis) y células mononucleares (método de gradiente de densidad), como material para la extracción de ADN, encontrándose mayor evidencia de ADN (43 de 51 muestras, 84.3%) al usar células mononucleares como fuente de ADN, en contraste con la menor evidencia de ADN (39 de 49 muestras, 79.6%) al usar sangre completa (células leucocitarias).

**Figura 3. Comparación de la detección de ADN a partir de muestras sanguíneas de pacientes por electroforesis en gel de agarosa**



Obtenido el ADN por el método de DNAzol a partir de ambas fuentes de material biológico de cada paciente, se midió espectrofotométricamente la concentración de ADN en base a la fórmula siguiente:  $A_{260} \times \text{dilución ADN} \times 50 \mu\text{g} / \text{ml} \times 1 \text{ ml} / 1000 \mu\text{l}$ .

La dilución de cada muestra que se usó en el presente trabajo fue de 1:501; por lo tanto la concentración de ADN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) =  $A_{260} \times 501 \times 50 \mu\text{g}/\text{ml} \times 1 \text{ ml}/1000 \mu\text{l} = A_{260} \times 25.05$ ; ejemplificando el cálculo de una muestra, queda de la siguiente manera, siendo la  $A_{260}$  de la muestra de 0.043, el cálculo será  $0.043 \times 25.05 = 1.08 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

En la Tabla 6, se indica la concentración de ADN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de cada muestra sanguínea por paciente a partir de sus células mononucleares y a partir de sus células leucocitarias respectivamente, así como el promedio de una y otra. El promedio de concentración de ADN obtenido a partir de mononucleares fué de  $0.82 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  y el correspondiente a partir de las células leucocitarias fue de  $0.66 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

En cada muestra obtenida de ADN de ambas fuentes de material biológico de cada paciente, se realizaron las lecturas de absorbancia (A) en el espectrofotómetro a 260 nm y a 280 nm, estableciendo el cociente de ambas lecturas  $A_{260}/A_{280}$ , que indica la pureza de ADN; resultando el promedio de pureza de ADN, de 2.6 con los mononucleares como fuente de extracción y de 2.1 siendo la sangre completa (células leucocitarias) la fuente de extracción.

**Tabla 6. Concentración y pureza de ADN a partir de mononucleares y células leucocitarias de cada muestra sanguínea.**

	A = Mononucleares				B = Células leucocitarias			
	Código de muestra	Etapas Trasp./día	Concentración de ADN $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Cociente $A_{260}/A_{280}$	Código de muestra	Etapas Trasp./día	Concentración de ADN $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Cociente $A_{260}/A_{280}$
1	1-4A	14	0.80	4.4	1-4B	14	0.57	4.2
2	1-5A	21	0.59	4.3	1-5B	21	2.01	1.6
3	1-6A	28	0.51	3.4	1-6B	28	0.60	1.7
4					1-7B	60	1.26	2.8
5					1-8B	100	0.56	2.8
6	2-1A	Pretrasp	0.84	1.9	2-1B	Pretrasp	0.18	3.0
7	2-2A	0	0.18	2.0	2-2B	0	0.24	2.0
8	2-3A	7	0.53	2.5	2-3B	7	0.50	3.3
9	2-4A	14	0.21	2.8	2-4B	14	0.32	1.8
10	2-6A	28	0.66	3.1	2-6B	28	0.11	0.2
11	2-7A	60	0.26	1.4	2-7B	60	0.42	1.5
12	3-1A	Pretrasp	0.62	2.9	3-1B	Pretrasp	0.45	1.4
13	3-2A	0	0.17	2.8	3-2B	0	0.38	1.9
14	3-3A	7	1.70	3.6	3-3B	7	0.89	2.5
15	3-4A	14	0.48	2.1				

16	3-5A	21	1.96	2.8	3-5B	21	0.63	1.7
17	3-6A	28	1.35	2.1	3-6B	28	0.48	1.6
18	4-2A	0	0.74	3.1	4-2B	0	0.30	3.3
19	4-3A	7	2.42	3.2	4-3B	7	1.10	2.1
20	4-4A	14	1.08	2.1				
21	4-6A	28	0.90	2.5	4-6B	28	0.11	5.0
22	5-2A	0	2.62	3.5	5-2B	0	0.83	1.8
23	5-3A	7	0.83	3.9	5-3B	7	0.99	3.5
24	5-4A	14	0.39	1.9	5-4B	14	0.56	2.8
25	5-6A	28	0.23	1.9	5-6B	28	0.20	1.9
26	5-8A	100	0.36	2.4	5-8B	100	0.56	0.2
27	6-2A	0	2.77	3.5	6-2B	0	0.81	2.0
28	6-3A	7	1.22	3.1	6-3B	7	1.17	3.9
29	6-4A	14	0.59	2.2	6-4B	14	1.01	1.8
30	6-5A	21	0.23	3.0	6-5B	21	0.44	2.4
31	6-6A	28	0.06	4.0	6-6B	28	0.71	1.6
32	7-3A	7	0.75	1.9	7-3B	7	1.38	1.3
33	7-4A	14	0.17	1.1	7-4B	14	0.54	2.1
34	7-5A	21	0.21	1.4	7-5B	21	0.11	1.4
35	8-1A	Pretras	3.19	3.4	8-1B	Pretras	1.01	1.7
36	8-2A	0	1.11	3.4	8-2B	0	0.65	2.9
37	8-4A	14	0.59	2.4	8-4B	14	0.77	1.9
38	8-5A	21	0.78	2.9	8-5B	21	0.92	2.0
39	9-2A	0	0.15	1.7	9-2B	0	0.87	1.9
40	9-3A	7	0.51	2.0	9-3B	7	0.59	2.3
41	9-4A	14	0.53	2.5	9-4B	14	0.38	1.9
42	10-1A	Pretras	0.35	1.9	10-1B	Pretras	0.74	1.8
43	10-2A	0	0.48	1.8	10-2B	0	0.71	1.6
44	10-3A	7	0.56	1.4	10-3B	7	0.77	2.4
45	10-4A	14	0.95	4.2	10-4B	14	0.47	2.6
46	11-1A	Pretras	0.78	1.8	11-1B	Pretras	0.63	1.7
47	11-2A	0	0.87	1.8	11-2B	0	0.69	2.1
48	11-3A	7	1.29	1.87	11-3B	7	1.35	1.9
49	11-4A	14	0.87	3.4	11-4B	14	0.66	2.2
50	11-5A	21	0.51	2.6	11-5B	21	0.48	2.4
51	11-6A	28	0.42	2.2	11-6B	28	0.27	1.3
		Promed.	0.82	2.6		Promed.	0.66	2.1
		Des. std.	0.72	0.83		Des. Est	0.38	0.9

Pretras = Pretrasplante. Tras = Trasplante. Promed = Promedio Des. std. = Desviación estándar.

#### **6.4. Cultivo del Citomegalovirus humano *in vitro*, extracción y cuantificación del ADN.**

La expansión de la línea celular MRC-5 (fibroblastos de pulmón de embrión humano) *in vitro*, se realizó en un periodo de 2 a 3 días, este cultivo se utilizó para subcultivo o para infección con CMVH y para crioconservación de ambos.

Con el objeto de contar con más células MRC-5 frescas, se realizó subcultivo de éstas, lográndose el 100% de confluencia de la monocapa entre los días 6 y 8 de iniciado el mismo, resultados iguales se obtuvieron cuando se hizo el subcultivo a partir de células MRC-5, crioconservadas.

La infección de la línea celular MRC-5 con CMVH (MRC-5/CMVH) se monitoreó utilizando el microscopio invertido para observar un efecto citopático significativo (formación de focos bien delimitados de células redondas), aproximadamente el 90% de las células, en el presente trabajo se necesitó un periodo de 12 a 15 días para alcanzar dicho resultado.

La crioconservación de las células infectadas (MRC-5/CMVH) a  $-196^{\circ}$  C, es similar al proceso para las células MRC-5, se lograron obtener varios crioviales en el presente trabajo.

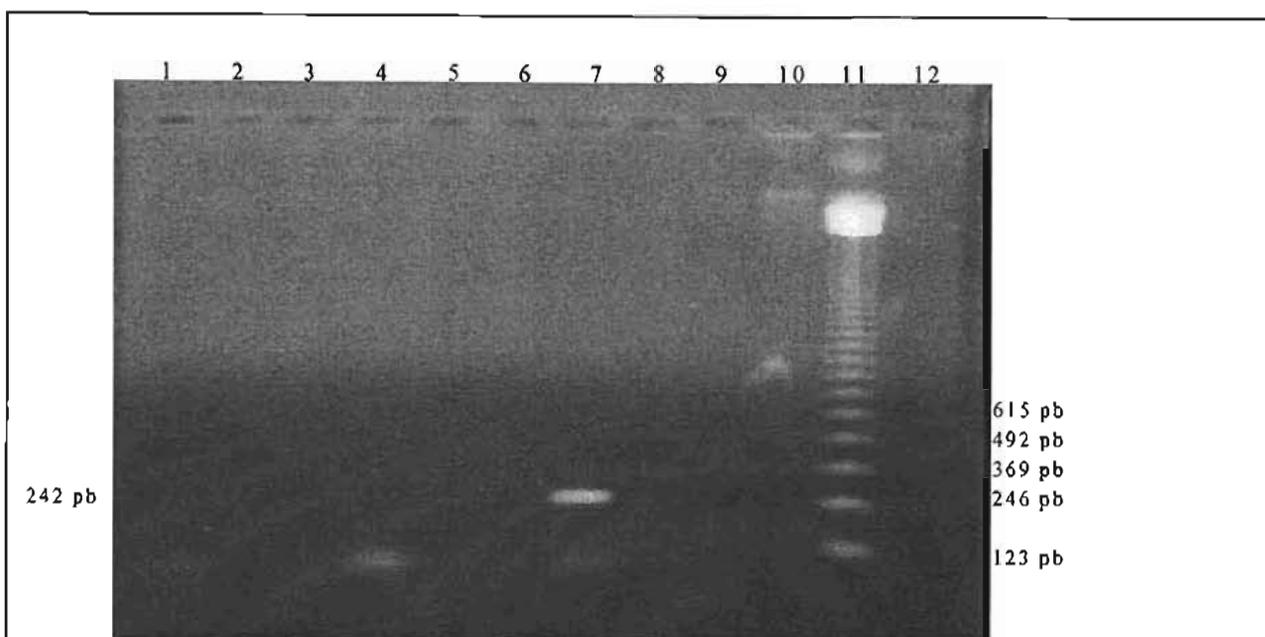
La extracción de ADN de ambos controles, MRC-5/CMVH y de MRC-5, se hizo por el método de DNazol. Respecto a la cuantificación del ADN de los controles, el promedio de la concentración de ADN de MRC-5 (células no infectadas), obtenido de varias cosechas realizadas a lo largo del trabajo, fue de  $0.41 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  y el promedio de la concentración de ADN del cultivo de células infectadas (MRC-5/CMVH) obtenido en varias cosechas, fue de  $0.26 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

#### **6.5. Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Con el propósito de establecer las condiciones de trabajo para el corrimiento de PCR tanto para los iniciadores C-D como para el control interno de  $\beta$  actina, se hicieron corrimientos de la técnica a concentraciones diferentes de  $\text{MgCl}_2$ , (2.5, 5 y 10 mM) encontrándose que solo con la concentración de 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  se logró obtener la banda del producto específico (242 pb) para CMVH, bajo las condiciones de corrimiento del sistema, que fue de una desnaturalización inicial de  $92^{\circ}$  C durante 5 minutos y 40 ciclos posteriores, cada uno con desnaturalización a  $92^{\circ}$ C por 30 segundos, alineamiento a  $53^{\circ}$  C por 30 segundos y la extensión a  $72^{\circ}$ C por 30 segundos; un último paso de extensión final a  $72^{\circ}$  C durante 10 minutos. Cabe mencionar que estas condiciones de corrida se compararon en dos situaciones, realizando un precalentamiento

de 95° C durante 30 segundos y sin precalentamiento; el producto esperado de 242 pb, se obtuvo solamente cuando al sistema no se le realizó el precalentamiento.

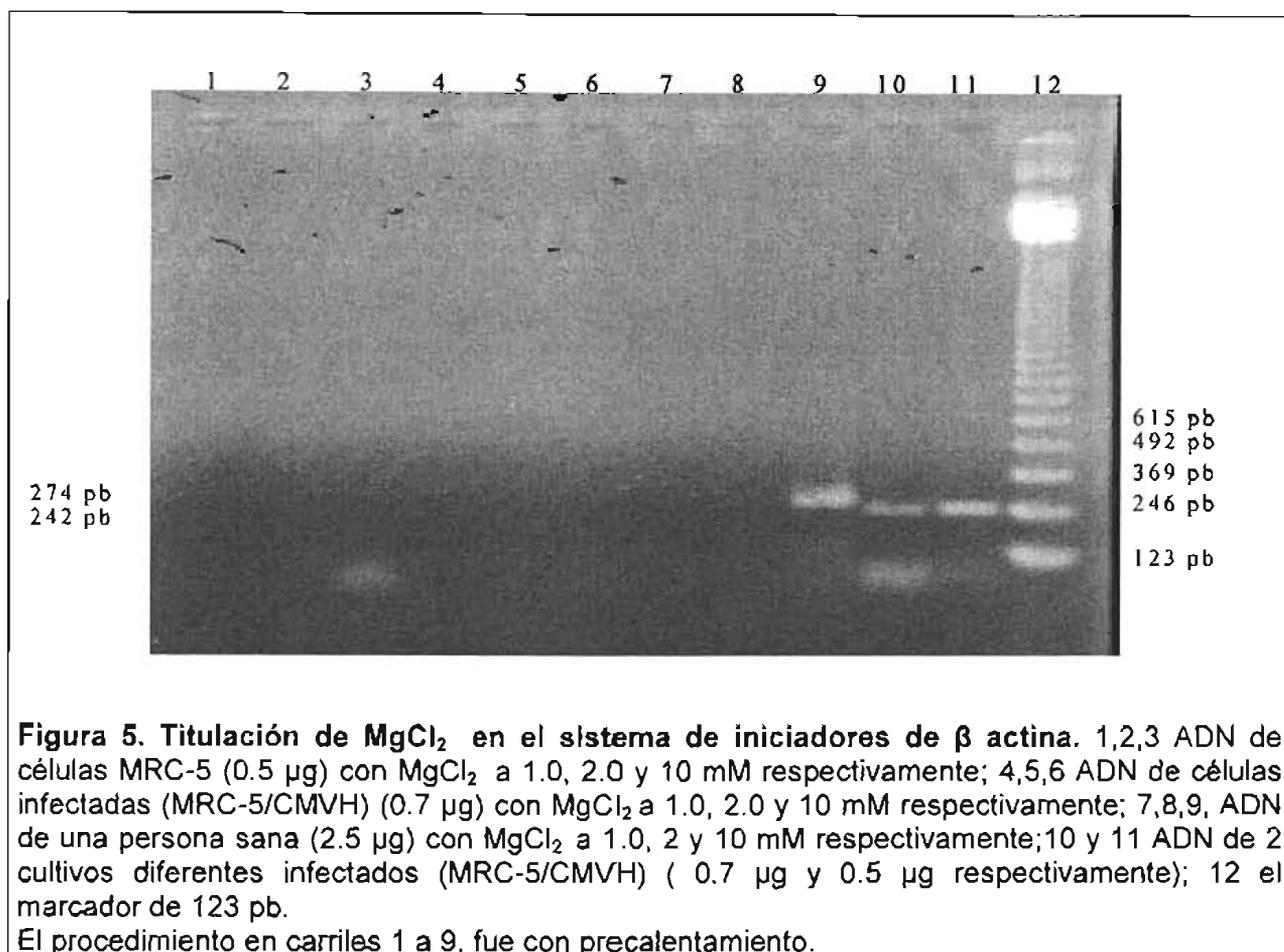
En la electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio de la Figura 4 se observa que solo en el carril 7 (10 mM de MgCl<sub>2</sub>) se presentó la banda correspondiente al producto esperado de los iniciadores C-D, y los resultados fueron negativos para las concentraciones 2.5 y 5 mM, carriles 5 y 6, respectivamente.



**Figura 4. Titulación de MgCl<sub>2</sub> en el sistema de iniciadores C-D.** 1 sistema sin ADN; 2,3,4 ADN de células MRC-5 (0.5 µg) con MgCl<sub>2</sub> a 2.5, 5 y 10 mM respectivamente; 5,6,7 ADN de células infectadas (MRC-5/CMVH) (0.5 µg) con MgCl<sub>2</sub> a 2.5, 5 y 10 mM respectivamente; 8,9,10 ADN de muestra sanguínea de un paciente (2.9 µg) con MgCl<sub>2</sub> a 2.5, 5 y 10 mM respectivamente; 11 el marcador de 123 pb.

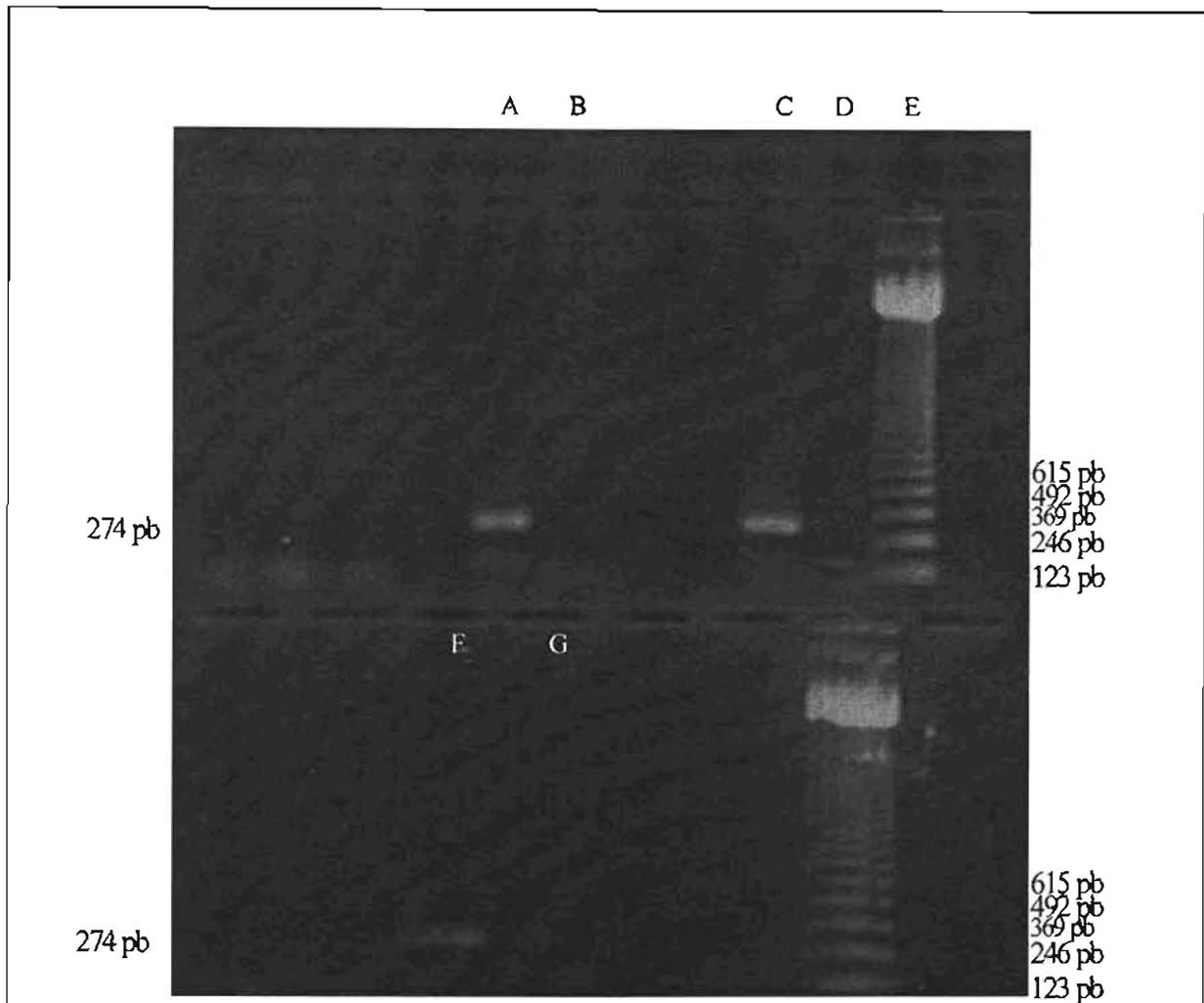
Respecto al resultado de la titulación del MgCl<sub>2</sub> para la PCR con los iniciadores de β actina, se planteó una primera titulación de MgCl<sub>2</sub> a las condiciones de la PCR descritas anteriormente para los iniciadores C-D, implicando las concentraciones de 2.5, 5.0 y 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, no dando el producto específico esperado de 274 pb (resultados no mostrados); se tituló nuevamente el MgCl<sub>2</sub> a las concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 mM obteniéndose también resultados negativos. Finalmente se corrió a las concentraciones de 1.0, 2.0 y 10 mM, pero se consideró incluir un tratamiento de precalentamiento del sistema a 95° C durante 3 minutos, previo a las condiciones ya descritas de la PCR para C-D, que resultó ser un tratamiento indispensable para el proceso, variable que se detalla posteriormente. En la Figura 5 se observa la banda de producto específico (274 pb) para los iniciadores correspondientes de la β-actina,

que se detectó solo a la concentración 10 mM de  $MgCl_2$  (carril 9). Así mismo, se muestra el producto específico (242 pb) para los iniciadores C-D de CMVH (carriles 10 y 11), en condiciones sin precalentamiento para este par de iniciadores.



Respecto a las condiciones de corrimiento de la PCR para la  $\beta$  actina, y debido a que a pesar del amplio rango usado de concentraciones de  $MgCl_2$  (a las condiciones de la PCR para los iniciadores C-D) no se presentaba la amplificación esperada, se consideró titular nuevamente al mismo rango, pero incluyendo el precalentamiento del sistema a 95°C durante 3 minutos, previo al corrimiento de la PCR, que implicó incluir la concentración de  $MgCl_2$  a 10 mM, pues así resultó adecuado para los iniciadores de interés en el trabajo, como se explicó anteriormente. El resultado fue que se presentó el producto esperado de 274 pb, en el sistema que se corrió con precalentamiento. En la Figura 6, en los carriles A, C y F, se observa el producto específico de 274 pb, que tienen ADN de muestras sanguíneas de personas sanas; en los carriles B, D y G, son las respectivas muestras de ADN de las anteriores pero sin precalentamiento, en los que no

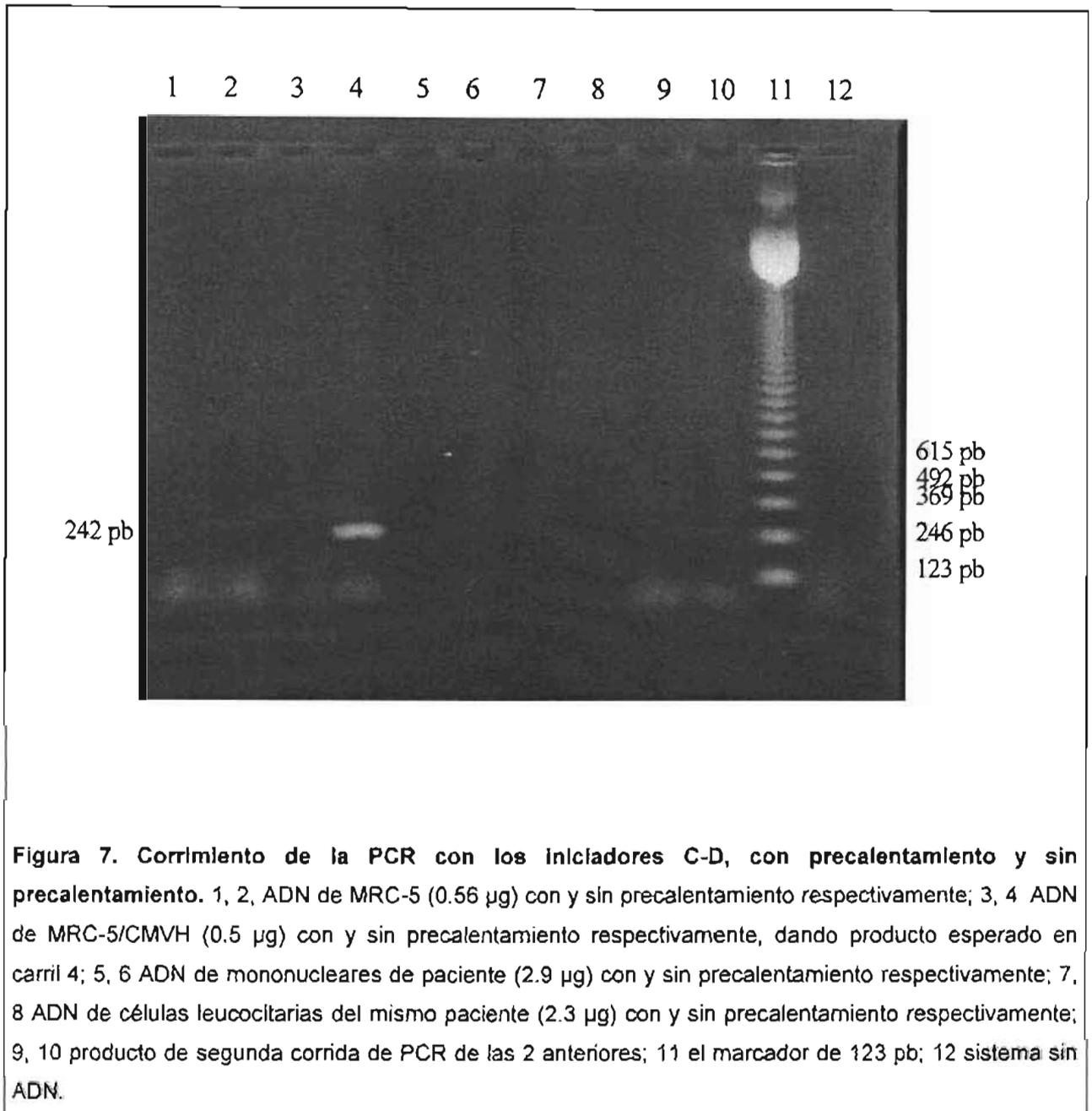
se observó el producto esperado. En los carriles A y F es el mismo ADN a concentraciones de 2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , respectivamente, en el carril E se colocó la escalera de 123 pb.



**Figura 6. PCR con y sin precalentamiento en el sistema de iniciadores de  $\beta$  actina.** A, B = ADN (2.5  $\mu\text{g}$ ) de muestra sanguínea de individuo sano con precalentamiento y sin precalentamiento respectivamente; C, D = ADN (0.95  $\mu\text{g}$ ) de muestra sanguínea de otro individuo sano, con precalentamiento y sin precalentamiento respectivamente; F, G = ADN (0.5  $\mu\text{g}$ ) de la primer persona con precalentamiento y sin precalentamiento respectivamente; E = el marcador de 123 pb.

Con el propósito de establecer condiciones de corrimiento de la PCR similares entre el control interno de  $\beta$  actina y los iniciadores C-D del CMVH, se consideró la inclusión del precalentamiento previo por 3 minutos a 95°C para estos últimos. Resultando que el precalentamiento inhibe la amplificación del producto específico de los iniciadores C-D. En la electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio de la Figura 7 se observa en el carril 3 que no amplificó el control de células MRC-5 infectadas con CMVH (MRC-

5/CMVH) habiendo precalentado el sistema, en tanto que en el carril 4 se observa el producto esperado, usando el mismo ADN de MRC-5/CMVH, sin precalentamiento del sistema.

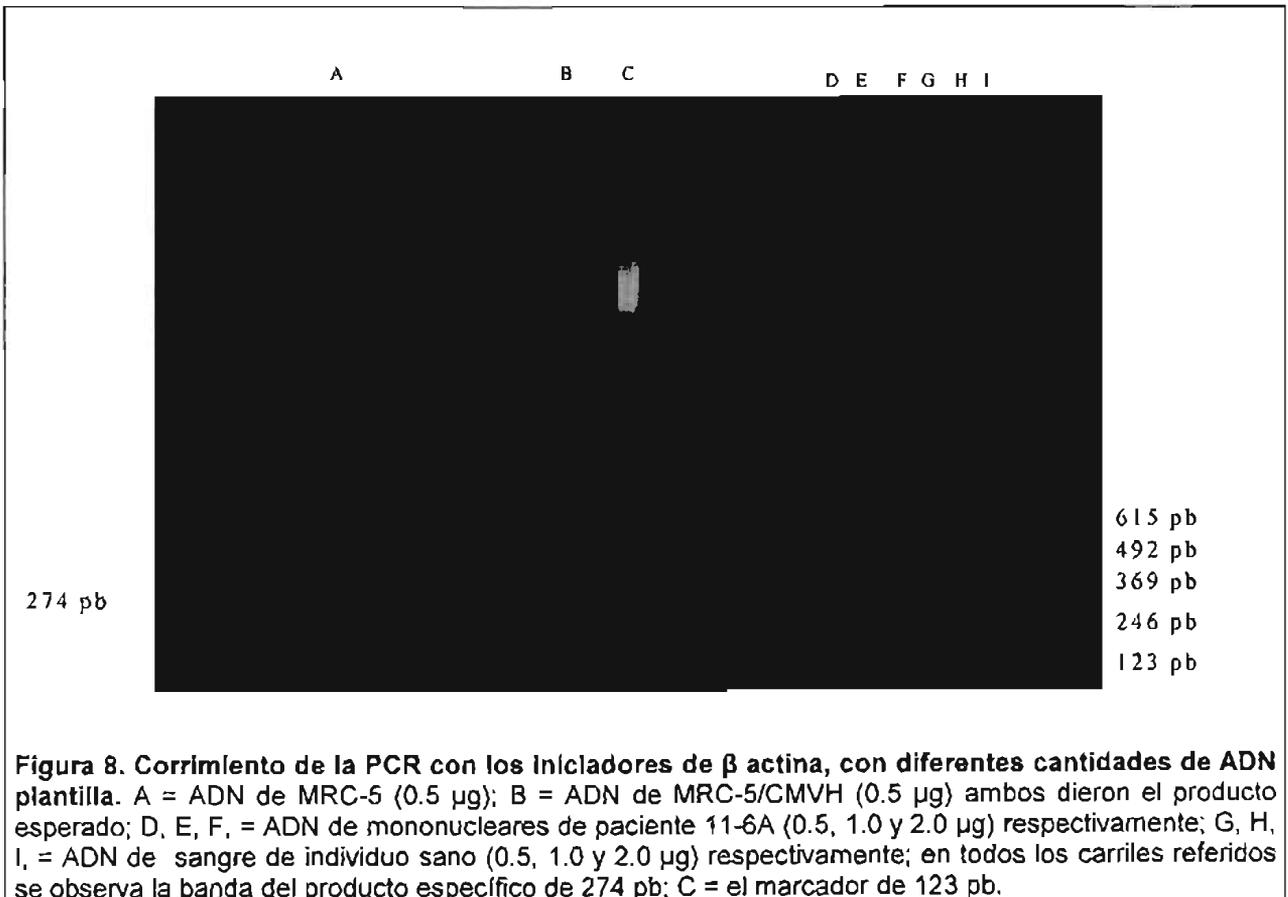


**Figura 7. Corrimiento de la PCR con los iniciadores C-D, con precalentamiento y sin precalentamiento.** 1, 2, ADN de MRC-5 (0.56 µg) con y sin precalentamiento respectivamente; 3, 4 ADN de MRC-5/CMVH (0.5 µg) con y sin precalentamiento respectivamente, dando producto esperado en carril 4; 5, 6 ADN de mononucleares de paciente (2.9 µg) con y sin precalentamiento respectivamente; 7, 8 ADN de células leucocitarias del mismo paciente (2.3 µg) con y sin precalentamiento respectivamente; 9, 10 producto de segunda corrida de PCR de las 2 anteriores; 11 el marcador de 123 pb; 12 sistema sin ADN.

Otra variable que se estandarizó para el corrimiento de la PCR con ambos pares de iniciadores, para  $\beta$  actina y para C-D de CMVH, fue la determinación de la cantidad óptima de ADN de los controles y de las muestras problema.

Para  $\beta$  actina se hizo el corrimiento con ADN de controles y de muestras problema con 0.5, 1.0 y 2.0  $\mu\text{g}$ ; resultando adecuadas las tres cantidades para muestras problema; en tanto que para MRC-5 y MRC-5/CMVH se encontró una cantidad adecuada de 0.5  $\mu\text{g}$  (resultado no consistente).

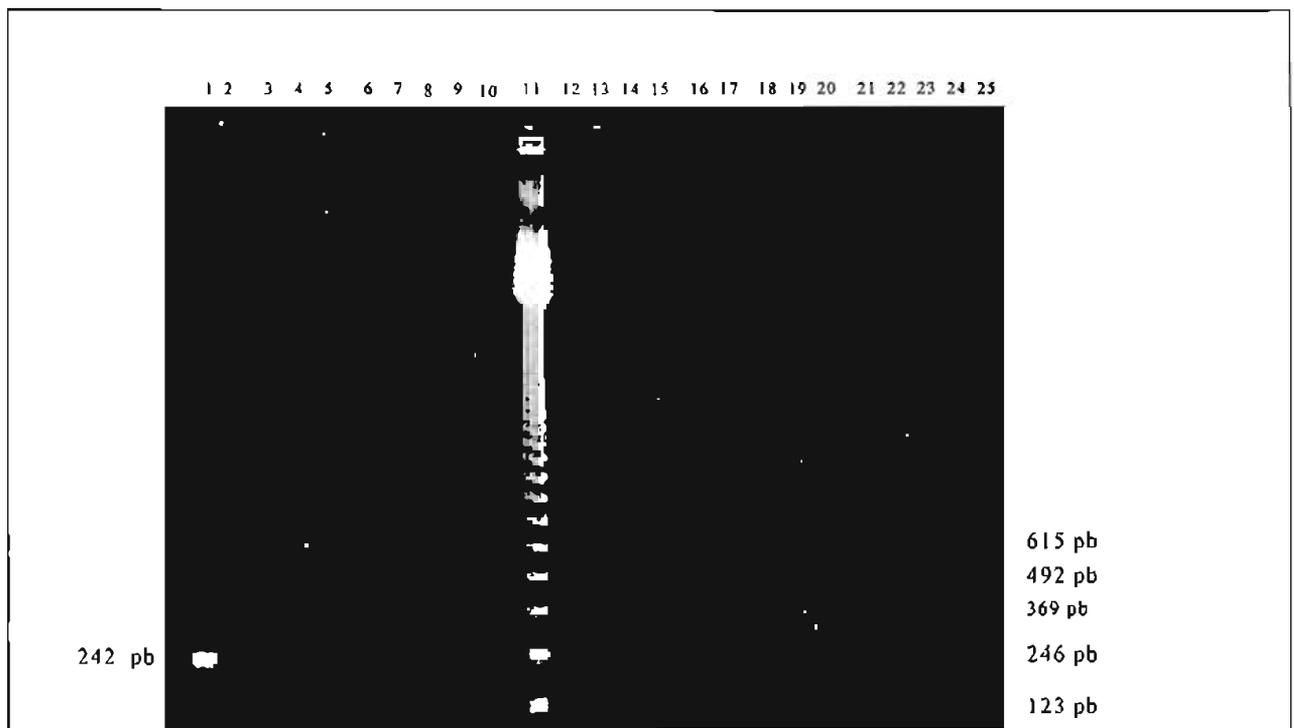
En la electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio de la Figura 8, se observa el producto esperado en los carriles D, E, F que son de paciente y en los carriles G, H, I del control normal en cantidades de 0.5, 1.0 y 2.0  $\mu\text{g}$ , respectivamente; en tanto que en los carriles A y B se observa el producto esperado (banda muy tenue), usando 0.5  $\mu\text{g}$  de ADN de cultivo de MRC-5 y de cultivo de MRC-5/CMVH respectivamente



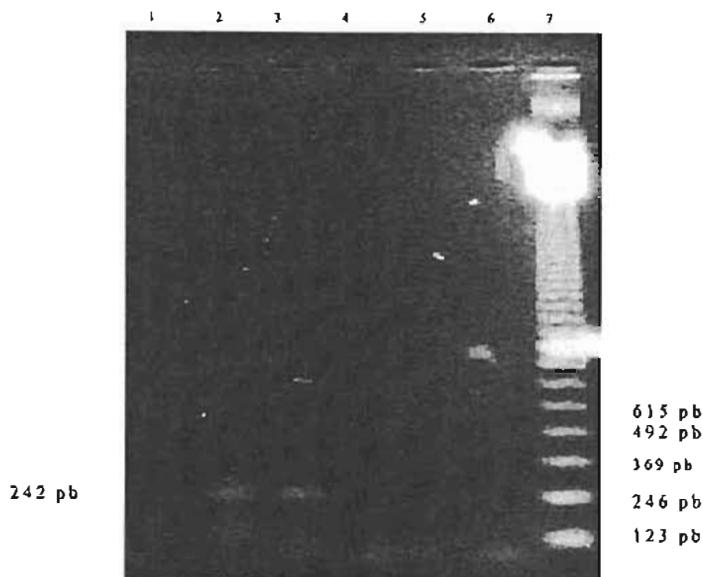
Para los iniciadores de C-D, se trabajó el ADN plantilla de MRC-5/CMVH, de MRC-5 y de muestras de pacientes en cantidades de 0.5, 1.0 y 2.0  $\mu\text{g}$ ; en la Figura 9A, se observa el producto específico con células infectadas (MRC-5/CMVH) en el carril 1 usando 0.5  $\mu\text{g}$  de ADN

y en los carriles 7 y 8 con otro ADN de MRC-5/CMVH en cantidades de 0.5 y 1.0  $\mu$ g, respectivamente (banda muy tenue).

Debido al resultado anterior, en el siguiente corrimiento de PCR se incluyó la cantidad de 1.5  $\mu$ g de ADN del control positivo; en la Figura 9B, se presenta la titulación de ADN plantilla del control positivo, observándose en los carriles 2 y 3 el producto de 242 pb usando 0.5 y 1.0  $\mu$ g de ADN respectivamente; sin embargo, usando cantidades mayores de 1  $\mu$ g se inhibe la amplificación de este producto (1.5, 2.0 y 2.5  $\mu$ g, carriles 45 y 6, respectivamente).

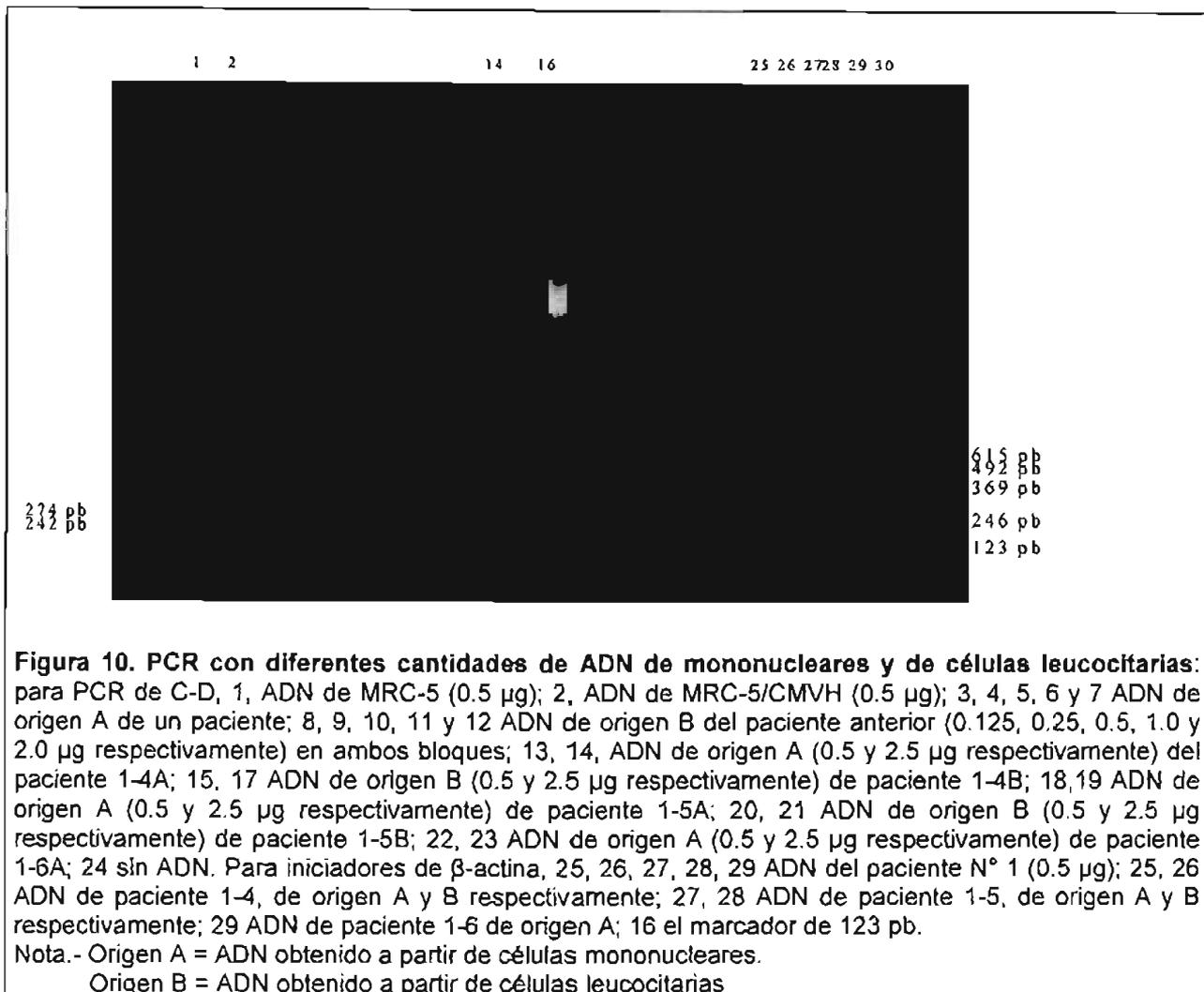


**Figura 9A. Corrimiento de la PCR con los iniciadores de C-D, con diferentes cantidades del ADN plantilla de controles y de muestras de pacientes. 1, 2, 3 MRC-5/CMVH; 4, 5, 6 MRC-5; 7, 8, 9, es de otro cultivo de MRC-5/CMVH; 10, 12, 13 ADN de otro cultivo de MRC-5; 14, 15, 16 mononucleares de paciente; 17, 18, 19 células leucocitarias del paciente anterior; 20, 21, 22 es de mononucleares de paciente 11-6A ; todos los ADN están en cantidades de 0.5, 1.0 y 2.0  $\mu$ g respectivamente; 11 el marcador de 123 pb; 23 sin ADN.**



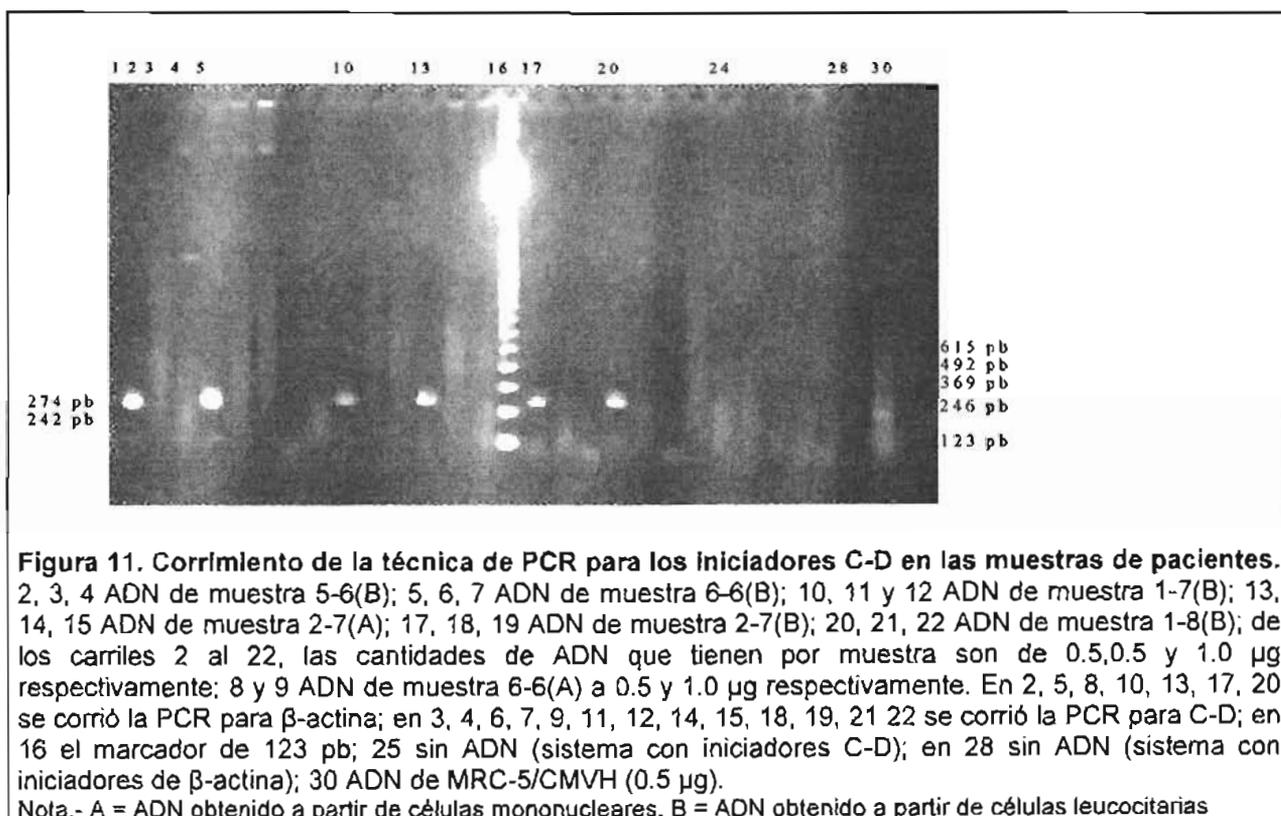
**Figura 9B. Corrimiento de la PCR con los iniciadores de C-D, a diferentes concentraciones del ADN del control positivo. 2, 3, 4, 5, 6 ADN de MRC-5/CMVH (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5  $\mu$ g) respectivamente; 7 el marcador de 123 pb. Observándose el producto de 242 pb en los carriles 2 y 3.**

Con el objetivo de establecer por un lado la conveniencia del uso de ADN obtenido de células mononucleares (A) y/o células leucocitarias (B), se hizo el corrimiento de PCR para el control interno de  $\beta$ -actina en el primer paciente (N° 1), de las recolecciones de muestras 4, 5 y 6 (días: 14, 21 y 28 postrasplante). En la Figura 10, carriles del 25 al 29 corresponden al ADN del mismo paciente, pero de fuente diferente, ADN a partir de mononucleares (carriles 25, 27 y 29) y ADN a partir de leucocitos (carriles 26 y 28), el producto específico esperado de 274 pb se presentó en todos los casos sin detectarse diferencias. En tanto que para los iniciadores C-D se corrieron las mismas muestras en cantidades de ADN de 0.5 y 2.5  $\mu$ g de cada una, como se observa en los carriles del 13 al 23 (menos carril 16) donde también están incluidas ambas fuentes de ADN, los resultados dieron en todos los casos una amplificación negativa del producto específico de CMVH. Por otro lado, en ese mismo corrimiento se incluyó la muestra de un paciente con ambas fuentes de ADN (mononucleares y leucocitos) reiterando el interés de definir el uso de una u otra fuente de ADN, así como para definir la cantidad más adecuada de ADN de las muestras problema; el ADN se trabajaron con las cantidades de 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0  $\mu$ g, en los carriles 3 a 12 de la misma Figura 10, se observa la ausencia del producto de 242 pb específico para los iniciadores C-D de CMVH; en el carril 2 se usó ADN de MRC-5/CMVH, observándose una banda tenue de producto específico de CMVH.



Habiendo establecido las condiciones de trabajo para la técnica de PCR con los iniciadores C-D de CMVH se procedió a aplicarlas en las diferentes muestras de cada uno de los pacientes, inicialmente usando ambas muestras de ADN obtenidas a partir de células mononucleares (origen A) y de células leucocitarias (origen B), que a su vez se trabajaron en cantidades de ADN correspondiente de 0.5 y 1.0 µg para iniciadores C-D, y a 0.5 µg para el control interno de β-actina que debe incluirse en el corrimiento correspondiente, lo que implica que por muestra sanguínea recolectada de un paciente en un día determinado, debieron trabajarse 6 viales de ADN blanco, además de los controles del sistema sin ADN y sin iniciadores respectivos. En la Figura 11 se observa el corrimiento de las muestras sanguíneas de los pacientes 5-6B, 6-6B, 6-6A (carriles del 2 al 9) (de esta última se corrió para C-D solo con 1 µg de ADN, por ser insuficiente la muestra); para los pacientes 1-7B, 2-7A, 2-7B, 1-8B (carriles del 10 al 22);

incluyendo el control positivo MRC-5/CMVH (carril 30) con 0.5  $\mu$ g de ADN para los iniciadores C-D. Los resultados indicaron que solo en los carriles 2, 5, 10, 13, 19 y 20 se observó el producto específico de la  $\beta$ -actina (274 pb), para 6 de las 7 muestras de ADN de pacientes, la muestra 6-6A no lo presentó (carril 8). En el carril 30 se colocó ADN de MRC-5/CMVH, observándose el producto específico de 242 pb; en los carriles que se colocaron ADN de muestras de pacientes para los iniciadores C-D no se observó el producto específico esperado, por lo que se reportan todas estas muestras con resultado negativo.



Continuando el estudio de las muestras de pacientes, se hizo el método de PCR para iniciadores C-D incluyendo el control interno de  $\beta$ -actina para el sistema; fueron evaluadas las siguientes muestras de ADN: un control de persona sana (donado), y de los pacientes 5-8A, 5-8B, 11-6A, 11-6B y 8-5A; con una variación respecto a la explicación anterior, dado que se incluyeron cantidades de ADN plantilla de 0.25, 0.5 y 1.0  $\mu$ g. para iniciadores de C-D Los resultados obtenidos por medio de la electroforesis en gel de agarosa, se muestran en la Figura 12, en los carriles 2 y 3 se tiene ADN de dos preparaciones diferentes de MRC-5/CMVH con 1.0 y 0.5  $\mu$ g respectivamente, observándose el producto específico de 242 pb para CMVH (más tenue en el primero). En los carriles 4, 8, 12, 17, 21 y 25 que contienen individualmente 0.5  $\mu$ g,

de ADN de los 6 pacientes respectivos, se observa el producto específico de 274 pb de  $\beta$ -actina; en tanto que en los carriles 5, 6 y 7 (muestra de paciente sano); 9,10 y 11 ( muestra 5-8A); 13, 14 y 15 (muestra 5-8B); 18, 19 y 20 (muestra 11-6A); 22, 23 y 24 (muestra 11-6B); 26, 27 y 28 (muestra 8-5A) se muestra el corrimiento con iniciadores C-D, donde no se observó el producto específico, considerándose el resultado como negativo. En carril 1 con ADN de MRC-5 (cultivo no infectado) para iniciadores C-D, se obtuvo el resultado esperado (ausencia de banda).

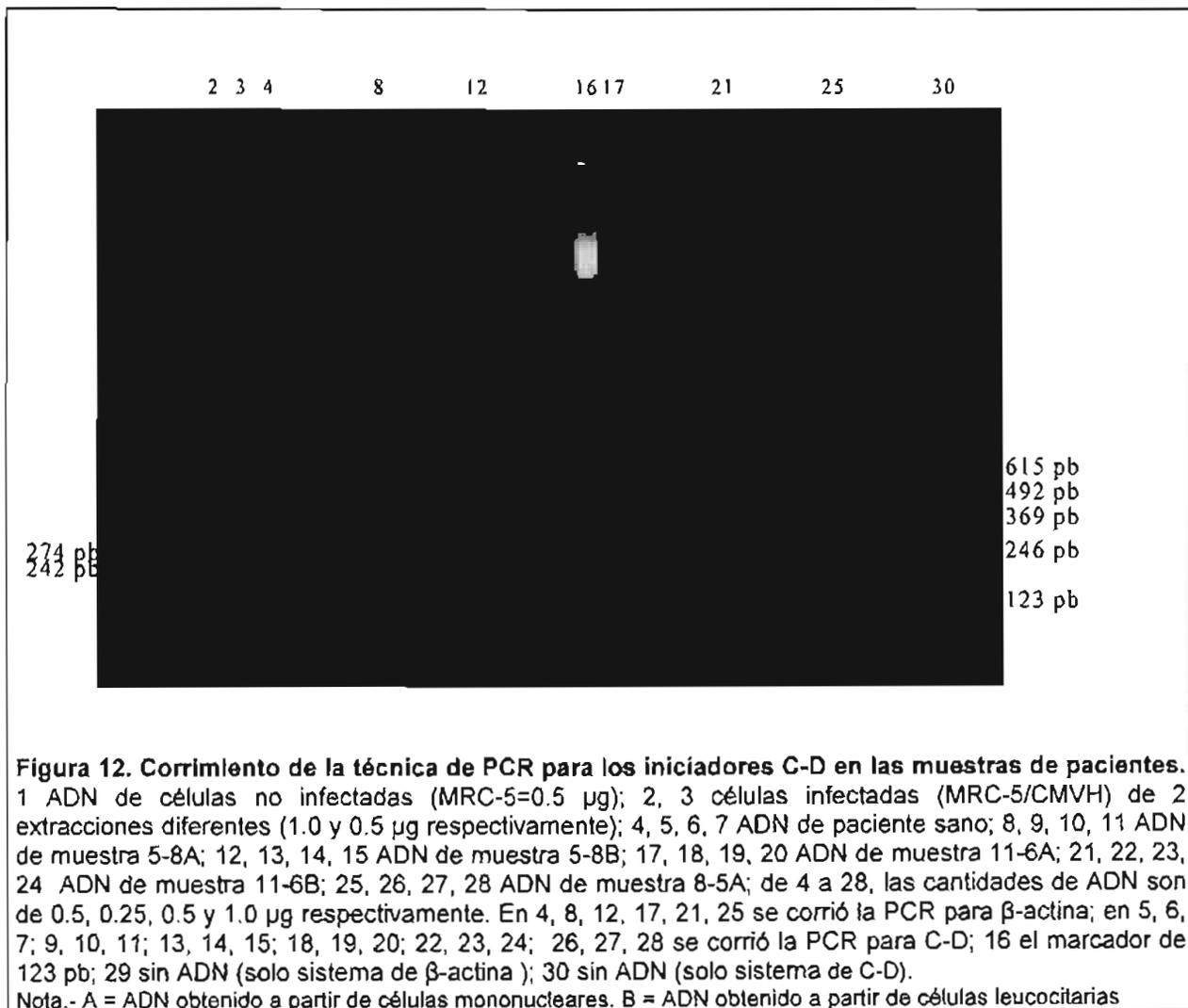


Tabla 7. Resultados de la PCR para iniciadores de C-D en las muestras sanguíneas.

	Código de muestra	Etapa Trasp /dla	Iniciadores C-D Concentración de ADN µg/ µl			Iniciadores de β-actina ADN µg/ µl
			0.5	1.0	2.0	
1	1-4A	14	neg	*	neg	Pos
2	1-4B	14	neg	*	neg	pos
3	1-5A	21	neg	neg	Neg (2.5)	Pos
4	1-5B	21	neg	*	Neg (2.5)	Pos
5	1-6A	28	neg	neg	Neg (2.5)	Pos
6	1-6B	28	neg	neg		Pos
7	1-7B	60	neg	Neg		pos
8	1-8B	100	neg	neg		pos
9	2-1B	Pretrasp	neg	neg		Pos
10	2-2B	0	neg	neg		pos
11	2-3B	7	neg	Neg		Pos
12	2-4B	14	neg	neg		Pos
13	2-6B	28	neg	neg		Pos
14	2-7A	60	neg	neg		Pos
15	2-7B	60	neg	neg		pos
16	3-1B	Pretrasp	neg	neg		Pos
17	3-2B	0	neg	neg		Pos
18	3-3B	7	neg	neg		Pos
19	3-5A	21	neg	neg		neg
20	3-5B	21	neg	neg		pos
21	3-6A	28	neg	neg		Pos
22	3-6B	28	neg	neg		Pos
23	4-2B	0	neg	neg		Pos
24	4-3B	7	neg	neg		Pos
25	4-6A	28	neg	neg		Pos
26	4-6B	28	neg	neg		pos
27	5-2B	0	neg	neg		Pos
28	5-3B	7	neg	neg		Pos
29	5-4B	14	neg	neg		Pos
30	5-6A	28	neg	neg		Pos
31	5-6B	28	neg	neg		Pos
32	5-8A	100	neg	neg	neg(.25)	Pos
33	5-8B	100	neg	neg	neg(.25)	pos
34	6-2B	0	neg	neg		Pos
35	6-3B	7	neg	neg		Pos
36	6-4B	14	neg	neg		Pos
37	6-5A	21	neg	neg		Pos
38	6-5B	21	neg	neg		pos
39	6-6A	28	neg	*		neg
40	6-6B	28	neg	neg		Pos
41	7-3B	7	neg	neg		Pos
42	7-4B	14	neg	neg		Pos
43	7-5A	21	neg	neg	*	Pos
44	7-5B	21	neg	neg	*	pos
45	8-1B	Pretras	neg	neg		Pos
46	8-2B	0	neg	neg		Pos
47	8-4A	14	neg	neg	*	Pos
48	8-4B	14	neg	neg	*	pos
49	8-5A	21	neg	neg	neg(.25)	pos
50	8-5B	21	neg	neg		pos
51	9-2B	0	neg	neg		Pos
52	9-3B	7	neg	neg		Pos
53	9-4B	14	neg	neg		Pos
54	10-1B	Pretras	neg	neg		Pos

55	10-2B	0	neg	neg		Pos
56	10-3B	7	neg	neg		Pos
57	10-4B	14	neg	neg		Pos
58	11-1B	Pretras	neg	neg		Pos
59	11-2B	0	neg	neg		Pos
60	11-3B	7	neg	neg		Pos
61	11-4B	14	neg	neg		Pos
62	11-5A	21	neg	neg	*	Pos
63	11-5B	21	neg	neg	*	Pos
64	11-6A	28	neg	neg	neg(.25)	pos
65	11-6B	28	neg	Neg	neg(.25)	pos

Neg = negativo pos = positivo \* = no se realizó Pretras = pretrasplante

Los resultados obtenidos del corrimiento de la técnica de PCR para los iniciadores C-D del CMVH se presentan en la Tabla 7, indicando que de las muestras que se recolectaron de cada paciente al inicio de su tratamiento de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, se eligió el ADN obtenido a partir de células leucocitarias por no presentar barrido y considerarse más recomendable. Sin embargo, todas las muestras dieron resultados negativos con los iniciadores C-D, a pesar de la positividad del control interno para cada una de ellas (iniciadores para  $\beta$ -actina). Resultados que correlacionan con el seguimiento médico, que indicó en todos los pacientes la ausencia de manifestaciones clínicas de infección por CMVH.

## 7.0. DISCUSIÓN

El Citomegalovirus humano (CMVH) se encuentra en latencia (virus no replicante) en la mayoría de las personas y puede reactivarse, implicando con ello el proceso de infección, conducente a tener enfermedad por CMVH, de ahí que se le considere un patógeno oportunista.

Es conocido que el CMVH causa alta morbilidad e incluso mortalidad en pacientes trasplantados, por lo que es importante el monitoreo de su reactivación (virus en replicación) en éstos pacientes. La clave para el manejo eficiente de la infección por CMVH, es una prueba capaz de detectar rápidamente su presencia en sangre, lo que es esencial para la identificación de personas en alto riesgo de desarrollar la enfermedad por CMVH, que son aquéllas inmunodeprimidas, por ejemplo por terapia inmunosupresora (régimen de acondicionamiento) que es necesario para mejorar la aceptación del trasplante ( Boeckh, M, 1998). La aplicación de la prueba en éstos pacientes, sí resulta positiva permitirá aplicar estrategias terapéuticas antivirales preventivas. Las pruebas diagnósticas más comunes incluyen el cultivo "shell vial" (pp72), el ensayo de antigenemia (pp65), PCR para ADN de CMVH, ensayo por captura de híbrido para ADN de CMVH y la detección de RNA de CMVH. La baja sensibilidad y reproducibilidad del primer método no permite su uso cotidiano en el diagnóstico de la enfermedad. La segunda prueba y las restantes pruebas moleculares, proporcionan un diagnóstico de la enfermedad de manera rápida y precisa, por su alta sensibilidad, algunas pueden cuantificar la carga viral, siendo rápidas y reproducibles; estas características les permiten ser usadas para predecir el desarrollo de la enfermedad y hacer seguimiento de la eficiencia de la terapia antiviral.

La muestra biológica de pacientes que se sospecha tienen reactivación del CMVH, resulta importante como fuente de ADN plantilla (blanco) para la detección de productos del genoma del virus, como lo reporta Méndez, J (1998) que obtuvo sensibilidad mayor en la detección de ADN viral usando leucocitos a partir de sangre completa que usando suero sanguíneo de los mismos pacientes, resultado coincidente a pesar de haber usado varios pares de iniciadores de regiones diferentes del genoma viral; por su parte Gozlan (1996), usó también como fuente de ADN, leucocitos a partir de sangre completa, en tanto que Sinclair (2000) recomienda el uso de células mononucleares a partir de sangre periférica por considerarse un sitio de latencia del virus, incluso el uso de plasma sanguíneo es otra posibilidad como muestra de estudio (Boeckh, 1998).

En el presente trabajo se resolvió considerar la obtención de ADN, a partir de células mononucleares (origen A), separadas por gradiente de densidad, y a partir de células leucocitarias (origen B) obtenidas por lisis celular (tratada con solución lisante de eritrocitos); la extracción de ADN se logró usando el método constituido por una solución lisante de detergente-sales de guanidina, que permite la precipitación selectiva de ADN desde un lisado de células (DNAzol), método similar utilizado por Boom R (1999) para obtener ADN de CMVH. La detección de ADN de las dos fuentes de material arriba mencionadas, por medio de la electroforesis en gel de agarosa, resultó de 84.3% y 79.6% respectivamente, además se hizo su cuantificación a partir de ambos materiales biológicos, por el método de espectrofotometría en rango UV, obteniéndose el promedio de 0.82  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y de 0.66  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  respectivamente, fue importante que a partir de ambos métodos se obtuvo la suficiente cantidad de ADN plantilla, requerida para el corrimiento de la técnica de PCR.

Con respecto a la pureza obtenida, los valores promedios fueron de 2.6 y 2.1 para el caso de células mononucleares y células leucocitarias, respectivamente; indicando baja contaminación en ambos casos, dado que las preparaciones puras de ADN dan valores de 1.8, donde si existe una contaminación con proteínas o fenol estos valores serán significativamente menores a 1.8, y por lo tanto la cuantificación precisa de la cantidad de ácidos nucleicos no es posible.

Considerando los parámetros mencionados anteriormente tal parece que el uso de mononucleares resultaría más conveniente para la extracción de ADN de las muestras de los pacientes. Sin embargo, no se detectaron grandes diferencias entre los dos tipos de fuentes celulares (mononucleares y leucocitos) para la obtención de ADN, coincidiendo con las opiniones de los estudios mencionados anteriormente. Lo anterior se confirma con los resultados obtenidos en la técnica de la PCR usando los iniciadores de  $\beta$ -actina (control interno del sistema), donde resultó indistinto el uso de ADN obtenido de mononucleares y el obtenido de leucocitos del mismo paciente; ya que ambos dieron el producto específico de 274 pares de bases (pb), con la excepción de dos muestras (3-5 y 6-6) en las que resultó más adecuado el ADN obtenido de leucocitos (origen B), que sí presentaron la amplificación esperada, en tanto que las otras dos muestras de ADN obtenidas de mononucleares (origen A) no la presentaron. Así mismo es importante mencionar que cuando se corrió la electroforesis en geles de agarosa se observó un barrido más notorio en los carriles correspondientes a las muestras de ADN obtenidas de células mononucleares que en las muestras de ADN obtenidas de células leucocitarias.

Por otro lado, el método de obtención de células mononucleares (origen A), es más costoso que el método usado para la obtención de células leucocitarias (origen B).

En base a las observaciones mencionadas anteriormente se recomienda más el uso de células leucocitarias (origen B) como fuente de obtención de ADN para su empleo en la técnica de PCR, sabiendo que en ambas fuentes celulares de ADN en casos positivos debiera detectarse el ADN viral.

Considerando la importancia que tiene la disponibilidad del CMVH como control positivo del sistema de PCR para la amplificación de regiones del genoma viral para los iniciadores específicos utilizados, se realizó el subcultivo de fibroblastos de pulmón embrionario humano (MRC-5) que son las células en las que se lleva a cabo la replicación de CMVH *in vitro*. En el presente trabajo se necesitó un periodo de 6 a 8 días para alcanzar el 100% de confluencia de la monocapa de MRC-5, coincidiendo con los reportes de crecimiento para esta línea celular; esta preparación tuvo varios usos: para hacer nuevo subcultivo, para infectar con el CMVH, para crioconservar y para extracción de ADN, este último se uso como control negativo y el cultivo infectado con CMVH como control positivo, en la técnica de PCR con los iniciadores de C-D para Citomegalovirus humano.

Cuando se realizó el cultivo de CMVH (cepa AD 169) *in vitro*, en la línea celular MRC-5 (80% de confluencia), y se evaluó la replicación viral por el efecto citopático característico (formación de focos bien delimitados de células redondas), el proceso requirió monitoreo en microscopio invertido cada 48 horas, con adición del medio nutritivo (MEM) cada 3 a 4 días, hasta observar un significativo efecto citopático (Burlison, F, 1997). En algunos estudios reportan un periodo de 12 a 15 días para alcanzar un grado considerable de infección, este periodo coincidió con el observado en el presente trabajo. Después de este tiempo el cultivo quedó listo para cosecharlo, pudiéndolo usar para crioconservación, para extracción de ADN y para infección de nuevas botellas conteniendo células MRC-5. Las 3 opciones se siguieron en el trabajo, lo que ha permitido contar con reserva viral por crioconservación a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

En relación a la extracción de ADN de los controles, se siguió el mismo protocolo que para las muestras sanguíneas, cuantificándolos y obteniendo un valor promedio de  $0.41\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y de  $0.26\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para células no infectadas e infectadas, respectivamente.

En el presente trabajo se consideró la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la detección del ADN de CMVH, usando los iniciadores C-D, que amplifican el exon 4 de la región IE (inmediata temprana, UL 123) del genoma viral; la región amplificada es considerada una región conservada dentro del genoma viral por sus propiedades funcionales y los iniciadores que amplifican esta región fueron diseñados a partir de la cepa patrón AD 169 (Akrigg, et al., 1985).

La técnica de PCR incluye como componentes del sistema, al ADN plantilla, al buffer, al cloruro de magnesio, a los dNTPs, a los iniciadores sentido y antisentido, y a la ADN polimerasa, que deben estar presentes en las concentraciones óptimas para que en caso de presencia del ADN de interés, se logre la amplificación del producto específico.

Hay condiciones y componentes involucrados en la técnica de PCR que influyen en la especificidad, como la temperatura de alineamiento, la que al ser mayor favorece la especificidad de la reacción, así como la concentración del cloruro de magnesio, que cuando se usa más del requerido conduce a baja especificidad, en tanto que si se disminuye demasiado, la actividad de la enzima decae, pudiendo ser nula la amplificación del producto de interés.

Respecto al ADN plantilla, se debe optimizar su concentración pues un exceso lleva a amplificaciones inespecíficas y una deficiente cantidad conduce a amplificación ineficiente (Barrera, 1993).

Lo anterior hace primordial establecer las mejores condiciones de corrimiento de la técnica de PCR para la detección de ADN del CMVH, considerando la estandarización de varios de los componentes del sistema, siendo uno de los más críticos el de la concentración de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ); en reportes hechos por Brytting (1991, 1992) indica la mejor concentración a 10 mM para los iniciadores de interés, y también Sinclair (2000) reporta que para amplificaciones de la región temprana del CMVH, el  $MgCl_2$  a 10 mM es adecuado, incluso considera 20 mM como opción. Sin embargo, en el presente estudio se tituló a concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 5.0 y 10 mM para los iniciadores utilizados, debido a que Méndez J. (1998) reporta que para amplificar regiones tempranas del CMVH, el  $MgCl_2$  ha funcionado a 1.5 y 5.0 mM, y Barrera (1993) recomienda en el corrimiento general de PCR un rango de 0.5 a 2.5 mM, además de que Innis (1997) recomienda 1.5 mM de concentración. En el presente trabajo la amplificación del producto específico de 242 pares de bases con el control de células infectadas con CMVH (MRC-5/CMVH) se presentó solamente a la concentración de  $MgCl_2$  de 10 mM, no amplificando a las otras concentraciones utilizadas; lo mismo se encontró para los iniciadores específicos para  $\beta$ -actina (producto 274 pb).

En ocasiones en el protocolo de la PCR, se recomienda incluir un paso de desnaturalización inicial seguida de los ciclos (desnaturalización, alineamiento y extensión) establecidos como adecuados para la amplificación del segmento del genoma de interés, el paso consiste en un calentamiento entre 92°C y 95°C por 5 minutos para iniciadores de CMVH, Roberts T(1997) sí lo recomienda, mientras que la experiencia de Weinberg et al (2000) no lo consideraron necesario para otro par de iniciadores para CMVH. En el presente trabajo se compararon las condiciones de corrida utilizando o no, un paso inicial de precalentamiento (95°C/3 min) antes

de agregar la Taq polimerasa al corrimiento de la PCR, continuando con los pasos y ciclos correspondientes al protocolo; donde se logró obtener el producto específico de 242 pb para CMVH solo cuando no se aplicó el paso inicial de precalentamiento.

Sin embargo, debido a la importancia que tiene la inclusión de un control interno para evaluar la operatividad del sistema y que debe funcionar a las mismas condiciones de concentraciones y temperaturas que los iniciadores de interés, en este caso de C-D, se incluyó en cada corrida a los iniciadores de  $\beta$ -actina, que amplifican un producto de 274 pares de bases, resultando que no amplificó en las condiciones establecidas anteriormente para los iniciadores C y D, por lo que fue necesario volver a probar las condiciones incluyendo y no el paso previo de precalentamiento, con el propósito de uniformar el procedimiento para ambos pares de iniciadores.

Para el caso de los iniciadores C-D se confirmaron los resultados obtenidos anteriormente, el producto específico para CMVH (242 pb) solo se logró amplificar cuando no se aplicó el paso inicial de precalentamiento; sin embargo, para los iniciadores de  $\beta$ -actina las condiciones de trabajo resultaron contrarias, es decir que el producto específico (274 pb) de este par de iniciadores solo se amplificó cuando se realizó el paso inicial de precalentamiento. Por lo tanto se estandarizó el corrimiento de PCR para C-D sin precalentamiento y para  $\beta$ -actina con precalentamiento. Respecto al control interno del sistema, resultó muy importante porque evaluó la integridad del ADN plantilla de muestras de pacientes y evidenció la funcionalidad del sistema en la corrida particular.

Otra variable del sistema en la técnica de PCR, es la cantidad de ADN, en este caso tanto del proveniente de los controles positivo (MRC-5/CMVH) y negativo (MRC-5), como el de las muestras sanguíneas; como refiere Barrera (1993) un rango recomendable de 0.3 a 1.0  $\mu\text{g}$  e Innis (1997) recomendando un rango de 0.3 a 3.3  $\mu\text{g}$ ; por lo que se hicieron corrimientos de PCR con diferentes cantidades de ADN plantilla, en un inicio utilizando cantidades dobles a partir de 0.125  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  hasta 2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Encontrándose que para el ADN de pacientes (por las 2 fuentes de material biológico) y para el ADN de ambos controles la cantidad óptima fue de 0.5  $\mu\text{g}$  para  $\beta$ -actina, evidenciado por la presencia del producto específico de 274 pb. Para el par de iniciadores C-D de CMVH, en el caso del control positivo (MRC-5/CMVH) y del control negativo (MRC-5) resultaron adecuadas las cantidades de 0.5  $\mu\text{g}$  a 1.0  $\mu\text{g}$ , y para las muestras de pacientes se trabajaron las cantidades de 0.5  $\mu\text{g}$  a 1.0  $\mu\text{g}$ .

Respecto a la conveniencia de usar la muestra de células mononucleares (origen A) y/o la muestra de leucocitos (origen B) de cada paciente, se basó en la observación con el control

interno de  $\beta$ -actina que resultó positivo con ambos tipos de muestras, excepto en dos casos de muestra de origen A, que resultaron negativas al producto específico de 274 pares de bases, este resultado sumado a la presencia de barrido en varias muestras de pacientes de origen A aunado al costo mayor de este; llevó a la decisión de trabajar y recomendar las muestras de leucocitos (origen B) como fuente de obtención de ADN para su empleo en la técnica de PCR.

La diseminación del CMVH en la sangre es un factor importante en la patogénesis de la enfermedad, tanto en infección primaria como en la reactivación. Durante la infección activa, la diseminación de CMVH en sangre es un factor de riesgo significativo para que progrese de infección a enfermedad, lo que suele suceder en pacientes tratados con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (Boeckh M, 1998).

El CMVH se caracteriza por estar presente en el organismo en latencia (sin replicación), en espera de condiciones adecuadas (inmunosupresión) para su reactivación (infección), la manera de detectar el paso de latencia a infección, es usando la técnica de PCR por tener mayor sensibilidad, respecto a las otras pruebas diagnósticas, que fue la elegida en el presente trabajo, partiendo de los iniciadores específicos C-D para CMVH, que aplicó en pacientes en condiciones de reactivación.

La técnica de PCR estandarizada en el presente trabajo se empleó en un estudio de campo clínico, en el que se analizaron 11 pacientes entre 17 y 49 años de edad, con afecciones hematológicas, 5 con Leucemia Mielocítica Crónica (4 hombres y una mujer), 4 con Leucemia Mieloblástica Aguda (1 hombre y 3 mujeres) y 2 con Leucemia Linfoblástica Aguda (1 hombre y 1 mujer), que recibieron trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) alogénico o autólogo, todos los pacientes tenían menos de tres meses de haber sido trasplantados.

Se planteó la recolección de ocho muestras sanguíneas a cada paciente, la primera 4 a 5 días previos al procedimiento y a lo largo de 100 días posteriores al trasplante, esta calendarización se diseñó de esta manera, debido a que el paciente es tratado previamente con un régimen de acondicionamiento que implica inmunosupresión, dando lugar a la posibilidad de reactivación del CMVH endógeno, además de que el CMVH puede ser aportado por medio de las células del trasplante y reactivarse posteriormente al mismo, siendo el periodo de mayor posibilidad de reactivación entre los 60 y 100 días post-trasplante. Fueron 51 recolecciones de muestras sanguíneas, todas menos dos, se procesaron para tener 2 fuentes de ADN (origen A, mononucleares y origen B, leucocitos) usando el mismo método de extracción.

La presencia de los productos esperados se observó por electroforesis en gel de agarosa, incluyendo en el corrimiento un marcador de 123 pares de bases. En las 51 muestras recolectadas de los 11 pacientes, se obtuvo el producto esperado para  $\beta$ -actina (excepto en las

muestras 3-5 A y 6-6A); en tanto que en todas las muestras, la detección de ADN viral resultó negativa, ya sea usando ADN de mononucleares o ADN de leucocitos, probando dos cantidades que fueron 0.5 µg y 1.0 µg para cada ADN plantilla. Estos resultados implican la ausencia de infección en los pacientes muestreados en los diferentes momentos del proceso del TCPH, datos que concuerdan con la información médica respecto a los pacientes, los cuales no presentaron manifestaciones clínicas de la infección por CMVH.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden explicar extrapolando los resultados reportados por Vela, J. (2000) en México, donde describe un estudio de 140 pacientes con LMC y de 59 pacientes con LMA, tratados con trasplante de médula ósea o de células progenitoras hematopoyéticas, con una incidencia de la enfermedad causada por CMVH de 16% y de 9% respectivamente. Lo que implica que el tamaño de muestra que se trabajó en el presente estudio (11 pacientes) independientemente de las ocho recolecciones de muestras por cada paciente que se contempló, resultó ser muy pequeño y por lo tanto insuficiente para detectar la incidencia del CMVH durante el periodo de realización del presente trabajo. Aunado a que no se contó con todas las muestras en las etapas de mayor incidencia de la infección (entre los días 60 y 100 post-trasplante).

Por lo tanto, antes de implementar la técnica de PCR para el diagnóstico de CMVH en pacientes con afecciones hematológicas tratados con TCPH del Centro Médico La Raza, IMSS, se considera conveniente continuar con un estudio de campo clínico que incluya un número mayor de muestras de pacientes, así mismo se recomienda incluir otros pares de iniciadores específicos para CMVH, como son: CMVH-531/CMV1107, HindIII-X-1/HindIII-X-2, y EcoRI-D1/EcoRI-D2, además de correlacionar los resultados por este método con otros como el propio cultivo celular y el de antigenemia, aunado a las manifestaciones clínicas de la infección por CMVH.

## 8.0. CONCLUSIONES

- La elección del material biológico de los pacientes a partir de células mononucleares separadas por gradiente de densidad y a partir de células leucocitarias obtenidas desde sangre completa por lisis de eritrocitos, para la obtención de ADN no presentó diferencias en cuanto a las características del material obtenido; sin embargo se consideró más recomendable el uso de células leucocitarias como fuente de obtención de ADN para su empleo en la técnica de PCR.

- En el conteo de leucocitos, los pacientes presentaron una concentración mayor en el periodo previo al procedimiento de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, y una baja significativa al momento del procedimiento y siete días después, y posteriormente una elevación paulatina, indicando una recuperación asociada a una posible mejora en el sistema inmunológico.

- Se implementaron las condiciones de cultivo y conservación de la línea celular de fibroblastos de pulmón de embrión humano (MRC-5) y del Citomegalovirus humano *in vitro*, necesitándose un periodo de 6 a 8 días para su proliferación y de 12 a 15 días para su replicación, respectivamente; pudiéndose usar como controles en la técnica de PCR.

- Dentro de las condiciones de trabajo para la técnica de PCR, aplicada a la detección del ADN de Citomegalovirus humano empleando el par de iniciadores C-D (UL 123) e iniciadores de control interno ( $\beta$ -actina), se estableció el 10 mM de cloruro de magnesio como concentración de trabajo óptima.

El uso de los iniciadores C-D para la detección de ADN de CMVH no requiere un paso inicial de precalentamiento para la amplificación del producto específico (242 pb), paso indispensable para los iniciadores de  $\beta$ -actina que solo amplificaron el producto específico (274 pb) cuando se realizó dicho paso previo a las condiciones estandarizadas de corrimiento de la PCR.

- El rango de la cantidad óptima de ADN de los pacientes y de los controles para el corrimiento de la PCR usando los iniciadores C-D (específicos para CMVH) fue de 0.5 a 1  $\mu$ g.

- Para un corrimiento adecuado de la PCR utilizando el par de iniciadores para  $\beta$ -actina (control interno), la cantidad más adecuada de ADN de pacientes y de los controles fue de 0.5  $\mu$ g.
- El ADN de CMVH por medio de la técnica de PCR con los iniciadores C-D (producto específico de 242 pb) no se detectó en las 51 muestras recolectadas de los 11 pacientes involucrados en el presente estudio, implicando la ausencia de infección en los diferentes momentos del proceso del TCPH de dichos pacientes, resultados que coinciden con la información médica de los pacientes, que no presentaron manifestaciones clínicas de la infección viral.
- La detección del producto específico para  $\beta$ -actina (274 pb) fue positiva para todas las muestras de los pacientes (excepto en las muestras 3-5 A y 6-6 A) con la reacción de la PCR. Lo cual implica integridad del ADN genómico como fuente, para la obtención del ADN plantilla para el diagnóstico de infección por CMVH en las muestras estudiadas.
- Es necesaria la obtención de otro grupo de muestras en pacientes con neoplasias hematológicas tratadas con TCPH, para determinar con mayor certeza la eficiencia del sistema aquí estandarizado, para su posible implementación en forma rutinaria al campo clínico, así como la comparación de los resultados con un método de referencia como el de antigenemia pp65, aunado a los datos clínicos de los pacientes estudiados.

## 9.0. APÉNDICE

### Solución buffer de fosfatos (PBS) pH = 7.2

Na Cl ..... 8 g.  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1.21 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0.34 g  
H<sub>2</sub>O destilada  
desionizada.....1000 ml

Ajustar pH

Uso :Obtención de Mononucleares con Histopaque

### Solución TBE pH 8.0 ( 1%)

Tris-HCl..... 10.3 g  
Acido bórico..... 5.5 g  
EDTA..... 0.93 g  
H<sub>2</sub>O bidestilada.....cbp 1000 ml

Ajustar a pH 8.0

Uso: Electroforesis en gel de agarosa; tanto como diluyente de la agarosa, como para la bandeja del sistema de electroforesis.

Nota: se usa para electroforesis al 0.5 %.

### Agarosa al 1 %

Agarosa..... 450 mg  
TBE cbp.....45 ml

Nota: el TBE, se debe usar al 0.5 %

- 1.- En matraz erlenmeyer de 100 ml, disolver por calor la agarosa
- 2.- Dejar que baje la temperatura y agregar un  $\mu$ l de bromuro de etidio, por cada 10 ml de agarosa

Uso: Para detectar presencia de ADN ó de producto específico de la técnica de PCR

**Buffer TE**

10 mM Tris HCl .....1.576 g

1 mM EDTA.....372.2 g

H<sub>2</sub>O bidestilada..... cbp 1000 ml

Ajustar a pH = 7.5-8

Uso: Como diluyente del ADN.

**Buffer Loading 5X**

50 % Glicerol

15 mM EDTA

0.6 % azul de bromofenol

**Buffer TE para lisis de eritrocitos pH 8.8**

Trizma base 20 mM .....1.211g

EDTA 5 mM ..... 0.9305 g

H<sub>2</sub> O bidestilada.....cbp. 500 ml

Ajustar a pH 8.8 y esterilizar

## 10.0. BIBLIOGRAFIA.

- Akrigg, A., Wilkinson, G. W. G., Oram, J. D. 1985. The structure of the major immediate early gene of human cytomegalovirus strain AD 169. *Virus Res.*, 2:107-121.
- Alessandrino EP, Varettoni M, Colombo AA. 2000. High incidence of symptomatic cytomegalovirus infection in multiple myeloma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Blood.*, Jun 15;94(12):4029-35
- Amorin Maria Luisa, Cabeda Jose Manuel, Seca Rui. 2001. CMV infection of liver transplant recipients: comparison of antigenemia and molecular biology assays. *BMC infectious Diseases.*, 1:2
- Aspin MM, Gallez-Hawkins GM, Giugni TD, Tegtmeier B, Lang DJ, Schmidt GM, Forman SJ, Zaia JA. 1994. Comparison of plasma PCR and bronchoalveolar lavage fluid culture for detection of cytomegalovirus infection in adult bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol.*, Sep;32(9):2266-9
- Barrera Saldaña Hugo A, Ortiz López Rocío, Rojas Martínez, Reséndez Pérez Diana. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y desarrollo*
- Belshe B. Robert. 1991. *Textbook of Human Virology*. Mosby second edition., 889-915.
- Berkow Robert, Talbott John. 1978. *Manual Merck de diagnóstico y terapéutica*. 6ª edición. Merck Sharp & Dohme Research Laboratories
- Blazar BR, Korngold R, Vallera DA. 1997. Recent advances in graft-versus-host disease (GVHD) prevention. *Immunol Rev.* Jun;157:79-10
- Boeckh M, Gallez-Hawkins GM, Myerson D. 1997. Plasma Polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA after allogeneic marrow transplantation: comparison with Polymerase chain reaction using peripheral blood leukocytes, pp65 antigenemia, and viral culture. *Transplantation.* Jul 15;64(1):108-13
- Boeckh M, Boivin G. 1998. Quantitation of cytomegalovirus: Methodologic aspects and clinical applications. *Clinical Microbiology Reviews*, July; p.533-554
- Boom Rene, Cees Sol, Jan Well, Yvette Gerrits, Monique de Boer, Pauline Wertheim-van Dillen. 1999. A highly sensitive assay for detection and quantitation of human cytomegalovirus DNA in serum and plasma by PCR and electrochemiluminescence. *Journal of clinical Microbiology*, May; 1489-1497
- Britt WJ and Alford CA. 1996. Cytomegalovirus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven. p 2493-2524

- Brown, Barbara A. 1993. Hematology principles y procedures. 6a edición. Editorial Lea and Febiger; pag. 325-327
- Brytting Maria, Sundqvist Vivi-Anne, Stalhandske Per, Linde Annika, Wahren Britta. 1991. Cytomegalovirus DNA detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. Journal of Virological Methods. 32: 127-138
- Brytting, W Xu, Wahren B. 1992. Cytomegalovirus DNA detection in sera from patients with active cytomegalovirus infections. J Clin. Microbiology, Aug, 30(8): 1937-1941
- Burleson F, Cambres T, Wiedbrauk. 1997. Virology a laboratory manual. Cap. 9; 41-44. Academic Press, Inc.
- Carballal Guadalupe. 1998. Virología médica. 3<sup>a</sup>. ed. El Ateneo
- Chen DH, Jiang H, Lee M, Liu F, Zhou ZH. 1999. Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. Virology; Jul 20; 260(1):10-6
- Clive Sweet. 1999. The pathogenicity of cytomegalovirus. FEMS Microbiology Reviews; 23 p. 457-482
- Demmler GL. 1992. Acquired cytomegalovirus infections. Feigin RD, Cherry JD editors. Philadelphia. 3a edition pp. 1532-1547
- Davis B, Dulbecco R, Eisen H, Ginberg H, Wood B. 1979. Tratado de Microbiología. 2<sup>o</sup> edición. Editorial Salvat
- Enright H. 1997. Biology and treatment of chronic myelogenous leukemia. Oncology 11:1295-1299
- Fields Bernard N. Virology, 1996. volume 2. third edition. 2477- 2478
- Fishman JA and Rubin RH. 1998. Infection in organ-transplant recipients. N. Engl. J. Med. 338:1741-1751
- Forbes BA, Bartholoma N. 1988. Detection of cytomegalovirus in clinical specimens using shell vial centrifugation and conventional cell culture. Diagn Microbiol Infect Dis Jun; 10(2):121-4
- Gozlan J., Laporte J. P, Lesage S, Labopin m, Najman. A. 1996. Monitoring of Cytomegalovirus infection and disease in bone marrow recipients by reverse transcription- PCR and comparison with PCR and blood and urine cultures. Journal of Clinical Microbiology, Sep; p. 2085-2088
- Grefte JM., Van der Gun BT., Schmolke S., Van der Giessen M., Van Son WJ., Platcher B., Jahn G and the TH. 1992. The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen

present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. *J. Gen. Virol.* 73:2923-2932

- Griffiths PD, Whitley RJ. 1996. Cytomegalovirus and human herpesvirus type 6 infection in the immunocompromised (non-HIV) host. Recommendations from the IHMF (International herpes management forum) management strategies workshop and 4<sup>th</sup> annual meeting, Nov.
- Hirsch HH. 2003. Viral infections after transplantation. *Ther Umsch*, Oct;60(10):641-9
- Hudnall SD, Chen T, Tyring SK. 2004. Species identification of all eight human herpesviruses with a single nested PCR assay. *J Virol Methods*, Mar 1;116(1):19-26
- Innis Michael A, Gelfand David H, Sninsky John J., White Thomas J. 1997. *PCR Protocols. A guide to methods and applications.* Academic Press, Inc
- Jaksch M, Remberger M, Mattsson J. 2004. Increased immune transcript levels are correlated with acute graft-versus-host disease and cytomegalovirus response after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation*. Jan 27;77(2):195-200.
- Jill T. Bechtel and Thomas Shenk. 2002. Human Cytomegalovirus UL47 Tegument Protein functions after entry and before Immediate-early gene expression. *J Virol.* Feb;76(3):1043-50
- Jonjic S, Pavic I, Lucin P, Rukavina D, Koszinowski UH. 1990. Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *J Virol* 64:5457-5464.
- Kalaycio M, Pohlman B, Elson P, Lichtin A, Hussein M, Tripp B, Andresen S. 2001. Chemotherapy for acute myelogenous leukemia in the elderly with cytarabine, mitoxantrone, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Am J Clin Oncol* Feb;24(1):58-63
- Kanj SS, Sharara AI, Clavien PA, Hamilton JD. 1996. Cytomegalovirus infection following liver transplantation: review of the literature. *Clin Infect Dis* Mar;22(3):537-49
- Kusne S., Grossi P., Irish W., ST George K., Rinaldo C., Rakela J. And Fung J. 1999. Cytomegalovirus pp65 antigenemia monitoring as a guide for preventive therapy: A cost effective strategy for prevention of cytomegalovirus disease in adult liver transplant recipients. *Transplantation*. 68:1125-1131
- Lee SJ, Kuntz K M, et al. 1997. Unrelated donor bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. A decision analysis. *Ann Intern Med* 127: 1080-1088
- Lemoli RM, Bandini G, Leopardig G, et al. 1998. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. In patients with early phase hematologic malignancy: A retrospective

comparison of short term outcome with bone marrow transplantation. *Haematologica* 83:48-55

- Lorenzi S, D'Antuono A, Lorizzo M, Tosti A. 2003. Skin rash and splinter hemorrhages from ganciclovir. *J Dermatolog Treta*. Sep;14(3):177-8
- Lucin P, Pavic I, Polic B, Jonjic S, Koszinowski UH. 1992. Gamma interferon- dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *J Virol* ;66:1977-1984
- McKenzie, Shirlyn B. 2000. *Hematología clínica. Manual Moderno. 2° edición*
- Marsh M, Pelchen-Matthews A, da Silva RP, Bijlmakers MJ, Signoret N, Gordon S, 1998. Lack of p56 lck expression correlates with CD4 endocytosis in primary lymphoid and myeloid cells. *Eur J Immunol*. Nov;28(11):3639-47
- Mihailidi F I. Assays for the detection of human cytomegalovirus infection. 2003 *Hippokratia*. 7(2): 93-96
- Mocarski S. Edward. *Virology (Fields). Cytomegalovirus and their replication*. 1996. pag. 2450. Lippincott-Raven. third edition
- Mossad SB, Longworth DL, Goormastic M, et al. 1996. Early infectious complications in autologous bone marrow transplantation: A review of 219 patients. *Bone Marrow Transplant* 18:265-271
- Murphy E, Yu D, Grimwood J, Schmutz J, Dickson M, Jarvis MA, Hahn G, Nelson JA, Myers RM, Shenk TE. 2003. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 9;100(25):14976-81
- Nii S, Uno F, Yoshida M, Akatsuka K. 1998. Structure and assembly of human beta herpesviruses. *Nippon Rinsho*. Jan;56(1):22-8
- Nikaien A, Poole T, Fishbeck R, et al. 1994. Characterization of skin infiltrating cells during acute graft versus host disease following bone marrow transplantation using unrelated donors. *Hum Immunol*. 40:68-76
- O'Brien SM, Kantarjian HM, Thomas DA, Cortes J, Giles FJ, Wierda WG, Koller CA, Ferrajoli A, Browning M, Lerner S, Albitar M, Keating MJ. 2003. Alemtuzumab as treatment for residual disease after chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. Dec 15;98(12):2657-63
- Padley D, Strauss RG, Wieland M, Randels MJ. 1991. Concurrent comparison of the Cobe Spectra and Fenwal CS3000 for the collection of peripheral blood mononuclear cells for autologous peripheral stem cell transplantation. *J Clin Apheresis*.;6(2):77-80.
- Pancholi P, Wu F, Della-Latta P. 2004. Rapid detection of cytomegalovirus infection in transplant patients. *Expert Rev Mol Diagn*. Mar;4(2):231-42

- Paya C, Humar A, Domínguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B. 2004. Efficacy and Safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of Cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* Apr;4(4):611-20
- Plotkin SA, Furukawa T, Zygraich N, Huygelen C. 1975. Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infect Immun Sep*;12(3):521
- Radillo G. A, *Medicina transfusional*, 1999. Ed. Prado
- Riddell SR, Rabin M, Geballe AP, Britt WJ, Greenberg PD. 1991. Class I MHC- restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression. *J Immunol* ; 146:2795-2804
- Riley HD Jr. 1997. History of the cytomegalovirus. *South Med J*, Feb;90(2):184-90
- Ringden O. 1997. Allogeneic bone marrow transplantation for hematological malignancies--controversies and recent advances. *Acta Oncol.*;36(6):549-64. Review
- Robinson N, Sullivan KM. 1994. Complications of allogeneic bone marrow transplantation. *Curr Opin Hematol* 1:406-411
- Roy V, Ochs L, Weisdorf D. 1997. Late infection following allogeneic bone marrow transplantation: Suggested strategies for prophylaxis. *Leuk Lymphoma* 26(1-2):1-15
- Rubin RH. 1999. Importance of CMV in the transplant population. 1999. *Transpl Infect Dis* ;1 Suppl 1:3-7
- Ruiz-Arguelles G.J, San-Miguel J.F. 1996. Actualización en leucemias. 1ª edición Editorial Médica Panamericana
- Ruiz Arguelles G.J. 1998. Fundamentos de Hematología. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana
- Ruiz-Arguelles GJ, Rangel JD, Ponce-De-Leon S, González-Dector L, Reyes-Nuñez V, Garces-Eisele J. 2004. The Mexican schedule to conduct allogeneic stem cell transplantation is related to a low risk of cytomegalovirus reactivation and disease. *Am J Hematol.* Apr;75(4):200-4
- Salmon-Ceron D. 2001. Cytomegalovirus infection: the point in 2001. *HIV Med*, Oct;2(4):255-9
- Saltzman RL, Quirk MR and Jordan MC. 1998. Disseminated cytomegalovirus infection. molecular analysis of virus and leukocyte interactions in viremia. *J. Clin. Invest.* 81:75-81
- Scharzenberg L, Mathe G, Amiel J, et al. 1972. Marrow transplantation in aplastic anemia employing antilymphocyte globulin (ALG). Absence of secondary disease. Split lymphocyte chimerism. *Exp Hematol*; 22:109

**ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- Serody JS, Shea TC: 1997. Prevention of infections in bone marrow transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am.* 11:459-477
- Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA. 1992. Effects of peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (G-CSF) of platelet recovery after high dose chemotherapy. *Lancet*, 339:640
- Sinclair John. 2000.. *Cytomegalovirus Protocols. Methods in molecular medicine.* p. 39-52. Humana Press Inc., Totowa, NJ
- Slobedman B, Stern JL, Cunningham AL, Abendroth A, Abate DA, Mocarski ES. 2004. Impact of Human Cytomegalovirus Latent Infection on Myeloid Progenitor Cell Gene Expression. *J Virol.* Apr 15;78(8):4054-4062
- Stadtmauer EA, Biggs D, Sickles C. 1994. G-CSF mobilized peripheral blood stem cells with high dose therapy for responding patients with metastatic breast cancer. *J Cell Biochem*; 18B:102
- Stites D.P., Terr A. I., Parslow T. G. 1998. *Inmunología básica y clínica 9ª edición. Manual Moderno*
- Streblov Daniel., Soderberg-Naucler C., Vieira J., Smith P., Wakabayashi E., Ruchti, F., Mattison K. 1999. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell*, Vol. 99, 511-520
- Taylor CG, Stasi R, Bastianelli C, et al. 1996. Diagnosis y classification of the acute leukemia. *Recent advances and controversial issues. Hematopathol Mol Hematol* 10:1-38
- Thomas C. Roberts, Richard S. Buller, Monique Gaudreault-Keener, Kara E Sternhell, Kathryn Garlock, Gary G. Singer, Daniel C. Brennan, Gregory A. Storch. 1997. Effects of storage temperature and time on qualitative and quantitative detection of citomegalovirus in blood specimens by shell vial culture and PCR. *J Clin Microbiol.* Sep;35(9):2224-8
- Thomas ED, Bucker CD, Clift RA, et al. 1972. Marrow grafting for aplastic anemia and for leukemia using HLA matched donor-recipient sibling pairs. *Exp Hematol.* 22:138
- Trang P, Liu F. 2004. RNase P Ribozyme As an Antiviral Agent Against Human Cytomegalovirus. *Methods Mol Biol.*;252:437-50
- Vanciková Z., Dvorák P. 2001. Cytomegalovirus infection in immunocompetent and immunocompromised individuals - A review. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders.* 1. 179-187

- Van der Bij W., Schrim J., Toremsma R., Van Son WJ., Van der Ploeg., Van Saase JLCM and Van der Woude FJ. 1988. Comparison between viremia and antigenemia for the detection of cytomegalovirus in blood. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2531-2535
- Vázquez E. Trasplante de médula ósea. 1999. *Bol Med Infant Mex*; vol 56(10):571-581
- Vela-Ojeda, Tripp-Villanueva F, González-Llaven J, Gómez-Morales E. y col. 2000. Trasplante alogénico de células hematopoyéticas en leucemia mieloide aguda en México. *Gaceta Médica de México*, Vol 136 sup.2, 169-170
- Vela-Ojeda, Tripp-Villanueva F, González-Llaven J, Gómez-Morales E. y col. 2000. Trasplante alogénico de células hematopoyéticas en leucemia mieloide crónica en México. *Gaceta Médica de México*, Vol 136 sup.2, 2000. 167-8
- Wang Z, La Rosa C, Maas R, Ly H, Brewer J, Mekhoubad S, Daftarian P, Longmate J, Britt WJ, Diamond DJ. 2004. Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing a Soluble Form of Glycoprotein B Causes Durable Immunity and Neutralizing Antibodies against Multiple Strains of Human Cytomegalovirus. *J Virol.* Apr 15;78(8):3965-3976
- Wentworth BB and French L. 1970. Plaque assay of cytomegalovirus strains of human origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 135:253-258
- Weinberg A., Hodges T, Li Shaobing, Guanyung Cai, Zamora Martin. 2000. Comparison of PCR , antigenemia assay, and rapid blood culture for detection and prevention of cytomegalovirus disease after lung transplantation. *Journal of Clinical Microbiology*, February, 38(2) p. 768-772
- Wood M. *Secretos de la Hematología y Oncología*. 1999, 2ª Edición. McGraw-Hill Interamericana; pag.129-135
- [www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/uspdi/202255.html](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/uspdi/202255.html). Ganciclovir(systemic) 2002
- [www.slu.edu/publications/gc/v6-10/news\\_23.shtml](http://www.slu.edu/publications/gc/v6-10/news_23.shtml) School of medicine will study first ever vaccine against cytomegalovirus