



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Identificación de los genotipos de glicoproteína B de
citomegalovirus en tejidos conservados en parafina de
neonatos con sospecha de infección congénita**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

PRESENTA

ARELI REGINA DE LA CRUZ DE LA CRUZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AÑO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesora: Tzvetanka Dimitrova Dinkova
VOCAL: Profesora: Rocío Gabriela Tirado Mendoza
SECRETARIO: Profesora: Alma Herrera Salazar
1er. SUPLENTE: Profesora: Sara Margarita Garza Aguilar
2° SUPLENTE: Profesor: Alberto Ortega Vázquez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DE LA TORRE DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA “ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES”.

ASESORA DEL TEMA: DRA. EN C. ALMA HERRERA SALAZAR

SUSTENTANTE: ARELI REGINA DE LA CRUZ DE LA CRUZ

El desarrollo de esta tesis fue financiado por el protocolo “Diagnóstico de infección congénita de Citomegalovirus mediante la amplificación del gen UL123 que codifica la proteína IE2-86” con No. de Registro 212250-3120-10607-02-14

Parte de los resultados de este proyecto se presentaron en el X Congreso Nacional de Virología “Dra. Blanca Lilia Barrón”, celebrado del 24 al 27 de octubre de 2017 en Chautla, Puebla, en modalidad cartel, con los trabajos (Anexo II):

- IDENTIFICATION OF CYTOMEGALOVIRUS GLYCOPROTEIN B GENOTYPES IN TISSUES FROM PRETERM NEWBORNS WITH EARLY NEONATAL DEATH
- CLINICOPATHOLOGICAL CORRELATION BETWEEN CYTOMEGALOVIRUS (CMV) CONGENITAL INFECTION FROM NECROPSY TISSUES OF NEWBORNS

Dedicatoria

No te rindas que la vida es eso,
continuar el viaje,
perseguir tus sueños,
destrabar el tiempo,
correr los escombros
y destapar el cielo.

Mario Benedetti

A ti... que aun cuando todos me señalaban creíste en mí, a ti, que me ayudaste a levantarme cuando nadie más me tendía la mano, a ti, por ser mi compañía y consuelo en los momentos más difíciles.

A mis padres Silvia y Zeferino. Gracias: por la oportunidad de existir, por su sacrificio en algún tiempo incomprendido, por su ejemplo de superación incansable, por su comprensión y confianza, por su amor incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi carrera profesional.

A mis hermanas y hermano, si no los tuviera mi vida sería un desastre.

A la Dra. Alma Herrera a quien le doy gracias de todo corazón por la confianza depositada en mí y por haber tenido la paciencia para guiarme durante el desarrollo de esta tesis.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido de una u otra manera en la realización de este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. en C. Alma Herrera Salazar, bajo su dirección se ha llevado a cabo esta tesis, gracias por guiarme y supervisar este proyecto, por permitirme quitarle horas de su tiempo, por enseñarme el interesante mundo de la virología, por el apoyo brindado en el desarrollo de mi futuro profesional, por creer en mí, por su ánimo, por su calidad humana y paciencia.

Agradezco a las doctoras Tzvetanka Dimitrova Dinkova y Roció Gabriela Tirado Mendoza por sus aportaciones constructivas y su interés en el tema desarrollado. También agradezco las atenciones prestadas por parte de la doctora Sara Margarita Garza Aguilar y el doctor Alberto Ortega Vázquez.

A la Dra. Elsa Moreno Verduzco, Subdirectora de Servicios Auxiliares de Diagnóstico, a la Dra. Yolotzin Valdespino, Jefa del Departamento de Anatomía Patológica, a la histotecnóloga María de los Ángeles Urrutia Martínez y al Médico Subespecialista en Infectología Pediátrica Renan Ramírez Canto por su disponibilidad para aclarar dudas respecto a los datos clínicos y las contribuciones a lo largo de este proyecto.

A la M. en C. Diana Soriano, Coordinadora del Laboratorio de Inmunología, al Dr. Ricardo Figueroa Damián, Jefe del Departamento de Infectología e Inmunología, al Dr. Ismael Mancilla y al Dr. Moisés León, por las facilidades dentro del proyecto.

Al pBQD Carlos Eduardo Romero Vera, por el trabajo realizado durante su servicio social en contribución a este proyecto.

Al QFB Julio César Flores por no dejar que me rindiera en los momentos más difíciles y tener fe en mí, darme aliento y fuerza de lograr lo que me proponga.

I. RESUMEN

El citomegalovirus humano (HCMV) también conocido como herpesvirus 5 (HHV-5), pertenece a la sub-familia *β-herpesviridae* y su genoma consiste en DNA de doble cadena. La infección por HCMV tiene una alta prevalencia mundial y es la principal causa de etiología infecciosa de defectos al nacimiento. La glicoproteína B (gB) es una de las glicoproteínas de la envoltura; participa en los procesos de entrada a la célula hospedera y fusión de células infectadas. Se propuso un esquema para los genotipos, de acuerdo con la diferencia en el patrón de corte mediante digestión con enzimas de restricción describiéndose 4 genotipos: gB1, gB2, gB3 y gB4. Se ha propuesto a los genotipos de gB como marcadores de patogenicidad; sin embargo, no queda claro si ciertos genotipos de gB o mezcla de genotipos, están asociados con la presentación de cuadros clínicos más severos. Las variaciones genotípicas en los tejidos de recién nacidos fallecidos con infección congénita (IC) por HCMV no han sido reportadas en México.

El objetivo de este proyecto fue determinar la frecuencia y distribución de genotipos de gB en tejidos (cerebro, hígado, bazo y pulmón) de recién nacidos pretérmino con IC mediante el ensayo de PCR-RFLPs.

Se realizó un estudio transversal, retrospectivo y descriptivo. Se seleccionaron 12 casos de recién nacidos prematuros de la colección de necropsias del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes", en la Ciudad de México, de acuerdo a criterios de inclusión que se relacionan con sospecha de IC por HCMV (nacimiento pretérmino, hidrocefalia, calcificaciones cerebrales, efectos citopáticos sugestivos de infección viral, entre otros). Se extrajo DNA de cortes de 10µm de bazo, hígado, cerebro y pulmón usando dos métodos de extracción: Kit comercial (ZR FFPE DNA MiniPrep™ modificado) y Chelex-100™. Para detectar el DNA de HCMV, se realizó una PCR para amplificar un fragmento de 220bp del gen UL123 (MIE). Los genotipos de gB fueron analizados por PCR-RFLPs del gen UL55 (gB). Se utilizó DNA extraído de un riñón HCMV positivo por ensayo de inmunoperoxidasa como control positivo. El gen *GAPDH* se utilizó como control de integridad de DNA. Adicionalmente, se analizó tejido (placenta, bazo y encéfalo) de un óbito.

El DNA de HCMV se detectó en 5/12 (42%) de los casos estudiados. El genotipo gB2 se encontró en 4/5 (80%) de los casos y gB1 en solo 1/5 (20%). Adicionalmente, se encontró

una coinfección de genotipos gB1/gB2 en tejido cerebral de uno de los casos. En 2/5 (40%) de los neonatos fallecidos se encontró HCMV en todos los tejidos. Los tejidos más afectados fueron el pulmón (5/5) y el cerebro (4/5). La necropsia de todos los casos positivos reportó hallazgos clínico-patológicos y efectos citopáticos sugestivos de infección por HCMV. Encontramos una co-infección de genotipos gB1/gB2 en el control positivo y genotipo gB1 en el caso del óbito.

De acuerdo con la literatura el genotipo gB2 tiene mayor prevalencia en México. Se encontraron genotipos gB1 y gB2 en la población estudiada, no se encontraron genotipos gB3 ni gB4. gB2 fue el genotipo más frecuentemente detectado. Se recomienda estudiar la correlación entre genotipos y los hallazgos clínico-patológicos en los neonatos, además de incluir estudios adicionales para fortalecer el conocimiento de la diversidad genética de HCMV presente en México.

I. ABREVIATURAS.

CID	Inclusión citomegálica generalizada
IC	Infección congénita
IP	Infección perinatal
HCMV	Citomegalovirus humano
HHV-5	Herpesvirus 5
gp	Glicoproteína
gB	Glicoproteína B
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
pp	Fosfoproteínas
UL	Región "unique long"
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfatado
Kit mod	Kit modificado
Ch	Chelex
T/amb	Temperatura ambiente
FFPE	Fijado en formalina y embebido en parafina
Pol HF	DNA polimerasa de alta fidelidad
<i>GAPDH</i>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
D.O.	Densidad óptica
MIE	Región principal de antígeno immediate-early de la cepa Towne de HCMV
SDR	Síndrome de dificultad respiratoria

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Morfología de citomegalovirus.	2
Figura 2. Genoma de HCMV. Representación de un aislado clínico conocido como la cepa de Merlín.	3
Figura 3. Esquema del genoma de HCMV y cascada de expresión genómica.	4
Figura 4. Tasa de seroprevalencia mundial de HCMV en adultos.	5
Figura 5. Esquema de los patrones de infección por HCMV	7
Figura 6. Modelo de entrada del HCMV a la célula.	9
Figura 7. Ciclo de replicación de citomegalovirus.	10
Figura 8. Latencia natural del HCMV en linajes celulares.	12
Figura 9. Diagrama esquemático de la glicoproteína B.	14
Figura 10. Esquema del proceso cíclico de la PCR.	18
Figura 11. Molécula de DNA de doble cadena.	19
Figura 12. Diagrama esquemático de la reacción de estabilización con el ion Mg^{2+} .	21
Figura 13. Esquema general de la técnica PCR-RFLPs.	22
Figura 14. Tejidos conservados en bloques de parafina.	26
Figura 15. Comparación de dos métodos de extracción de DNA.	34
Figura 16. Amplificación de un fragmento de 220pb del gen viral UL123 (MIE) para el control positivo de HCMV extraído por los métodos de Kit mod y Ch.	35
Figura 17. Amplificación de un fragmento de 220pb del gen viral UL123 (MIE) para el control positivo de HCMV extraído por el método de Chelex usando diferentes concentraciones de DNA molde.	36
Figura 18. Amplificación de un fragmento de 201pb del gen endógeno <i>GAPDH</i> para muestras extraídas por el método de kit modificado.	36
Figura 19. Amplificación de un fragmento de 201pb del gen endógeno <i>GAPDH</i> para muestras extraídas por el método de Chelex.	37
Figura 20. Amplificación de un fragmento de 220pb del gen viral UL123 (MIE) de HCMV para el CASO-4 y muestras del CASO-1-3 y CASO-2-11.	38
Figura 21. Amplificación de un fragmento de 220pb del gen viral UL123 (MIE) de HCMV para el CASO-3 y el CASO-4 extraídos por el método de Chelex.	39
Figura 22. Amplificación de un fragmento de 220pb del gen viral UL123 (MIE) de	39

HCMV para el CASO-6 extraído por el método de Chelex.	
Figura 23. Amplificación de un fragmento de 220pb del gen viral UL123 (MIE) de HCMV para el CASO-1 extraído por el método de Chelex.	40
Figura 24. Amplificación de un fragmento de 220pb del gen viral UL123 (MIE) de HCMV para el CASO-2 extraído por el método de Chelex.	41
Figura 25. Ensayo de restricción con enzima BshNI (BanI) para el CASO-3-2 y el CASO-3-7.	41
Figura 26. Amplificación de un fragmento de 305pb del gen viral UL55 (gB) para el CASO-3 y CASO-4.	43
Figura 27. Amplificación de un fragmento de 305pb del gen viral UL55 (gB) para el CASO-2.	44
Figura 28. Amplificación de un fragmento de 305pb del gen viral UL55 (gB) para el CASO-5 y el CASO-1.	44
Figura 29. Digestión de restricción de la parte amplificada de glicoproteína B (bases 1319-1604).	45
Figura 30. Ensayo de restricción con las enzimas RsaI y HinfI para el CASO-5.	46
Figura 31. Ensayo de restricción con las enzimas RsaI y HinfI para el CASO-4.	47
Figura 32. Ensayo de restricción con las enzimas RsaI y HinfI para el CASO-3.	48
Figura 33. Ensayo de restricción con las enzimas RsaI y HinfI para el CASO-2.	49
Figura 34. Amplificación de un fragmento de 220pb del gen viral UL123 (MIE) de HCMV para el CASO-E.	51
Figura 35. Amplificación de un fragmento de 305pb del gen viral UL55 (gB) para el CASO-E.	51
Figura 36. Ensayo de restricción con las enzimas RsaI y HinfI para el CASO-E.	52

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Variabilidad en los genes de HCMV.	13
Tabla 2. Comparación de los genotipos detectados en las muestras de DBS de neonatos y en la leche de sus madres.	15
Tabla 3. Criterios de inclusión para los estudios post-mortem.	26
Tabla 4. Tejidos recibidos por cada caso entre los años 2012-2014.	27
Tabla 5. Condiciones de la electroforesis de cada ensayo realizado.	31
Tabla 6. Rendimiento y pureza de las muestras extraídas por el método de kit modificado.	33
Tabla 7. Rendimiento y pureza de las muestras extraídas por el método de Chelex.	33
Tabla 8. Comparación de medias de los métodos de extracción.	34
Tabla 9. Cuantificación del control positivo para HCMV por ambos métodos de extracción.	35
Tabla 10. Órganos positivos a infección por HCMV de los cinco estudios.	42
Tabla 11. Casos encontrados de infección por HCMV en el INPer en los años estudiados (2012-2014).	43
Tabla 12. Fragmentos esperados del ensayo de restricción para la glicoproteína B para cada genotipo.	45
Tabla 13. Genotipos encontrados en los órganos de los casos positivos para HCMV.	49
Tabla 14. Hallazgos clínico-patológicos y citopatológicos encontrados en los casos positivos para HCMV.	50

ÍNDICE GENERAL	Página
I. RESUMEN	I
II. ABREVIATURAS	III
III. ÍNDICE DE FIGURAS	IV
IV. ÍNDICE DE TABLAS	VI

ÍNDICE	Página
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Etiología, estructura y genoma viral de HCMV	2
1.3 Epidemiología	5
1.4 Patogénesis	7
1.4.1 Ciclo lítico o replicativo	9
1.4.2 Ciclo de latencia o reactivación	11
1.5 Variabilidad genotípica de HCMV	12
1.5.1 Glicoproteína B	13
1.6 Técnica de PCR-RFLPs	16
1.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa	16
1.6.1.1 Fases de la PCR	17
1.6.1.2 DNA molde	18
1.6.1.2 DNA polimerasa	19
1.6.1.3 Oligonucleótidos o <i>primers</i>	19
1.6.1.4 dNTP's, buffer y Mg ²⁺	20
1.6.2 Análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción	20
1.6.3 Electroforesis en gel de agarosa	22
2. Justificación	24
3. Hipótesis	24
4. Objetivos	25
4.1 General	25
4.2 Específicos	25
5. Materiales y métodos	26
5.1 Recepción de muestras	26
5.2 Métodos de extracción de DNA	27
5.2.1 Método ZR FFPE DNA MiniPrep™ modificado	27
5.2.2 Método Chelex™	28
5.2.3 Análisis estadístico	28
5.3 Control positivo para HCMV	28
5.4 Amplificación del gen endógeno <i>GAPDH</i>	28
5.5 Amplificación del gen viral UL123 (MIE)	29
5.5.1 Ensayo de restricción con BshNI (BanI)	29
5.5.1.1 Condiciones del ensayo de restricción	29
5.6 Técnica PCR-RFLPs para determinación de genotipo	30

5.6.1	PCR para gen viral UL55 (gB)	30
5.6.1.1	Condiciones para la PCR	30
5.6.2	Ensayo de restricción con las enzimas RsaI y HinfI	30
5.6.2.1	Condiciones del ensayo de restricción	30
5.7	Electroforesis en gel de agarosa para visualización del DNA	31
5.8	Análisis de caso especial: Óbito	31
6.	Resultados	33
6.1	Métodos de extracción	33
6.2	Control positivo para HCMV	35
6.3	Amplificación del gen endógeno <i>GAPDH</i>	36
6.4	Amplificación del gen viral UL123 (MIE)	37
6.4.1	Ensayo de restricción con la enzima BshNI (BamI)	41
6.5	Técnica PCR-RFLPs	43
6.5.1	Genotipos de gB	49
6.6	Caso especial: óbito femenino de 32 semanas	51
7.	Discusión	53
8.	Conclusiones	57
9.	Perspectivas	58
10.	Referencias	59
11.	Anexo I	65
12.	Anexo II	66

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes.

Antes de que se lograra la identificación del virus ya se conocía la enfermedad. En 1881, el patólogo Hugo Ribbert realizó estudios postmortem con el riñón de un recién nacido, donde señaló por primera vez grandes células “similares a protozoarios”. En 1904 publicó esta observación con Löwenstein, encontrando que las células de las glándulas parótidas de las biopsias de dos neonatos contenían un “cuerpo nuclear central” rodeado de un halo transparente.¹ Fue precedido por la publicación de Jesionek y Kiolemenoglou, que describían células similares (de gran tamaño) en células de pulmones, riñones e hígado de un feto lúteo de 8 meses.²

En 1921 Goodpasture y Talbot aplicaron el término citomegalia a estas células, en las que no pudieron definir parásito alguno y notaron que eran similares a las observadas en la piel de pacientes con varicela.³ Éstas parecen ser las primeras descripciones de células citomegálicas típicas con inclusiones intracelulares.

En 1932 Wyatt y col. sugirieron el nombre “enfermedad de inclusión citomegálica generalizada (CID)” debido a que se habían reportado 25 casos de una infección letal congénita caracterizada por petequias, hepatoesplenomegalia y calcificación intracerebral, y todas estas patologías tenían células con inclusiones intranucleares, aunque su etiología viral aún no se conocía.¹

Eders y col., en 1954, recibieron el Premio Nobel por el aislamiento de poliovirus en cultivos de células embrionarias humanas.¹ Esto dio lugar al cultivo de citomegalovirus humano por parte de Margaret Smith en 1956, que logró aislar el virus del riñón de un paciente con CID.⁴ Anteriormente, Smith trató de aislar el virus de la glándula salival de un paciente, pero no logró hacerlas crecer en células de ratón, demostrándose así que el virus era específico de cada especie.²

En 1960 Weller y col., propusieron el nombre de citomegalovirus (CMV).⁵ En los años siguientes se multiplicaron los estudios sobre citomegalovirus humano (HCMV) con lo cual se reconoció su distribución mundial, sus efectos en fetos, en pacientes inmunocomprometidos o inmunosuprimidos, mujeres embarazadas y pacientes trasplantados.

Casi toda la investigación inicial se concentró en las entidades clínicas (mononucleosis, reinitis) conocidas de CID, la forma congénita diseminada de la infección. Transcurrió otra década antes de que se descubriera que CID y otras entidades clínicas era sólo el principio, de un número mucho mayor de infecciones (neumonitis, coriorrenitis, ictericia, petequias) no evidentes que afectaban regularmente a los neonatos como resultado de la transmisión vertical de HCMV.²

1.2. Etiología, estructura y genoma viral.

La familia *Herpesviridae* se divide en 3 subfamilias: α -*herpesviridae*, β -*herpesviridae* y γ -*herpesviridae*. El HCMV pertenece a la sub-familia β *Herpesviridae* y es conocido como *Herpesvirus 5* (HHV-5).⁶

El virus mide de 150 a 200nm de diámetro y su estructura (Figura 1) está compuesta por:

1. La nucleocápside de 100nm con una forma icosa pentahédrica con 162 capsómeros proteicos que contiene el DNA lineal de doble cadena del virus. Esta nucleocápside está formada por 3 fosfoproteínas: pp150, pp65 y pp71.
2. Capa proteica denominada tegumento, que rodea la capa anterior y que es una cubierta amorfa de aproximadamente 38 diferentes proteínas virales (por ejemplo: pp28 y pp66).
3. Una bicapa lipídica que rodea las 2 capas anteriores, formada por 33 proteínas estructurales, de las cuales 6 son glicosiladas formando glicoproteínas que son gB (UL55), gM (UL100), gN (UL73), gH (UL75), gL (UL115) y gO (UL74), éstas actúan como mediadores de la entrada del virus a la célula hospedadora, unión célula-célula y la maduración del virus. La glicoproteína B (gB) es la principal glicoproteína de esta envoltura.^{7,8}

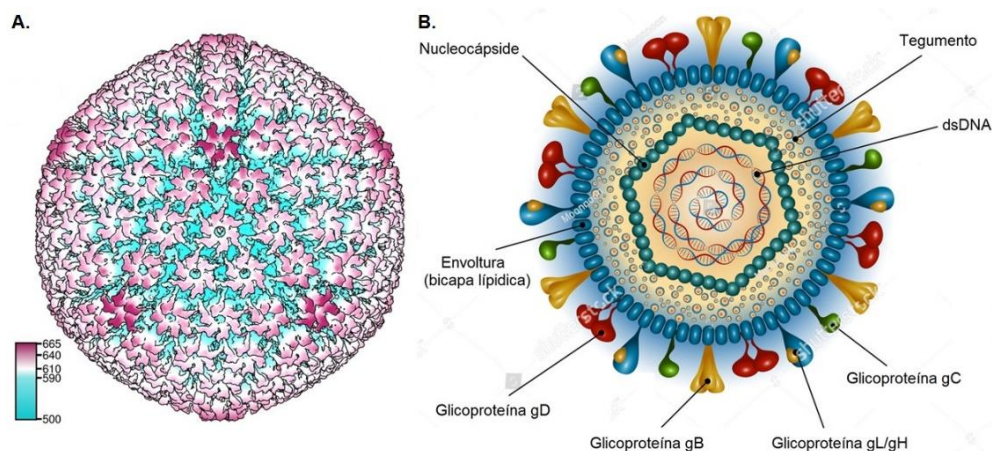


Figura 1. Morfología de citomegalovirus. A. Criomicroscopía electrónica de HCMV. **B.** Esquema general de la estructura de HCMV. (Modificado de Dai, 2013).^{9, 10}

HCMV es el virus más grande de los herpesvirus y contiene ~235 Kpb de DNA en su genoma. Se estima que su genoma contiene aproximadamente 250 ORF's en su genoma.¹¹ Algunos de los genes expresan RNAs no codificantes, incluyendo 14 microRNAs. También se ha reportado que aprox. 88 genes no son esenciales para la replicación eficiente de HCMV *in vitro*.¹²

El genoma se divide en 2 regiones únicas. Denominadas “unique long” (UL) y “unique short” (US), cada una de las cuales está flanqueada por una secuencia repetida terminal, TRL (terminal repeat-long) y TRS (terminal repeat-short), y por una secuencia repetida interna, IRL (internal repeat-long) e IRS (internal repeat-short). Las regiones UL y UR contienen prácticamente todos los genes de HCMV.¹³ La parte central de la región UL contiene grupos de genes de la nucleocápside que tienen homólogos con otros herpesvirus, tales como DNA polimerasa, glicoproteína B (gB) y glicoproteína H (gH), mientras que el resto del genoma contiene genes que se encuentran principalmente sólo en β -herpesvirus o únicos para el HCMV. Por convención, los genes de HCMV son nombrados por su posición dentro del genoma, aunque algunos también tienen nombres descriptivos adicionales (Figura 2).¹⁴

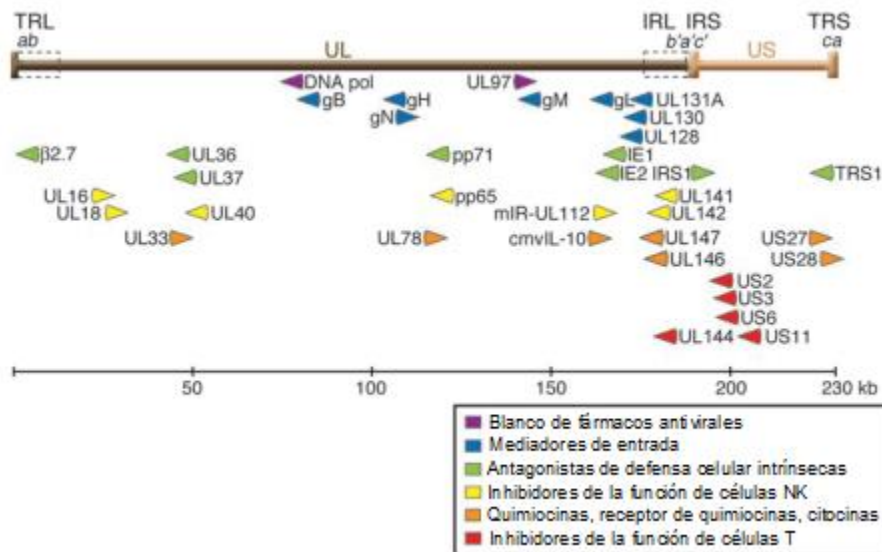


Figura 2. Genoma de HCMV. Representación del genoma de un aislado clínico conocido como la cepa de Merlín, (no. de acceso GenBank NC_006273), consiste en segmentos de DNA largo (café) y corto (naranja), cada uno de los cuales tiene regiones únicas (UL y US) flanqueada por repeticiones invertidas (TRL/IRL e IRS/TRS). (Tomada de Boeckh, 2011).¹⁴

La expresión genómica de HCMV se lleva a cabo en una cascada de 3 fases (Figura 3). En primer lugar, se expresan los genes α o IE (“immediate early”), se originan los primeros RNAm en cuya síntesis parecen intervenir RNA polimerasas celulares. En esta primera fase

se sintetizan las proteínas α , que conducen al virus al ciclo lítico, con actividad fundamentalmente reguladora de la replicación y transcripción de los genes E (“early”) de la segunda fase, que codifican para las proteínas β , con función enzimática reguladora de la replicación del DNA y expresión final de los genes L (“late”) de la tercera fase que codifican para las proteínas γ . Éstas son las proteínas estructurales del virión, entre las cuales se encuentran las glucoproteínas (gp) de envoltura, principalmente implicadas en la producción de anticuerpos neutralizantes, las proteínas de la cápside, las proteínas del tegumento y fosfoproteínas (pp), entre las que destaca la pp65 (UL83).^{15,1}

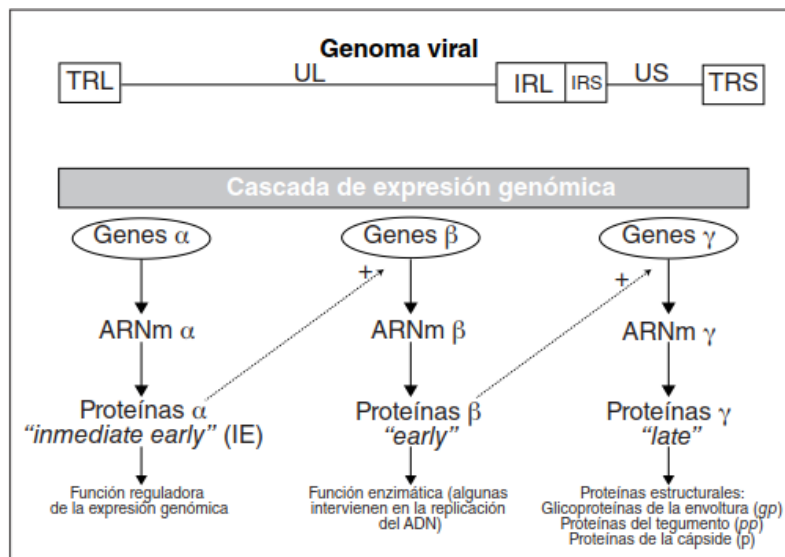


Figura 3. Esquema del genoma de HCMV y cascada de expresión genómica. La expresión genómica se lleva a cabo en tres fases. Primera fase: proteínas IE, segunda fase: proteínas E y tercera fase: proteínas L. (Tomada de Gámez, 2014).¹

Las proteínas tempranas (IE) proporcionan principalmente funciones enzimáticas esenciales dentro de la célula durante la infección, por ejemplo: UL54 forma una DNA polimerasa y UL97 una proteína quinasa que fosforila nucleósidos antivirales tales como ganciclovir (GCV) o aciclovir (ACV). Las proteínas α tardías (IL) generalmente desempeñan un papel estructural en la formación de viriones, por ejemplo: las glicoproteínas de superficie son potencialmente importantes debido a su interacción con el sistema inmune. Se han descrito epítomos neutralizantes sobre gB y gH. gH requiere gL para facilitar la expresión superficial.¹⁵

Todos los aislados clínicos de HCMV muestran un elevado grado de homología en secuencia entre sí.¹⁴ A pesar de esto, una característica del HCMV es su elevado polimorfismo, tal como ponen de manifiesto los patrones de restricción con endonucleasas.¹⁶ En la práctica, cada cepa presenta un patrón característico; aquellas no relacionadas epidemiológicamente

muestran patrones diferentes, en contraposición con los aislamientos secuenciales en un paciente o con las que tienen cierta relación epidemiológica. Clasificarlos utilizando esta característica aún no ha sido posible.^{17,18}

1.3 Epidemiología.

La infección por HCMV tiene una alta prevalencia mundial. En países subdesarrollados el 90% de la población tiene anticuerpos contra HCMV, frente al 60% estimado en los países desarrollados (Figura 4). En zonas con bajas condiciones socioeconómicas, la mayoría de los niños se ha infectado antes de la pubertad. La aglomeración y la falta de higiene favorecen la transmisión de HCMV.¹⁹

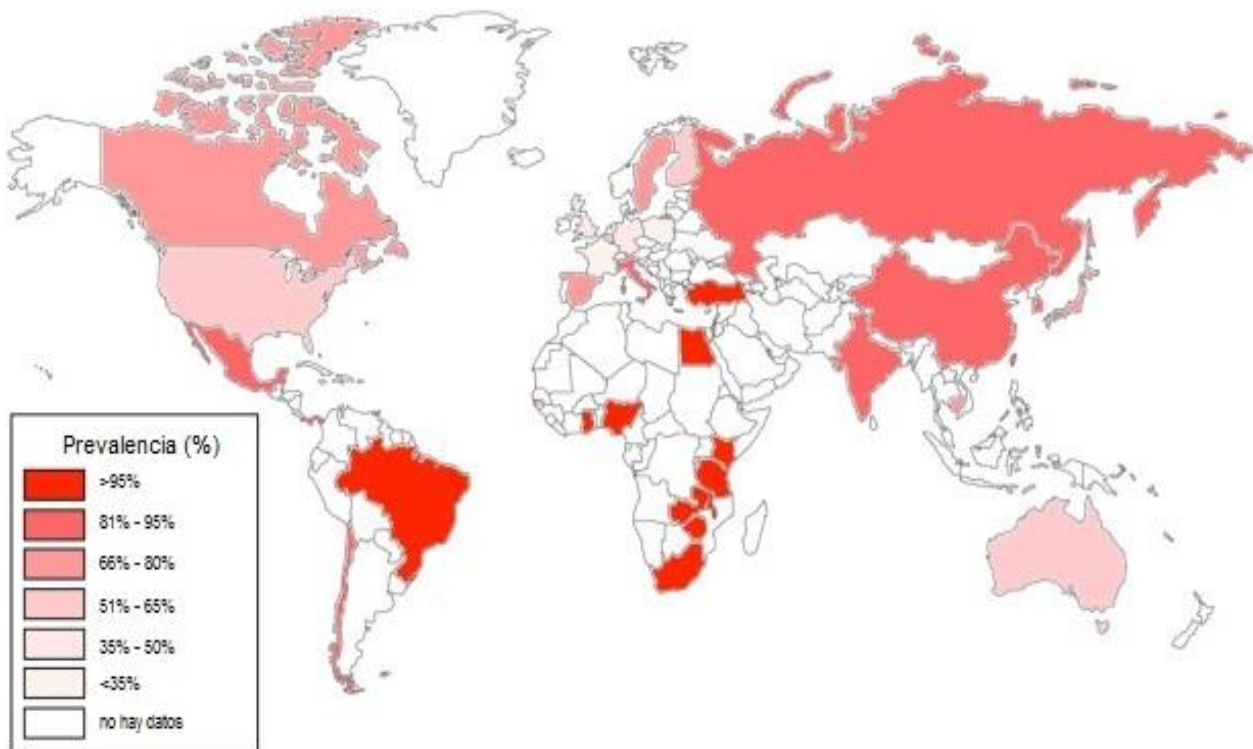


Figura 4. Tasa de seroprevalencia mundial de HCMV en adultos. Estudios realizados en adultos de edades entre 16-50 años publicados entre 2005 y 2015. (Tomada de Adland, 2015).²⁰

En los países desarrollados, el 40% de los adolescentes son seropositivos, aumentando la prevalencia aproximadamente un 1% por año de vida. En Estados Unidos y Europa occidental, la seroprevalencia para anticuerpos totales contra HCMV en mujeres jóvenes varía de menos de 50% hasta 80%.²¹

El HCMV congénito presenta una elevada morbimortalidad. En México no se ha reportado una prevalencia de infección congénita (IC) a nivel nacional, pero se cuenta con datos de

seroprevalencia de HCMV en mujeres en edad reproductiva, mujeres embarazadas, neonatos con IC o infección perinatal (IP) con base en estudios poblacionales de diferentes entidades. En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca Morelos, para conocer la prevalencia de anticuerpos contra HCMV en mujeres en edad reproductiva (13 a 44 años), en una muestra de 1885 mujeres, 91.6% fueron positivas y en el grupo de 15 a 20 años de edad esta seropositividad fue menor (85.5%), siendo éste el grupo de mayor riesgo para adquirir la infección primaria por HCMV durante el embarazo.²¹ Otro estudio realizado en el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” San Luis Potosí, reportó una incidencia de 1.48% de neonatos con infección congénita, mediante técnicas de biología molecular.²² En otro estudio realizado en el Hospital de la Mujer, Ciudad de México, se reportó que la prevalencia de neonatos pretérmino con IC fue del 2.5% (7/277) y el 11.8% (13/110) fue de IP.²³

La infección también puede ocurrir en mujeres previamente inmunes por reactivación o reinfección viral, lo que ocurre entre el 1 y el 4% de las gestantes seropositivas. En esta situación, solo del 1–2% de los fetos se infecta, y la gran mayoría de los infectados (>90%) son asintomáticos al nacimiento. Un 10–15% de los niños con infección asintomática también presenta secuelas de la infección a largo plazo.^{19, 24}

La infección se adquiere por contacto directo con secreciones contaminadas o por transmisión vertical, de la madre al hijo durante el embarazo o durante el parto, y horizontal en el período perinatal o posnatal.¹ La leche materna también se considera un medio común para la transmisión de virus de madre a hijo. Aproximadamente el 40-60% de los lactantes serán infectados por HCMV al final de su primer año de vida si son alimentados por madres seropositivas.^{25, 26} Un 4% de los neonatos sintomáticos fallece, además entre un 40 y un 58% de ellos desarrollan secuelas permanentes, especialmente sordera neurosensorial y retraso psicomotor. Las secuelas también aparecen en un 13% de los niños asintomáticos al nacimiento.²⁴

A pesar de que los problemas relacionados con la infección por HCMV a través de la transmisión durante el parto o en periodo postnatal no suelen asociarse con resultados adversos en los neonatos a término, el papel de los infantes infectados en la epidemiología de la propagación del HCMV es significativo, aumentando la transmisión viral por fómites.²⁶

1.4 Patogénesis.

La infección por HCMV está ampliamente distribuida en la naturaleza. Los herpesvirus son virus responsables de infecciones persistentes latentes.¹ El HCMV puede presentar reactivaciones periódicas y excretarse de forma intermitente por fluidos corporales como orina, saliva, semen, secreción vaginal y leche materna.²⁴ El virus puede aparecer después de una infección primaria, reinfección o reactivación.

Después de la entrada a la célula y la entrada del genoma al núcleo, las defensas intrínsecas e innatas específicas del tipo celular, la actividad de las proteínas en las partículas del virus y las interacciones entre el virus y el hospedero comienzan a definir el patrón de infección: latente o replicativo. La diferenciación celular y otras señales del hospedero pueden reactivar la replicación del virus en latencia. El nivel de replicación del virus depende del tipo de célula infectada (Figura 5); esta cronicidad se puede atribuir al entorno multifacético, involucrando respuestas intrínsecas, respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, señalización celular, remodelación de la cromatina y factores virales que regulan la replicación viral o las respuestas del hospedero a la infección.²⁷

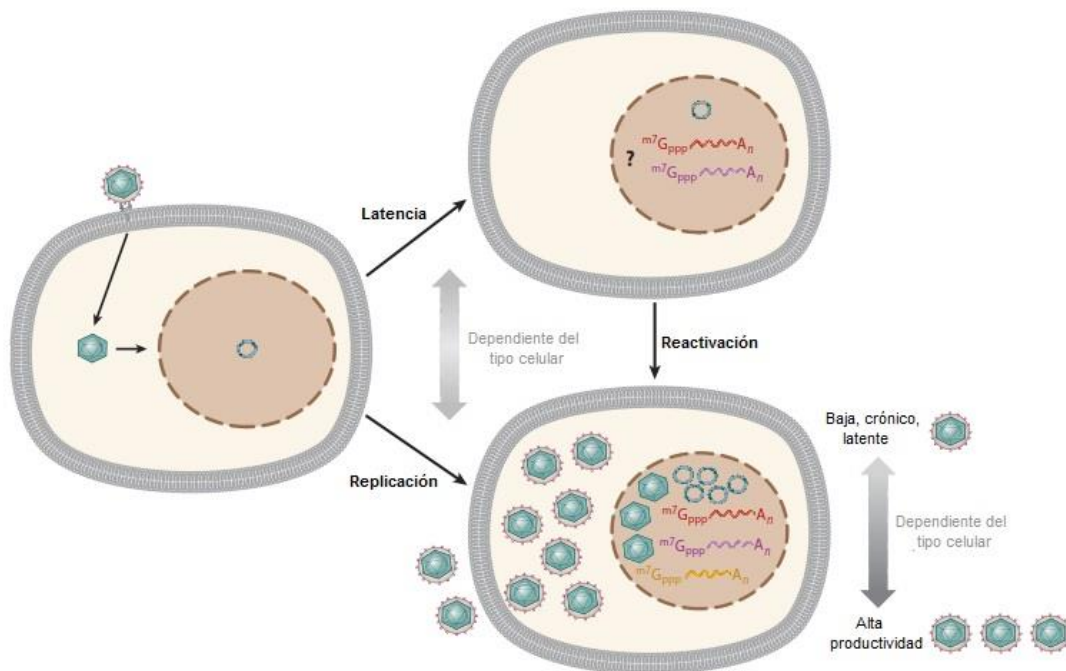


Figura 5. Esquema de los patrones de infección por HCMV. Tras la entrada en la célula y la entrada del genoma viral al núcleo, el hospedero comienza a definir el patrón de infección: latente (arriba; ocurriendo o no una reactivación viral) o replicativo (abajo; puede ser productivo o crónico). (Modificada de Goodum, 2016).²⁷

El HCMV tiene la capacidad para infectar y replicarse en una amplia variedad de células, incluyendo: células epiteliales, células de músculo liso, fibroblastos, macrófagos y

hepatocitos, entre otras.²⁸ Durante la infección activa, se sugiere que el HCMV se replica productivamente en células epiteliales, células endoteliales, células de músculo liso, células mesenquimales, hepatocitos, granulocitos y macrófagos.²⁹ Los leucocitos y las células endoteliales diseminan el virus durante la infección aguda, en respuesta a las quimiocinas producidas que inducen quimiotaxis de neutrófilos y monocitos, lo que da como resultado la propagación viral desde el sitio de infección a otros órganos del cuerpo.³⁰ El vasto tropismo celular de HCMV podría ser la causa de la dispersión sistémica del virus dentro del cuerpo humano y de su diseminación entre hospederos.³¹

De acuerdo con lo reportado por Mocarski, *et al*, el ciclo de replicación del HCMV muestra una tasa de replicación entre 16 y 24 horas post-infección, empieza con la síntesis de DNA viral en el núcleo, sin embargo, no se producen partículas virales hasta las 72 horas post-infección. Sin embargo, la tasa de replicación de HCMV dependerá de la carga viral.³²

Para que ocurra la entrada del virus a la célula, en primer lugar, ocurre la interacción de la partícula viral con la membrana celular a través de la unión de las glicoproteínas virales gB, gM y gN con moléculas de proteoglicanos heparán sulfato (HSPGs) de la superficie celular. En la mayoría de los tipos celulares permisivos a la infección por HCMV, como los fibroblastos, la entrada del virus a la célula sucede a través de las glicoproteínas gH, gL o gO (Figura 6). La unión entre estas moléculas es de carácter débil.³³

En la célula hospedera, varias moléculas han sido propuestas como responsables de la adhesión y acceso del virus al citoplasma celular, entre ellas, algunas integrinas ($\alpha V\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$) o el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).³⁴ Esta segunda interacción para el acceso del virus es más estable y se ha descrito que podría llevarse a cabo a través de una unión gB-EGFR, una interacción con la integrina gB- $\beta 1$, o ambos. Sin embargo el papel de EGFR en la entrada de HCMV permanece incierto y las integrinas pueden actuar en una etapa posterior a la unión/fusión; por lo tanto, es muy probable que se encuentre un receptor o receptores celulares adicionales.³⁵ A continuación, se produce la fusión de la membrana celular con la envoltura de la partícula viral, permitiendo la liberación de la nucleocápside y las proteínas del tegumento directamente al citoplasma celular.³² Se cree que el agrupamiento de receptores y la señalización pueden ocurrir después de la acción de las integrinas celulares por gB y gH, dando lugar a muchos eventos de señalización corriente abajo necesarios para la entrada de virus y/o la expresión génica.³⁵

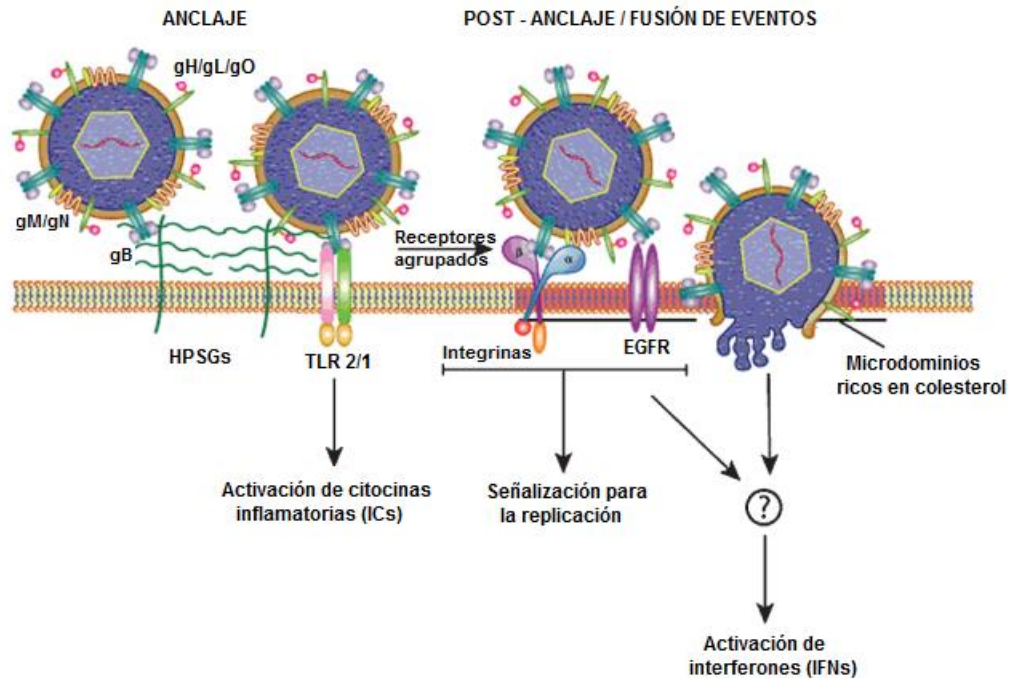


Figura 6. Modelo de entrada del HCMV a la célula. La fusión de la partícula viral con la membrana celular, permite la liberación de la cápside y proteínas del tegumento en el citoplasma celular. (Modificado de Isaacson *et al*, 2008).³³

1.4.1 Ciclo lítico/replicativo.

Una vez en el citoplasma celular, se produce el transporte de la nucleocápside del HCMV a los poros del núcleo, mediante la intervención de diversas proteínas del tegumento como pp48 o pp47 y diferentes elementos del citoesqueleto celular que aún no se han definido. Posteriormente, a través de los poros de la membrana nuclear tiene lugar la entrada del genoma viral al interior del núcleo, donde el DNA lineal del HCMV forma un episoma. A continuación transcurre la expresión del genoma viral, el cual se transcribe a manera de cascada temporal.^{7, 36}

Después de ocurrida la síntesis de las proteínas inmediatas tempranas, el DNA viral es encapsidado y las nucleocápsides son liberadas al citoplasma celular a través de la membrana nuclear. En su paso por la membrana nuclear, la partícula viral adquiere una primera envoltura proveniente de la membrana nuclear interna, la cual pierde al pasar posteriormente por la membrana nuclear externa.³⁷ La envoltura celular definitiva se obtiene al atravesar una serie de compartimentos formados por precursores de los endosomas y el aparato de Golgi. Finalmente las partículas virales envueltas salen al espacio extracelular mediante una serie de procesos asociados con el tráfico de vesículas de exocitosis, llegando con ello a las células cercanas (Figura 7).³⁸

Está establecido que numerosos genes codificados por HCMV expresados durante la infección actúan conjuntamente para ejercer efectos sobre la célula infectada: modulación de una amplia gama de funciones celulares y sus efectos descendentes. Esto incluye la modulación del metabolismo celular, la transcripción, la traducción, el ciclo celular, la señalización celular, así como la inhibición de la vigilancia inmunológica, el estrés celular y la muerte celular.³⁹

La replicación del virus produce un efecto citopático característico; incluyendo un marcado aumento en el tamaño del núcleo, inclusiones intranucleares producidas por el acúmulo de la cromatina viral cuya consecuencia es la pérdida focal de integridad de la membrana nuclear, desplazamiento de orgánelos de la vía secretora celular normal con sitios de ensamblaje del virus y eventualmente disrupción de la membrana plasmática.⁴⁰

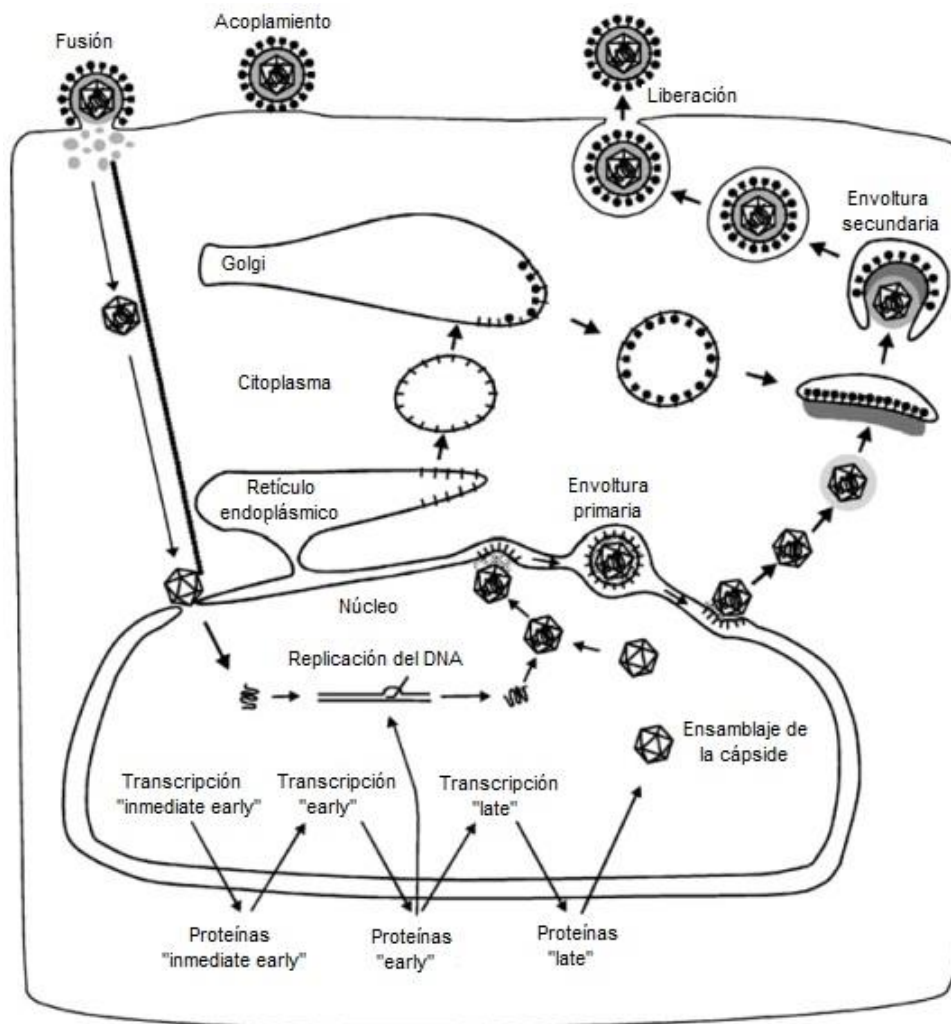


Figura 7. Ciclo de replicación de HCMV. Incluye la entrada del virus a la célula y la disociación del tegumento, transporte de cápsidas entrantes al poro nuclear y liberación del DNA viral dentro del núcleo donde transcurre la transcripción del genoma viral a manera de cascada temporal. (Modificado de Mettenleiter, 2004).⁴¹

1.4.2 Ciclo de latencia y reactivación.

La latencia y reactivación de HCMV representa tanto un problema clínico como un enigma académico desafiante. Se han realizado esfuerzos significativos de investigación para desarrollar una comprensión de los mecanismos que intervienen en el establecimiento y mantenimiento de la latencia viral, así como los principios fundamentales que rigen la reactivación del virus latente.⁴²

A pesar de tener un perfil de transcripción muy restringido, una serie de estudios también han demostrado que la infección latente se asocia con una profunda manipulación de la célula hospedera desde la modulación de la transcripción y modulación de la señalización celular, la inhibición de la vigilancia inmune del hospedero, el estrés celular y la muerte celular.³⁹

Es claro que el virus está dirigiendo una actividad significativa hacia el mantenimiento de la latencia viral en las células. La latencia viral (Figura 8) se establece en los progenitores hematopoyéticos de la médula ósea y el transporte de genomas virales se ha definido en el linaje mieloide/monocito, ocurriendo la reactivación en los macrófagos diferenciados y las CD (células dendríticas). Por el contrario, el genoma viral no se transporta en la población de linfocitos ni hay evidencia de latencia viral en las células endoteliales venosas. Los datos de infección experimental sugieren que las células progenitoras endoteliales y neuronales también pueden ser sitios de latencia, aunque actualmente no existen datos de latencia natural. Sin embargo, la salida de la latencia y la reactivación del ciclo de vida lítico, siguen siendo objetivos de estudio. Un factor clave de este evento es la diferenciación celular a un macrófago diferenciado o célula dendrítica sugiriendo que los cambios en el entorno celular están promoviendo el evento de reactivación.⁴²

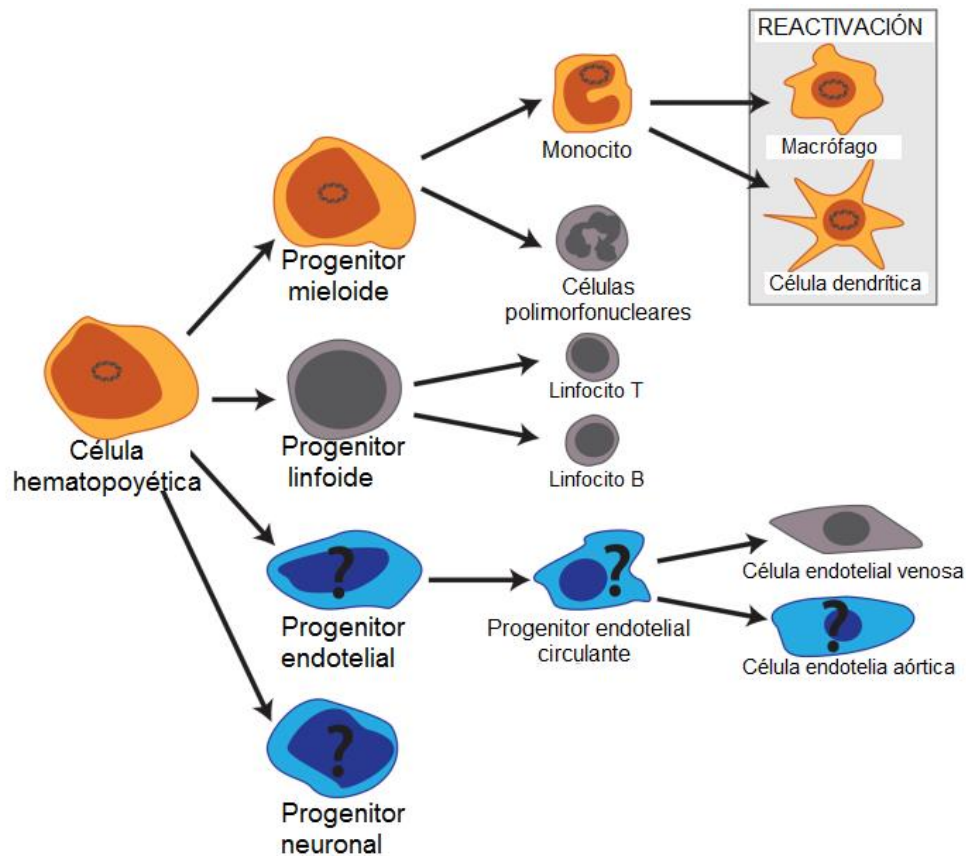


Figura 8. Latencia natural del HCMV en linajes celulares. La latencia de HCMV en el linaje de células hematopoyéticas está bien establecida. La Latencia viral se establece en las células progenitoras hematopoyéticas, ocurriendo la reactivación en células dendríticas y macrófagos, dependiendo de los cambios en el entorno celular. (Modificado de Dupont, 2016).⁴²

1.5 Variabilidad genotípica de HCMV.

El HCMV infecta a muchos tipos de células (células epiteliales, células de músculo liso, fibroblastos, macrófagos, hepatocitos, entre otras) dando lugar a un rango diverso de manifestaciones clínicas sugiriendo que la evolución clínica puede estar relacionada con la variación genética entre las cepas y la respuesta inmune del hospedero.⁴³ Las técnicas diagnósticas utilizadas en la actualidad no nos permiten identificar que pacientes infectados desarrollarán secuelas; sin embargo, la evidencia disponible hasta la fecha sugiere que tanto los factores del hospedero y factores virales como la inmunidad materna, la carga viral en el líquido amniótico o el tipo de cepa de HCMV, pueden contribuir a la evolución de la infección congénita.⁴⁴ Aproximadamente 20 marcos abiertos de lectura (ORF's), se han descrito que presentan alta variabilidad de nucleótidos lo que ha permitido establecer diferentes grupos o genotipos (Tabla 1).⁴⁵

Tabla 1. Variabilidad en los genes de HCMV. (Modificado de Blanco, 2016).⁴⁵

Gen/región variable	Proteína	Número de genotipos
UL1	Glicoproteína UL1	3
UL4	Glicoproteína 48	4
UL6	Glicoproteína UL6	4
UL7	Glicoproteína UL7	3
UL10	Glicoproteína UL10	3
UL11	Glicoproteína UL11	3
UL37	Glicoproteína UL37	5
UL55	Glicoproteína B	gB1-gB4 y gB 5-7
UL73	Glicoproteína N	gN1-gN4c (7 subtipos)
UL74	Glicoproteína O	gO1-gO5 (7 subtipos)
UL75	Glicoproteína H	gH1-gH2
UL123	IE1	3
UL139	Glicoproteína UL139	3 (5 subtipos)
UL144	UL144 (Receptor TNF- α)	A, B, C (Subtipos AC y AB) o 1-3
UL146	vCXCL-1	14 (G1-G14)
UL147	vCXCL-2	

La variabilidad de los genes se encuentra distribuido en la región “unique long” el genoma de HCMV. Los genes UL1, 4, 6, 7, 10 y 11 pertenecen a la familia R11 en donde se describen la mayoría de los tropismos de HCMV.

1.5.1 Glicoproteína B

La glicoproteína B (gB) es sintetizada por el gen UL55 (Figura 9A). Se expresa como una molécula precursora de 906 aminoácidos, que es glicosilada y escindida proteolíticamente entre los residuos 461 y 462. Los fragmentos amino y carboxilo terminales permanecen unidos por un enlace disulfuro formando el complejo gp55 y gp116 (Figura 9B). El gen que codifica para la glicoproteína gB es altamente variable en regiones correspondientes al extremo N-terminal y al sitio de escisión y menos variable en regiones que corresponden al extremo C-terminal de la proteína.^{46, 47}

Es la principal glicoproteína de la envoltura viral responsable de la infección con los receptores celulares.⁴⁷ Participa en la entrada a la célula hospedera y la fusión de células infectadas, siendo un blanco importante para la respuesta inmune humoral y celular, y como principal blanco de los anticuerpos neutralizantes.⁴⁸

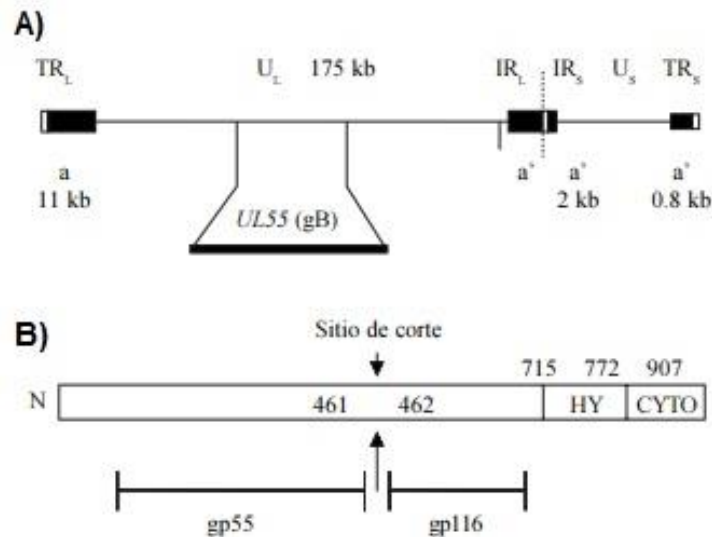


Figura 9. Diagrama esquemático del gen de glicoproteína B. A) Localización del gen UL55 que codifica para gB, se encuentra en la región UL dentro del genoma de HCMV. B) Sitio de corte para formar las subunidades gp55 y gp116. (Modificado de Aragón-Franco, 2006).⁴⁹

Diversos análisis del gen que codifica para la glicoproteína gB (UL55) han mostrado diferencias en la secuencia, produciendo variaciones significativas de aminoácidos en los dominios (I, II y III), incluyendo cambios que afectan a la glicosilación.⁵⁰ La relación entre variaciones genéticas y la enfermedad ha sido objetivo de muchos estudios, debido a que estas variaciones son el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes virales y es esencial para algunas funciones tal como la unión a receptores y la fusión celular.⁵¹

Chou y Dennison, clasificaron cepas de HCMV en cuatro grupos variantes, cada uno con una secuencia de nucleótidos y péptidos característicos. Se propuso un esquema para los genotipos, que emplea el polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP) después de amplificar un fragmento que corresponde al sitio de escindido (gp55) de la glicoproteína gB.¹⁶ De acuerdo con la diferencia en el patrón de corte mediante digestión por enzimas de restricción, se describieron 4 genotipos: gB1, gB2, gB3 y gB4.¹⁶

Se ha demostrado que los diversos genotipos descritos se encuentran distribuidos geográficamente en nuestro país. Se realizó un estudio en el Hospital de la Mujer en la Ciudad de México a neonatos, donde se demostró que el genotipo más frecuente es el genotipo gB2 75%(13/17), encontrando además que hay un 47% (8/17) correspondiente a una mezcla de genotipos en la leche materna (Tabla 2).²³

También se encuentran distribuidos de manera mundial: en un estudio realizado en Estados Unidos el genotipo más frecuente es gB1, seguido por gB3, gB2 y gB4.⁵² En una población de China, gB1 fue el genotipo más abundante, seguido por gB2 y gB3, y también se observaron infecciones mixtas.⁵³ En Brasil, gB1 y gB2 fueron los genotipos más encontrados, seguido por gB3, mientras que el genotipo gB4 no se encontró.⁵⁴ Otro estudio en la India informó que gB2 fue el genotipo más abundante.⁵⁵ Finalmente un estudio realizado en Australia se presentan dos nuevos genotipos gB6 y gB7.⁵⁶

Tabla 2. Comparación de los genotipos detectados en las muestras de DBS de neonatos y en la leche de sus madres. (Modificado de Arellano-Galindo).²³

Infección	DBS (Neonato)	Leche (Madre)
IC	gB2	gB2/gB4
IP	gB3	gB3/gB4
IP	gB2	ND
IC	gB2	gB1/gB2
IP	gB2	gB2
IC	gB1	gB1/gB3
IC	gB2	gB2
IP	gB2	ND
IC	gB2	gB2
IP	gB2	gB2
IP	gB2/gB4	gB2/gB4
IP	gB2	gB2/gB3
IC	gB3	gB1/gB3
IP	gB2	gB2
IP	gB2	gB2/gB4
IP	gB2	gB2
IP	gB2	gB2

IC: infección congénita, IP: infección perinatal, ND: no determinado, DBS: manchas de sangre seca.

Muchos estudios han intentado encontrar una correlación entre el genotipo de la glicoproteína gB y la severidad de la enfermedad asociada a HCMV; sin embargo, no queda claro si ciertos genotipos de gB o mezcla de genotipos de gB están asociados a la presentación de cuadros clínicos más graves de la enfermedad.^{47, 51} Se desconoce el impacto de estas diferencias en la variabilidad a nivel genético en la biología del virus. Pueden ser necesarios nuevos métodos de identificación de genotipos de HCMV si se quiere mejorar la comprensión de la relevancia de la variabilidad de la cepa con respecto al resultado de la enfermedad.⁵¹

El HCMV tienen diferentes genotipos definidos, en una variedad de cepas. Después de la infección primaria, pueden aparecer reinfecciones por genotipos diferentes y con mezclas de genotipos;⁵⁷ se toma en cuenta este hecho de gran importancia debido a que la gB tiene una utilidad potencial para el desarrollo de vacunas y se requieren estudios epidemiológicos moleculares para determinar la distribución de genotipos en diferentes regiones y poblaciones.⁵⁸

1.6 Técnica de PCR-RFLPs.

A lo largo del tiempo han ido apareciendo diferentes técnicas dirigidas al estudio del DNA; probablemente, la más importante sea la PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) desarrollada por Kary Mullis y que revolucionó la biología molecular y la forma en cómo se estudiaban los ácidos nucleicos en ese momento.⁵⁹ La PCR se ha convertido rápidamente en una de las técnicas más utilizadas en biología molecular porque es rápida, económica y sencilla.⁶⁰ Por otro lado, los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) llevan su definición en su nombre, un fragmento de restricción es una fracción de DNA que se escinde del fragmento más grande mediante una enzima de restricción o endonucleasa de restricción. Los polimorfismos están determinados por el número y la longitud variable de estos fragmentos de DNA, el polimorfismo detectado por los RFLPs se basa en el hecho de que pequeños cambios en la secuencia de DNA pueden modificar los patrones de corte de las endonucleasas de restricción. Por ejemplo: la sustitución de una base por otra en la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción produce diferencias en las longitudes de los fragmentos de restricción del DNA de esta zona. Las inserciones o deleciones entre los sitios de restricción también hacen variar el tamaño de los RFLPs.^{61, 62}

La técnica de PCR-RFLP consta de varias etapas separadas que incluyen el diseño de los *primers*, la identificación de una enzima de restricción apropiada, la amplificación del gen en cuestión, el tratamiento con enzimas de restricción de los productos amplificados y la electroforesis para visualizar los fragmentos de restricción.⁶¹ Es una técnica muy utilizada para el análisis genético (determinación de genotipos).

Se ha aplicado para la detección de especies intraespecíficas y de variaciones entre especies. Para detectar las variaciones (polimorfismos) en la secuencia de un genoma se acude a distintas estrategias con enfoques característicos o una combinación de estas. En

principio, se la forma más directa de detectar un polimorfismo es la secuenciación del DNA, pero dada la complejidad y el elevado costo de esta técnica, se suele acudir a otras estrategias entre las que destaca el análisis por RFLPs.⁶³

1.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El principio básico de la PCR es simple. Como su nombre indica, es una reacción en cadena: un fragmento de DNA se utiliza para producir dos copias, luego cuatro, luego ocho y así sucesivamente.⁶⁰ Para ello, la reacción aprovecha los siguientes elementos importantes: el molde o blanco (DNA o cDNA), la enzima (DNA polimerasa), los oligonucleótidos o *primers*, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio (Mg^{2+}), una solución buffer y H_2O .⁵⁹

1.6.1.1 Fases de la PCR

Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales (Figura 10): desnaturalización, alineamiento y extensión. Un ciclo de PCR inicia con la desnaturalización del DNA de la muestra. La temperatura inicial que usualmente se utiliza es de $94^{\circ}C$. Un DNA de doble cadena (DNAd) genera primero dos DNAs de una sola cadena (ssDNAs). Conforme la temperatura es disminuida, los *primers* (forward y reverse, o sentido y antisentido respectivamente) se alinean en sitios específicos y complementarios de las ssDNAs, la temperatura y el tiempo requerido para el reconocimiento de los *primers* depende de la composición, la longitud y concentración de estos. El alineamiento requiere que los *primers* exploren el DNA molde por su secuencia complementaria correcta. Después del alineamiento de los *primers*, la DNA polimerasa se ancla al complejo primer-DNA molde, toma dNTPs del medio y extiende la polimerización a lo largo de la cadena, a este proceso se le conoce como extensión. Esto concluye el primer ciclo con la producción de dos DNA de doble cadena. Las interacciones posteriores repiten los tres procesos en cada ciclo, después de cada ciclo, la cantidad de DNA es de dos veces la anterior, así que después de dos ciclos tenemos 2×2 veces, después de 3 ciclos tenemos $2 \times 2 \times 2$ veces o 2^3 veces la cantidad inicial, después de 4 ciclos ($2 \times 2 \times 2 \times 2$) o 2^4 , en N número de ciclos se producen 2^N DNA de doble cadena.^{64, 65, 66}

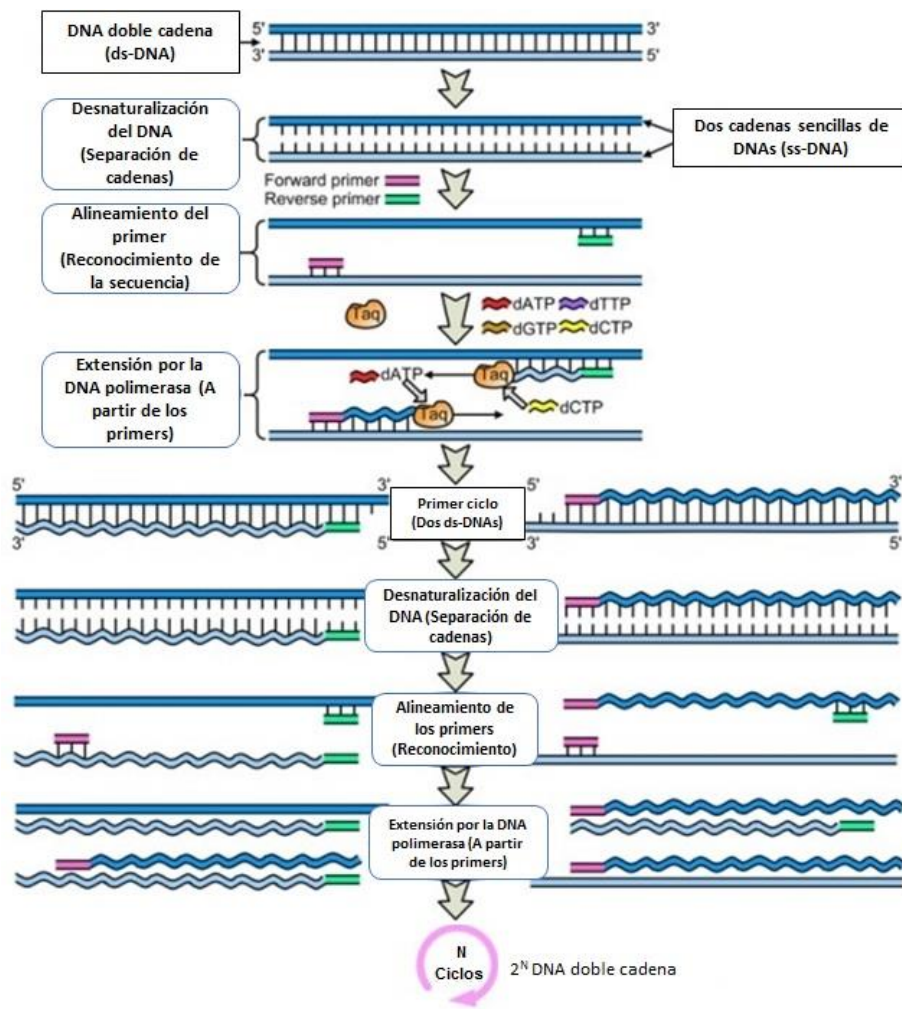


Figura 10. Esquema del proceso cíclico de la PCR. Un ciclo se lleva a cabo en tres etapas: desnaturalización del DNA, alineamiento de los primers al DNA molde y extensión por la DNA polimerasa. (Modificado de Chuang, 2013).⁶⁶

1.6.1.2 DNA molde

Un elemento importante en la PCR es el DNA, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. La molécula de DNA está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otra cadena (Figura 11), de tal forma, que el DNA se estructura en una doble hélice.⁶⁷

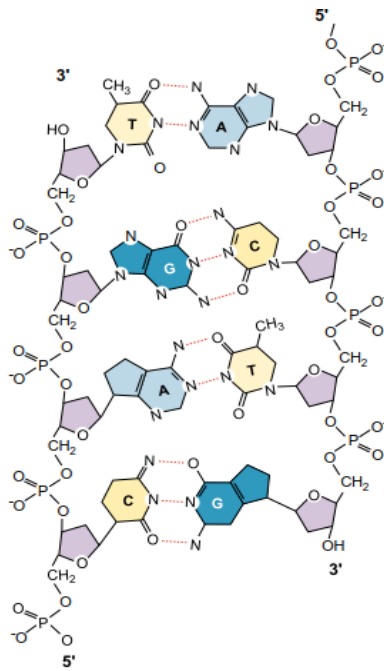


Figura 11. Molécula de DNA de doble cadena. Cada cadena está formada por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada que es complementaria con otra cadena: A = adenina, T = timina, C = citosina y G = guanina.⁶⁷

La correcta amplificación de la región de interés es dependiente de la cantidad y calidad del DNA molde. Los reactivos que se emplean normalmente para purificar ácidos nucleicos (sales, guanidino, proteasas, SDS y solventes orgánicos) están relacionados con la desnaturalización del DNA, la inhibición de la DNA polimerasa y reducción de la concentración de Mg^{2+} .^{68, 64} Es importante tomar en cuenta las siguientes consideraciones para que el DNA molde pueda amplificar de manera correcta:

- Integridad de la molécula molde.
- Evitar emplear agentes quelantes (EDTA) que reduzcan la concentración de iones Mg^{2+} en la solución.
- Relación de D.O 260/280 (calidad y pureza) mayor a igual a 1.6.
- Cantidad de DNA suficiente mayor o igual a $1\mu g$.

En la PCR, el DNA blanco son las cadenas desnaturalizadas de DNA que funcionan como molde para que la enzima pueda sintetizar las nuevas cadenas que llevan las secuencias de interés.⁵⁹ Se ha demostrado que la PCR puede amplificar una molécula del molde inicial; por lo tanto, cualquier fuente de DNA que proporcione una o más moléculas diana puede, en principio, utilizarse como molde para la PCR. Esto incluye DNA extraído a partir de sangre, tejido, especímenes forenses, muestras paleontológicas, colonias bacterianas o placas de fagos.⁶⁹

1.6.1.3 DNA polimerasa.

La DNA polimerasa se encarga de duplicar con gran precisión la información genética durante la fase S del ciclo celular. La DNA polimerasa tiene menos de un error por cien millones de bases. En la PCR, la DNA polimerasa es la que construye una nueva secuencia a partir de la cadena de DNA molde. La enzima más utilizada es la *Taq* polimerasa, que proviene del microorganismo *Thermophilus aquaticus*, posee una gran termoestabilidad y puede resistir los parámetros del termociclador requeridos para la PCR.⁶⁴

La temperatura óptima de extensión en la PCR es de 72°C con *Taq* polimerasa en presencia de iones magnesio y dNTPs. Esta polimerasa, puede amplificar blancos de hasta 10 kb. También se han caracterizado una variedad de DNA polimerasas de otras especies de *Thermus* tales como *Tth* (*Thermus thermophilus*) y *Tfl* (*Thermus flavus*).⁶⁹

1.6.1.4 Oligonucleótidos o *primers*.

Los *primers* son oligonucleótidos que se utilizan para flanquear la secuencia de interés. Son usualmente entre 18 y 30 pares de bases (pb), con un contenido de GC de aproximadamente 50%.⁶⁵ Un primer ideal tiene una temperatura de fusión (T_m) de 55-65°C (lo que corresponde a un 45-55% de GC), ausencia de capacidad de dimerización y de formación significativa de horquillas por interacciones entre las bases y no tener sitios secundarios de acoplamiento en el DNA molde. La temperatura de alineamiento (T_a) de un par de *primers* se calcula generalmente a 5°C menos que la temperatura de fusión (T_m) estimada. La T_a representa la temperatura a la que la mitad de los *primers* se han alineado con su secuencia complementaria, se calcula aproximadamente para secuencias de 20pb o menos.⁶⁴

Dentro de la PCR, el cociente [*primers*]/[DNA molde] es importante de considerar. Si éste es muy alto, existe la formación de dímeros de *primers*, como ocurrirá con una fracción muy diluida de DNA molde o exceso de primer. Si el cociente es muy bajo, el producto no se acumulará exponencialmente, dado que las cadenas recién sintetizadas sufrirán una renaturalización después de la desnaturalización.⁷⁰

1.6.1.5 dNTPs, buffer e iones Mg^{2+} .

Los dNTPs son las bases nitrogenadas con las que la DNA polimerasa construye las nuevas cadenas de DNA. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, se debe tener en una concentración adecuada ya que de lo contrario puede afectar la función

de la DNA polimerasa. Esto dependerá de la mezcla de reacción y de lo que indique el inserto de la DNA polimerasa.⁵⁹

El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8). Muchos fabricantes han incluido el buffer de reacción con la DNA polimerasa y esto resulta conveniente para facilitar el proceso de preparación de los componentes para la PCR.⁶⁵

Las DNA polimerasas utilizan iones metálicos, usualmente magnesio, para la catálisis de la reacción de transferencia de fosforilos. Estos iones Mg^{2+} se unen a la enzima en un sitio activo con residuos aspartato. Un ion metálico sirve para activar el hidroxilo ($-OH$) del nucleótido en el extremo 3' de primer. El ion retira el hidrógeno para facilitar un ataque nucleofílico del oxígeno cargado negativamente, hacia el α -fosfato de los dNTPs entrantes. El segundo ion tiene dos funciones, estabiliza la carga negativa que se acumula por el oxígeno liberado y facilita la salida de los pirofosfatos. Ambos iones metálicos sirven para estabilizar el estado de transición (Figura 12).⁶⁴ Se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la DNA polimerasa; regularmente su concentración óptima es indicada en el inserto de la enzima que se va a utilizar, oscilando entre 0.5 y 2.0mM. En ocasiones se encuentra mezclado con el buffer, pero en otras se tiene que agregar.⁵⁹

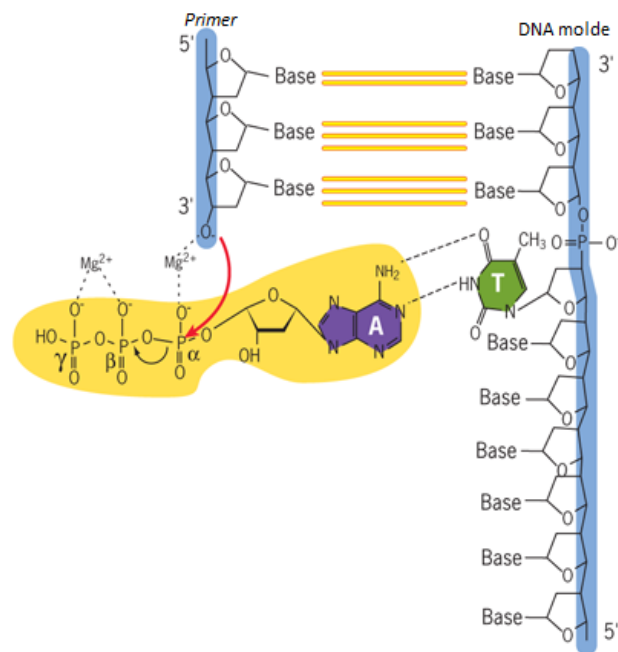


Figura 12. Diagrama esquemático de la reacción de estabilización con el ion Mg^{2+} . El ion Mg^{2+} se une en el sitio activo de la DNA polimerasa. El ion metálico orienta y estabiliza electrostáticamente el grupo trifosfato cargado negativamente de dNTPs.⁷¹

1.6.1 Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).

Los estudios moleculares que más se utilizan para la determinación de genotipos para HCMV son la reacción en cadena de la polimerasa seguido de un análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (por sus siglas en inglés PCR-RFLPs).

El análisis de RFLPs se basa en dos técnicas que se utilizan ampliamente en la biología molecular moderna: la digestión con endonucleasas de restricción de DNA y la visualización de los fragmentos en una electroforesis en gel. Un ejemplo de esto se puede observar en la Figura 13, en la se realiza la determinación de genotipos de gB de HCMV por medio de la técnica PCR-RFLPs.^{16, 72} Los RFLPs se refieren a las diferencias heredadas en los sitios de corte para las enzimas de restricción en el DNA. Los polimorfismos están determinados por el número y las longitudes variables de estos fragmentos de DNA.⁷³

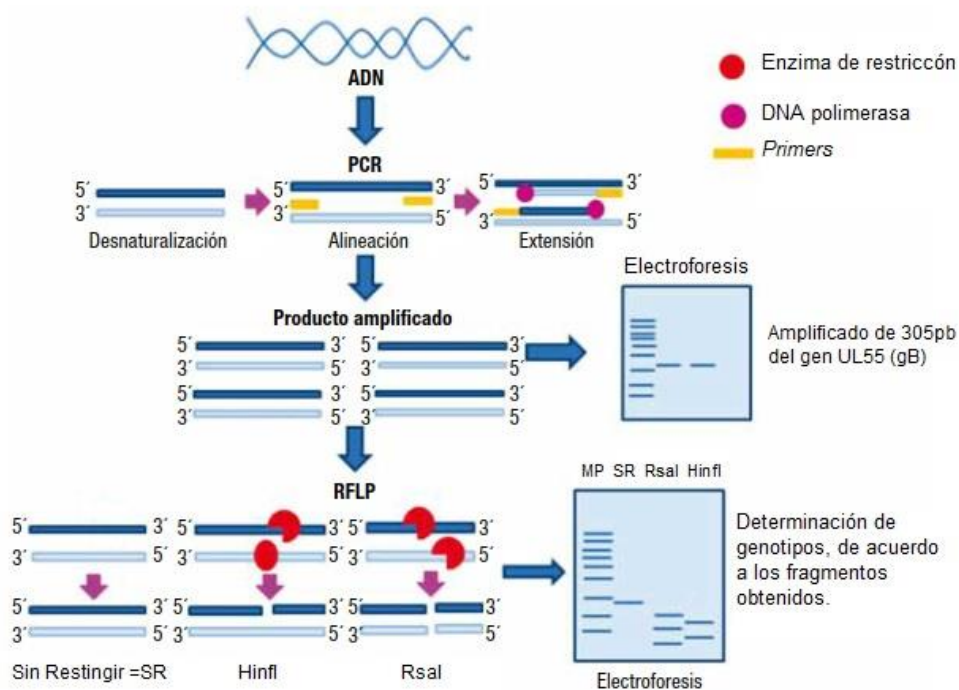


Figura 13. Esquema general de la técnica PCR-RFLPs. Para la determinación de genotipos de gB para HCMV, se realiza la amplificación de un fragmento de DNA, el producto de PCR es digerido por enzimas de restricción, posteriormente se separan los fragmentos mediante electroforesis, obteniendo un patrón de bandas específicos para cada genotipo. (Modificado de Ramírez-Pacheco, 2013).⁷⁴

Un polimorfismo en un patrón de restricción se produce cuando la mutación de un solo par de bases da lugar a la pérdida o creación de un nuevo sitio de restricción o cuando, mediante inserción/delección, se altera el tamaño de un fragmento de restricción.⁷²

Las ventajas de la técnica de PCR-RFLP incluyen: el bajo costo del ensayo y la facilidad con la que se realiza. Además, el diseño de los análisis de PCR-RFLP generalmente es sencilla. Las desventajas incluyen la necesidad de enzimas de restricción específicas y dificultades en algunas ocasiones para identificar la variación exacta del sitio de reconocimiento de las endonucleasas de restricción.⁷⁵

1.6.2 Electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis en gel de agarosa es un método utilizado rutinariamente para separar proteínas, DNA o RNA. Las moléculas se separan por tamaño, mediante la ayuda de un campo eléctrico donde las moléculas cargadas negativamente migran hacia el polo del ánodo (positivo). El flujo migratorio está determinado únicamente por el peso molecular en el que las moléculas de peso pequeño migran más rápido que las más grandes. Además de la separación por tamaño, el fraccionamiento de ácido nucleico usando electroforesis en gel de agarosa puede ser un paso inicial para la purificación adicional de una banda de interés.⁷⁶

La electroforesis en gel de agarosa se emplea ampliamente para estimar el tamaño de los fragmentos de DNA después de digerir con enzimas de restricción, por ejemplo, en la cartografía de restricción del DNA clonado. También ha sido una herramienta de rutina en el diagnóstico de genética molecular o toma de huellas genéticas a través de análisis de productos de PCR.⁷⁷

2. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones adquiridas durante el embarazo o inmediatamente al nacimiento repercuten en la morbimortalidad de las gestantes y de los neonatos; lo cual impacta en la salud (abortos, deficiencias, malformaciones y muerte) y genera un alto costo biológico, social y económico. La infección por HCMV tiene una alta prevalencia mundial y es la principal causa de defectos al nacimiento debido a infecciones. Los reportes sobre la infección por HCMV en población mexicana son escasos; las variaciones genotípicas en los tejidos de recién nacidos fallecidos con IC por HCMV no han sido reportadas en México. La identificación del genotipo prevalente en nuestra población nos permitirá fortalecer los reportes epidemiológicos de HCMV en México y contribuir al estudio de la correlación de los hallazgos clínico patológicos y la presencia de genotipos en el paciente.

3. HIPÓTESIS

De acuerdo con la literatura, en México el genotipo gB2 fue el más frecuente encontrado en una población de recién nacidos prematuros, además de ser el genotipo preferentemente transmitido a los neonatos por la madre infectada. Si el genotipo gB2 y/o coinfecciones con otros genotipos son responsables de IC entonces estarán presentes en los tejidos de los neonatos incluidos en este estudio.

4. OBJETIVOS

4.1 General

- Determinar la frecuencia y distribución de los genotipos de glicoproteína B de HCMV en tejidos (encéfalo, hígado, bazo y pulmón) de recién nacidos prematuros con sospecha de IC mediante el ensayo PCR-RFLPs.

4.2 Particulares

- ✓ Detectar el DNA de HCMV en extractos obtenidos de tejidos conservados en parafina mediante la amplificación del gen UL123 para identificar los casos de IC.
- ✓ Amplificar un fragmento del gen UL55 (gB) de los casos positivos para HCMV.
- ✓ Determinar los genotipos de gB de los casos positivos a HCMV mediante RFLPs.
- ✓ Identificar el DNA de HCMV y determinar el genotipo de un óbito con sospecha de IC por HCMV.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Recepción de muestras.

Las muestras fueron proporcionadas por el Departamento de Anatomía Patológica de la colección de necropsias del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) “Isidro Espinosa de los Reyes”, ubicado en la ciudad de México. Se recibieron muestras de estudios post-mortem de los años 2011-2014 seleccionados con base en los criterios de inclusión (Tabla 3) en donde se incluyeron hallazgos clínicos presentes en una IC por HCMV.

Tabla 3. Criterios de inclusión para los estudios post-mortem.

Criterios de inclusión
Hidrocefalia
Hepatomegalia
Calcificaciones cerebrales
Esplenomegalia
Efectos citopáticos sugestivos de infección viral
Sepsis
Ictericia
Nacimiento pretérmino

Se solicitaron dos cortes de 10µm de encéfalo, pulmones, hígado y bazo. Los cortes del tejido en parafina fueron proporcionados en base en la disponibilidad y existencia de los mismos (Figura 14). Cada bloque de tejido cuenta con un identificador el cual nos indica:

Caso-1	-1
No. De caso	Órgano

Se recibieron 12 casos, sumando un total de 43 muestras (Tabla 4).



Figura 14. Tejidos conservados en bloques de parafina. Los órganos solicitados fueron (de izquierda a derecha): encéfalo, hígado, bazo y pulmones; debido a que son altamente afectados en una infección por HCMV.

Se recolectaron los cortes de cada órgano en dos microtubos de 1.5mL estériles (un corte para ser procesado por el método de Chelex y el otro para procesarse con kit modificado) con ayuda de un asa bacteriológica.

Los estudios recolectados por duplicado fueron los siguientes:

Tabla 4. Tejidos recibidos de cada caso entre los años 2012-2014.

Casos	Órgano*	Año	Casos	Órgano*	Año
CASO-1-2	Bazo	2014	CASO-7-3	Bazo	2014
CASO-1-3	Pulmón		CASO-7-4	Pulmón	
CASO-1-7	Hígado		CASO-7-6	Hígado	
CASO-1-10	Encéfalo		CASO-8-1	Pulmón, bazo	
CASO-2-1	Encéfalo	2014	CASO-8-12	Encéfalo	2014
CASO-2-3	Hígado		CASO-8-2	Hígado	
CASO-2-10	Pulmón		CASO-9-5	Bazo	
CASO-2-11	Bazo, intestino		CASO-9-7	Pulmón	
CASO-3-2	Bazo	CASO-9-8	Encéfalo		
CASO-3-3	Encéfalo	2013	CASO-10-2	Hígado	2013
CASO-3-7	Pulmón		CASO-10-4	Pulmón	
CASO-3-10	Hígado		CASO-10-7	Encéfalo	
CASO-4-4	Pulmón		CASO-10-9	Bazo	
CASO-4-5	Hígado	2013	CASO-11-3	Bazo	2012
CASO-4-8	Encéfalo		CASO-11-7	Hígado	
CASO-5-1	Pulmón	2012	CASO-11-8	Encéfalo	
CASO-5-3	Bazo		CASO-11-11	Pulmón	
CASO-5-9	Encéfalo		CASO-12-1	Bazo	
CASO-5-14	Hígado		CASO-12-4	Pulmón	2012
CASO-6-1	Bazo, timo	CASO-12-6	Encéfalo		
CASO-6-2	Hígado, intestino	CASO-12-7	Hígado		
CASO-6-5	Pulmón				

*De acuerdo a la disponibilidad y existencia en la colección de necropsias del Departamento de Anatomía Patológica del INPer.

5.2 Métodos de extracción de DNA.

5.2.1 Método ZR FFPE DNA MiniPrep™ modificado.

Se utilizó el kit ZR FFPE DNA Miniprep (Cat. D3065), para realizar la extracción de DNA de las muestras de tejido conservado en parafina, con algunas modificaciones. El protocolo para la extracción llevado a cabo fue el siguiente: agregamos 90µL H₂O + 90µL de *Digestion buffer* [2X] + 10µL de *Proteinase K*. Se incubó a 170rpm O/N a 65°C en baño seco. Seguido de una incubación a 90°C durante 1 hora. Después se agregaron 5µL de *RNAse A*, se mezcló e incubó durante 15 min a temperatura ambiente (T/amb). Adicionamos 350µL de *Genomic lysis buffer* + 135µL de isopropanol. Se transfiere el volumen total a la columna *Zymo Spin* y centrifugamos a 10,000rpm durante 1 minuto, desechamos el volumen filtrado

en el microtubo y agregamos 200µL de *DNA pre-wash buffer*, de nuevo centrifugamos a 10,000rpm durante 1 minuto y desechamos el microtubo con el volumen filtrado, se transfiere la columna a un tubo nuevo y se agregaron ≥50µL de *DNA Elution buffer* o agua. Se incubó aproximadamente 5 minutos para finalmente centrifugar a 14,000rpm durante 30 segundos y se almacenó a -20°C para su uso posterior. En las siguientes secciones nos referiremos a este método como “kit modificado o Kit mod”. La cuantificación de cada muestra fue realizada con Bioteck Synergy 2, con el programa Gen5, versión 1.11.5.

5.2.2 Método Chelex™.

Se agregaron 500 µL de reactivo de Chelex [5%] al tubo con el corte y se homogeneizó en vortex, procurando cubrir toda la muestra. Se microcentrifugó para quitar las gotas de la tapa. Incubamos a 56°C O/N a 170rpm en un baño seco. Después se incubó durante 8 minutos a 100°C, homogeneizando en vortex. Centrifugamos a 13,000rpm durante 10 minutos a T/amb. Se tomó el sobrenadante, fase que contiene el DNA y se colocó en un microtubo de 1.5mL. Almacenamos a -20°C. La cuantificación de cada muestra, fue realizada con Bioteck Synergy 2, con el programa Gen5, versión 1.11.5.

5.2.3 Análisis estadístico.

Los rendimientos y la relación de D.O de ambos métodos de extracción fueron comparadas empleando la prueba de distribución t de Student, utilizando un intervalo de confianza del 95%. La concordancia entre los valores obtenidos para los dos métodos fue estimada mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Para estos procedimientos se utilizó el programa GraphPad Prism 5.

5.3 Control positivo para HCMV

El DNA del control positivo se obtuvo de la extracción de un corte de riñón, positivo a HCMV por ensayo de inmunoperoxidasa.

5.4 Amplificación de gen endógeno *GAPDH*.

Se utilizaron los *primers* GAPDH-201-F 5' – GCTCCACCTTTCTCATCCA – 3', GAPDH-201-R 5'- GTCTTCTGGGTGGCAGTCAT – 3',⁷⁸ para amplificar un fragmento de 201pb del gen endógeno *GAPDH*, como prueba de integridad, utilizando la enzima KAPA2G Robust™ High Fidelity en un volumen de reacción de 25µL. Se utilizaron 20ng y una dilución 1:10 del extracto de DNA como molde. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), con las siguientes condiciones:

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	15 seg	} 40
Alineamiento	65°C	15 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Extensión final	72°C	3 min	1

5.5 Amplificación del gen viral UL123

Se utilizaron los *primers* HCMV-220-PPF 5'– GCTCTCCTAGTGTGGATGACCT – 3', HCMV-220-PPR 5'– TCCTCCTCTTCCTCATCACTCTG – 3', para amplificar un fragmento de 220pb del gen viral UL123 (MIE) de HCMV, utilizando la enzima Platimun Taq DNA Polimerase High Fidelity™ en un volumen de reacción de 25µL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), con las condiciones:

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 min	1
Desnaturalización	94°C	15 seg	} 35
Alineamiento	66°C	30 seg	
Extensión	68°C	35 seg	
Extensión final	68°C	35 seg	1

Las condiciones de reacción fueron previamente estandarizadas por el equipo de trabajo, como parte de un protocolo de investigación para HCMV.

5.5.1 Ensayo de restricción con BshNI (Bani)

Para realizar el ensayo de restricción se utilizó el DNA amplificado por PCR y previamente purificado a partir del gel de agarosa con el Kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Cat. D4007) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un volumen de 12µL para la elución.

5.5.1.1 Condiciones para el ensayo de restricción.

Para confirmar que el fragmento amplificado corresponde al gen viral UL123 (MIE), se utilizaron 10µL de DNA purificado para realizar el ensayo de restricción con la enzima BshNI™ (homóloga a Bani) ThermoScientific® [10U/uL] y 2µL como producto sin restringir. La incubación fue de 2 horas a 37°C, seguido de inactivación de la reacción a 4°C. El volumen de reacción fue de 20µL, con las siguientes condiciones:

Componente	1 reacción
DNA purificado	10µL
H2O	7µL
Buffer 10X	2 µL
Enzima BshNI	1 µL
Volumen total	20 µL

5.6 Técnica PCR-RFLPs para determinación de genotipos.

5.6.1 PCR para gen viral UL55

Las condiciones de concentración del DNA molde que fueron eficientes para la PCR del gen UL123 (MIE) (casos positivos para HCMV) por el método de Chelex, fueron utilizadas para amplificar el gen UL55 (gB). Se incluyeron controles positivos de HCMV (1ng y 20ng extraídos por el método de Chelex) y el control negativo de PCR (agua).

5.6.1.1 Condiciones para la PCR.

Los utilizaron los *primers* gB1319: 5' – TGGAAGTGGAAACGTTTGGC – 3' y gB1604: 5' – GAAACGCGCGGCAATCGG – 3';¹⁶ para amplificar un fragmento de 305pb del gen viral UL55 (gB), utilizando la enzima Platimun High Fidelity™ en un volumen de reacción de 50µL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), con las condiciones:

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 min	1
Desnaturalización	94°C	15 seg	} 35
Alineamiento	55°C	30 seg	
Extensión	68°C	35 seg	
Extensión final	68°C	35 seg	1

5.6.2 Ensayo de restricción con HinfI y RsaI

Para determinar el genotipo por RFLPs se purificó el producto de PCR a partir del gel de agarosa con el Kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Cat. D4007) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un volumen de 12µL para la elución.

5.6.2.1 Condiciones para el ensayo de restricción.

Se utilizaron 5µL para la digestión con RsaI de New England BioLabs® Inc. R0155S [10,000 U/ml.], 5µL para la digestión con HinfI de New England BioLabs® Inc. R0167L [10,000 U/ml.] y 2µL como producto sin restringir. Se incubó a 37°C por 15 minutos, con inactivación a 4°C. Las mezclas de reacción para cada enzima se realizaron de la siguiente manera:

Componente	1 reacción
DNA purificado	5µL
H ₂ O	12.5µL
Buffer 10X	2 µL
Enzima RsaI o HinfI	0.5 µL
Volumen total	20 µL

5.7 Electroforesis en gel de agarosa para visualización del DNA

Todos los productos de PCR o de restricción fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa y teñidos con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) al 10000X directamente en la agarosa fundida o SYBR Green® (10000X) dilución 1:10000 directamente en la muestra, incubando 10 minutos a T/amb con protección de la luz.

Dependiendo de los fragmentos a identificar se utilizó el marcador de peso molecular TrackIt™ Thermo Scientific Gene Ruler 50pb DNA Ladder y TrackIt™ Invitrogen 100 pb DNA ladder. El gel se visualizó en un fotodocumentador Alphamager HP (Cell Biosciences). Las condiciones de electroforesis se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de la electroforesis de cada ensayo realizado.

Producto o ensayo	Concentración de agarosa (%)	Volumen cargado en el gel (µL)	Cantidad de DNA (ng) colocado en la PCR	Tamaño de los fragmentos esperados (pb)
Producto de PCR para el gen <i>GAPDH</i>	1.2	5	20	201
Producto de PCR para el gen viral UL123 (MIE)	1.2	5	20	220
Ensayo de restricción con BshNI	2.0	20	-	132 y 88
Producto de PCR para el gen viral UL55 (gB)	1.2	50	20	aprox. 305
Ensayo de restricción con RsaI y HinfI	2.0	20	-	Dependerá del genotipo*

*Se encuentra descrito en la Tabla 12.

5.8 Caso especial: óbito

Se proporcionó un caso especial (Caso-E), por parte del Departamento de Anatomía Patológica del INPer; un óbito femenino de 32 semanas de gestación para ser analizado, debido a que los tejidos mostraban criterios de inclusión (efectos citopáticos sugestivos de infección viral). Los cortes de tejidos recibidos de este caso fueron:

Estudio	Órgano
Caso-E-1	Encéfalo
Caso-E-3	Encéfalo
Caso-E-6	Bazo
Caso-E-146	Placenta

Se realizó la extracción del DNA por el método de Chelex-100, se realizó la identificación del DNA de HCMV y determinación de genotipos por los métodos anteriormente descritos.

6. RESULTADOS

6.1 Métodos de extracción

La cuantificación de las muestras de DNA extraído por el método de kit modificado (Zymo Reseach) se encuentra en el Anexo 1. Los resultados se clasificaron en dos grupos: pureza óptima ($2.0 \geq D.O \geq 1.7$) y no óptimo ($1.6 \geq D.O > 2.0$). De acuerdo con lo registrado en la tabla 6, el 58%(25/43) de las muestras analizadas obtuvieron una relación de densidad óptica (D.O) 260/280 óptima para ensayos moleculares mientras que el 42% (24/43) de las muestras tuvieron una D.O. no óptima. Con respecto al rendimiento de DNA total obtenido, en un 67% (29/43) de las muestras se obtuvo $\geq 1\mu\text{g}$ de DNA, mientras que en el 33% (14/43) se obtuvo $< 1\mu\text{g}$ de DNA.

Tabla 6. Rendimiento y pureza de las muestras extraídas por el método de kit modificado.

KIT MODIFICADO							
	Rendimiento de DNA (μg)	n	%		A260/280	n	%
Óptima	≥ 1	29	67	Óptima	$2.0 \geq D.O \geq 1.7$	25	58
No óptima	< 1	14	33	No óptima	$1.6 \geq D.O > 2.0$	18	42
	Total	43	100		Total	43	100

*n: número de muestras

Para las muestras de DNA extraído por el método de Chelex, las cuantificaciones se encuentran en el Anexo 1. Como observamos en la tabla 7, el 100%(43/43) de las muestras analizadas obtuvieron una D.O. óptima para ensayos moleculares. Con respecto al rendimiento de DNA total obtenido, en un 49% (21/43) de las muestras se obtuvo $\geq 1\mu\text{g}$ de DNA, mientras que en el 51% (22/43) se obtuvo $< 1\mu\text{g}$ de DNA.

Tabla 7. Rendimiento y pureza de las muestras extraídas por el método de Chelex-100.

CHELEX							
	Rendimiento de DNA (μg)	n	%		D.O. 260/280	n	%
Óptima	≥ 1	43	100	Óptima	$2.0 \geq D.O \geq 1.7$	21	49
No óptima	< 1	0	0	No óptima	$1.6 \geq D.O > 2.0$	22	51
	Total	43	100		Total	43	100

*n: número de muestras

Los datos de rendimiento y relación de D.O. 260/280 de ambos métodos de extracción (kit modificado y Chelex) fueron comparadas con la prueba t de Student con un intervalo de confianza del 95% (Tabla 8), donde se incluye además el error estándar en cada media analizada. Se consideraron como diferencias significativas si $p < 0.05$. La concordancia entre

los valores obtenidos para los dos métodos fue estimada mediante el coeficiente de correlación de Pearson (Figura 14).

Tabla 8. Comparación de medias de los métodos de extracción.

Método	n	Promedio D.O ± SE	Promedio Rendimiento ± SE	p valorada D.O	*p valorada rendimiento	p valorada correlación de Pearson D.O	p valorada correlación de Pearson rendimiento
Kit modificado	43	1.9 ± 0.1361	1.9 ± 0.3164	0.9134	<0.0001	0.483	0.094
Chelex	43	2.0 ± 0.04712	7.9 ± 0.9449				

n=número de muestras. *p<0.0001 indica diferencia significativa.

El análisis realizado para el rendimiento de DNA obtenido por ambos métodos (Figura 15A) con la prueba t de Student tuvo una diferencia significativa y de acuerdo con la correlación de Pearson el valor del coeficiente de correlación obtenido es un valor muy bajo, existiendo así, diferencia en cuanto a la cantidad de DNA extraído por los dos métodos evaluados. En el análisis estadístico (t de Student) de los valores evaluados para D.O de ambos métodos (Figura 15B) no se obtuvo diferencia significativa. Con respecto a la correlación de Pearson el valor obtenido del coeficiente de correlación es bajo, pero nos indica que las dos técnicas no tienen diferencia significativa en cuanto a la sensibilidad con la que extraen DNA de alta calidad.

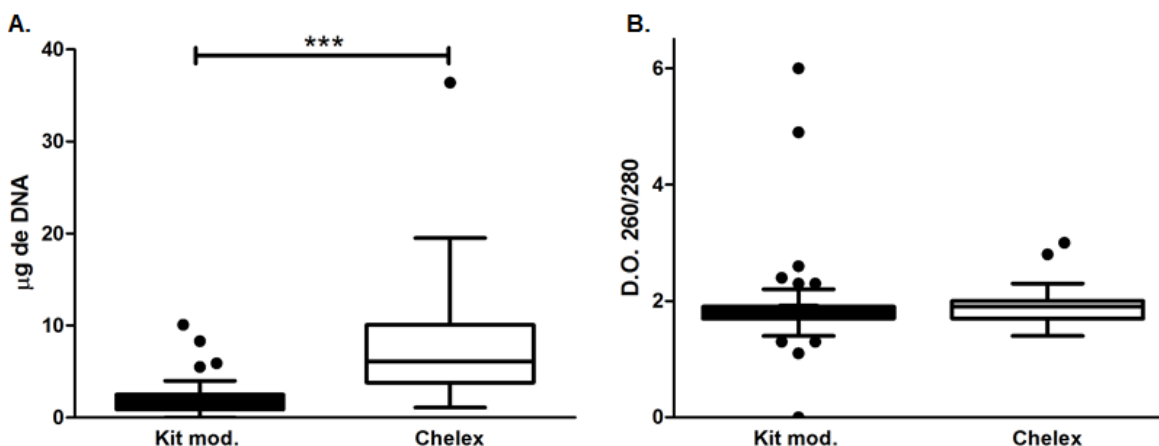


Figura 15. Comparación de dos métodos de extracción de DNA. A. Cantidad de DNA vs método de extracción. B. Relación de D.O. 260/280 vs método de extracción. Las gráficas representan el promedio de las muestras (n=43±EE). Prueba estadística aplicada t de Student con intervalo de confianza al 95%. ***p<0.0001 indica diferencia significativa.

6.2 Control positivo para HCMV.

La cuantificación para el control positivo con ambos métodos de extracción se observa en la tabla 9. En donde observamos que la relación de D.O. es óptima para ambos extractos

(Kmod=2.0 y Ch=1.9). El extracto de DNA de Chelex tiene una concentración mayor a [10ng/μg] óptima para ensayos moleculares, mientras que el extracto de kit modificado es menor a esta concentración. En los dos controles de extracción no se obtuvo DNA.

Tabla 9. Cuantificación del control positivo para HCMV por ambos métodos de extracción.

Muestra	D.O. 260/280	[ng/ul]
Kit modificado	2.0	4.4
Chelex-100	1.9	14.1
Ctrl (-) extracción Km	1.5	1.9
Ctrl (-) extracción Ch	1.1	0.9

En un primer ensayo de PCR se utilizaron 5μL de los extractos de DNA para la reacción con lo cual en total se colocaron para kit modificado 22ng y para Chelex 70.5ng, en la Figura 16 se observa la amplificación de un fragmento de 200pb del gen viral UL123 para el control positivo extraído por el método de kit modificado, por el contrario, no se observa amplificado para el extracto de DNA HCMV extraído por Chelex. Se obtuvo el producto del tamaño esperado para el control positivo de PCR, que fue 1ng de DNA de la cepa Towne. Mientras que en el control negativo de PCR no se obtuvo amplificado.

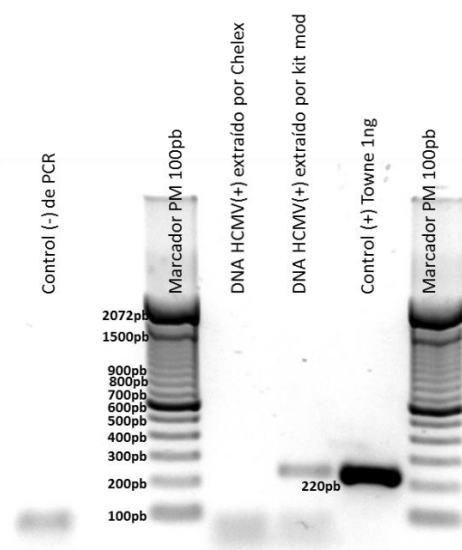


Figura 16. Amplificación de un fragmento de 220pb del gen viral UL123 (MIE) para el control positivo de HCMV extraído por los métodos de Kit mod y Ch. El control positivo de PCR fue 1ng de DNA de la cepa Towne de HCMV. El DNA fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y teñido con GelRed.

En la Figura 17 se observa que, al diluir el extracto de DNA a concentraciones menores, aumenta la eficiencia de la PCR ya que hay amplificado en todas las cantidades colocadas (1ng, 10ng, 20ng y 40ng). En las muestras para 20ng y 40ng se observan también

amplificados inespecíficos por debajo del fragmento esperado. En el control positivo de PCR se observa el amplificado esperado (220pb), mientras que en los controles negativos de PCR no hubo amplificados.

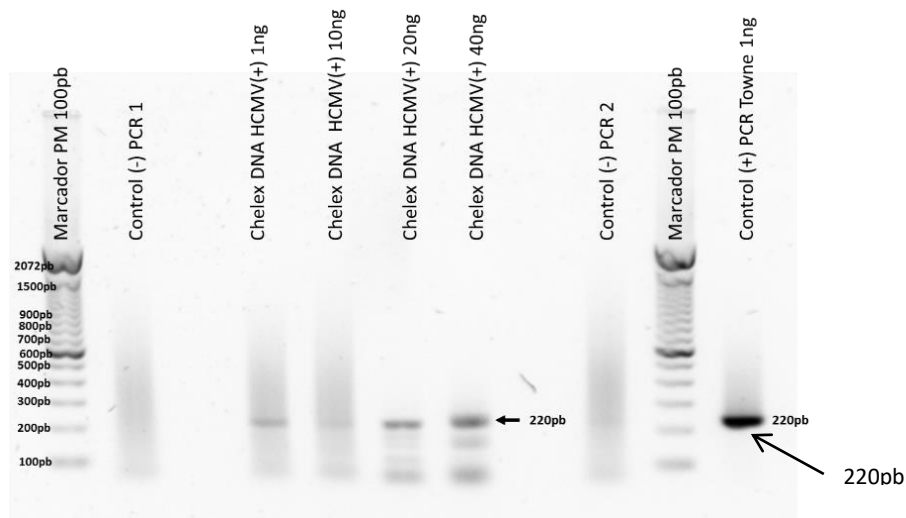


Figura 17. Amplificación de un fragmento de 220pb del gen viral UL123 (MIE) para el control positivo de HCMV extraído por el método de Chelex usando diferentes concentraciones de DNA molde. El control positivo de PCR fue 1ng de DNA de la cepa Towne de HCMV. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y teñido con GelRed.

6.3 Amplificación de gen endógeno GAPDH.

En la Figura 18A se observan las muestras 1, 3 y 14 del CASO-5, las muestras 3, 4 y 6 del CASO-7, y las muestras 3 y 5 del CASO-4, que fueron extraídas por el método de kit mod. si se obtuvo DNA amplificable pues se observa un fragmento de 201pb del gen *GAPDH*.

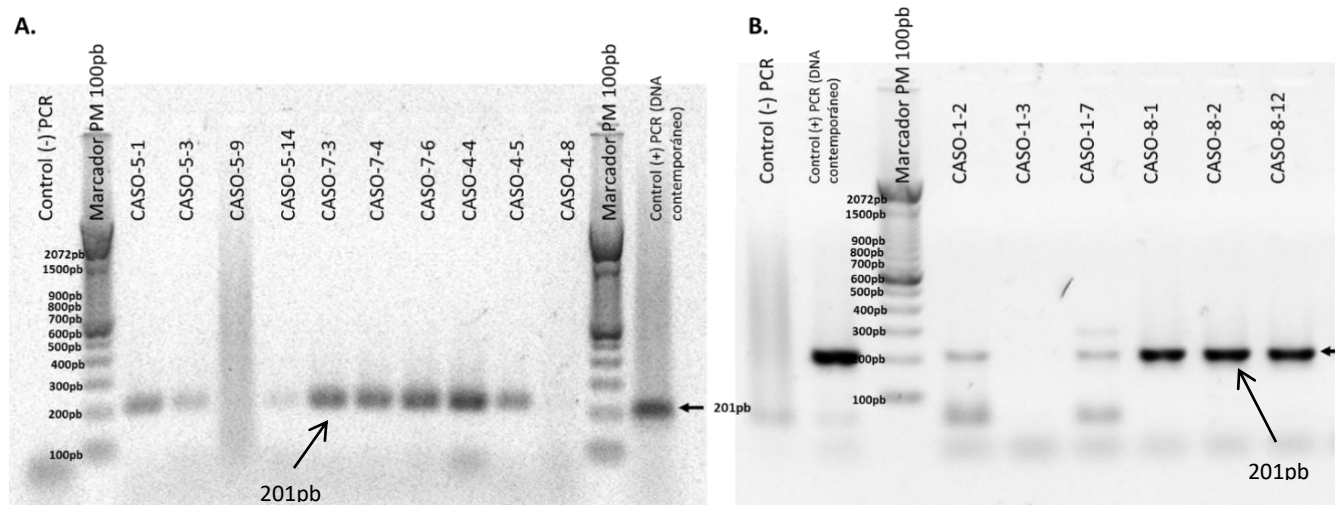


Figura 18. Amplificación de un fragmento de 201pb del gen endógeno *GAPDH* para los casos extraídos por el método de kit modificado. A. CASO-5, CASO-7 y CASO-4, respectivamente. B. CASO-1 y CASO-8. El control positivo de PCR utilizado fue DNA contemporáneo. El DNA se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, tinción con GelRed.

En la Figura 18B se observa amplificado en las muestras 1 y 7 del CASO-1, las muestras 1, 2 y 12 del CASO-8. Se obtuvieron los productos de tamaño esperado en los controles positivos de PCR, mientras que en los controles negativos de PCR no tuvo amplificado (Figura 18A y B).

El CASO-2 y el CASO-7, extraídos por el método de Chelex, fueron analizados para amplificar un fragmento de 201pb del gen *GAPDH*. Los resultados pueden verse en la Figura 19. Se obtuvieron los productos esperados en todas las muestras del CASO-2, para el CASO-7 solo las muestras 3 y 4 obtuvieron el amplificado esperado, el CASO-7-6, no tuvo ningún amplificado, solo un ligero barrido. El control positivo de PCR (DNA contemporáneo) obtuvo el fragmento de 201pb esperado. En los controles negativos de extracción y de PCR no hubo amplificado.

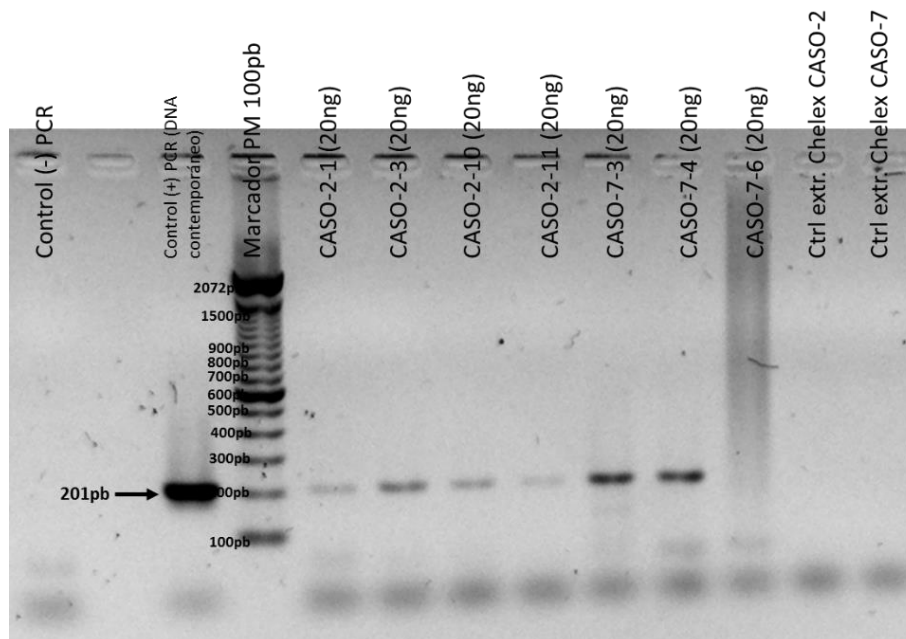


Figura 19. Amplificación de un fragmento de 201pb del gen endógeno *GAPDH* para muestras extraídas por el método de Chelex. En el gel se muestran los estudios CASO-2 y CASO-7 para el análisis. El control positivo de PCR fue DNA contemporáneo. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, teñido con GelRed.

6.4 Amplificación del gen viral UL123 (MIE)

Previamente, el grupo de trabajo realizó la evaluación de 12 estudios, extraídos por el método de kit modificado, para la búsqueda del gen viral UL123 (MIE). Para comprobar los datos, en el presente trabajo se volvieron a evaluar los estudios que dieron un resultado positivo para HCMV, pero usando el extracto de DNA obtenido por el método de Chelex y con las condiciones de dilución que amplificaron el gen *GAPDH*.

Los resultados de la amplificación de *GAPDH* del CASO-4 y la muestra CASO-1-3 y CASO-2-1 se observan en la Figura 20, en la cual sí hay amplificado (de diferente intensidad) en todas las muestras. El control positivo de PCR fueron 20ng de DNA extraído por el método de Chelex, también se obtuvo el fragmento de 220pb. El control negativo de PCR no tuvo ningún producto amplificado.

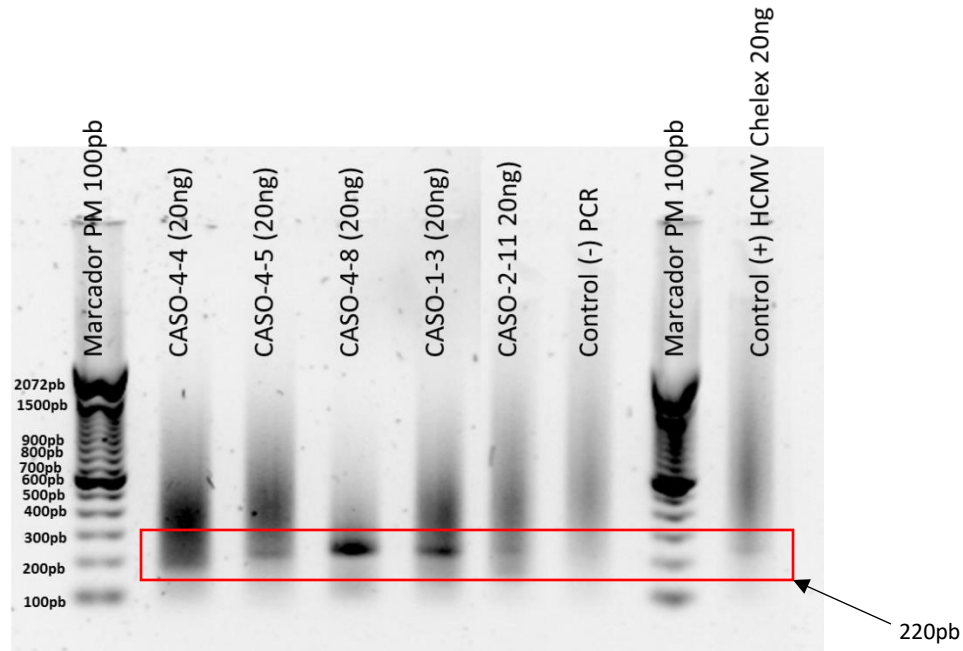


Figura 20. Amplificación de 220pb del gen viral UL123 (MIE) de HCMV para el CASO-4 y muestras del CASO-1-3 y CASO-2-11. El control positivo de PCR fue 20ng de DNA de HCMV extraído por el método de Chelex. El DNA se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y teñido con GelRed.

En la Figura 22 se observan los productos de PCR para el CASO-3 y CASO-4. Observamos el fragmento amplificado de 220pb para las muestras CASO-3-7 y CASO-4-4 (Figura 21A). Las muestras 2, 3 y 10 del CASO-3 y CASO-4-5 no obtuvieron amplificado, el CASO-4-8 no tiene amplificado, pero sí un ligero barrido. En la Figura 20B se observa la repetición de la PCR del CASO-3 y CASO-4. En la cual, se obtuvieron los productos de 200pb para las muestras CASO-3-2, CASO-3-10, CASO-4-4, CASO-4-5. Las muestras que no amplificaron fueron CASO-3-3, CASO-3-7, CASO-4-8.

Se obtuvieron los fragmentos de tamaño esperado en los controles positivos (1ng y 20ng) para HCMV extraídos con Chelex solo en la repetición (Figura 21B). Los controles negativos de PCR tuvieron un ligero barrido, pero no hay amplificados (Figura 21A y B). Con estos resultados se confirmó el diagnóstico de infección por HCMV en las muestras CASO-3-2, CASO-3-7, CASO-3-10, CASO-4-4, CASO-4-5.

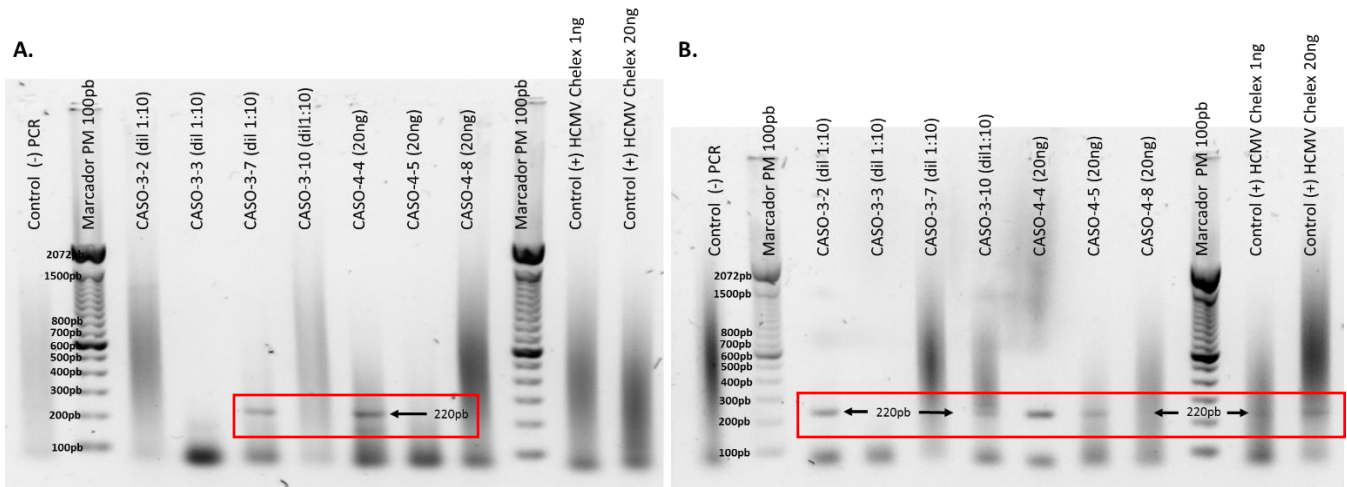


Figura 21. Amplificación de 220pb del gen viral UL123 (MIE) de HCMV para el CASO-3 y el CASO-4 extraídos por el método de Chelex. A. Primer ensayo. B. Segundo ensayo (para reproducibilidad). El control positivo de PCR 1ng y 20ng de DNA de HCMV extraído por el método de Chelex. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y tinción con GelRed.

En la Figura 22 se observan los productos de PCR para el CASO-6, en la cual, vemos que no hay productos amplificados en ninguna de las muestras (CASO-6-1, CASO-6-2 y CASO-6-5). Se obtuvieron los productos esperados para los controles positivos (1ng y 20ng) de DNA de HCMV extraído por Chelex. El control negativo de PCR no obtuvo amplificados. Con estos resultados se descarta una infección por HCMV en este estudio.

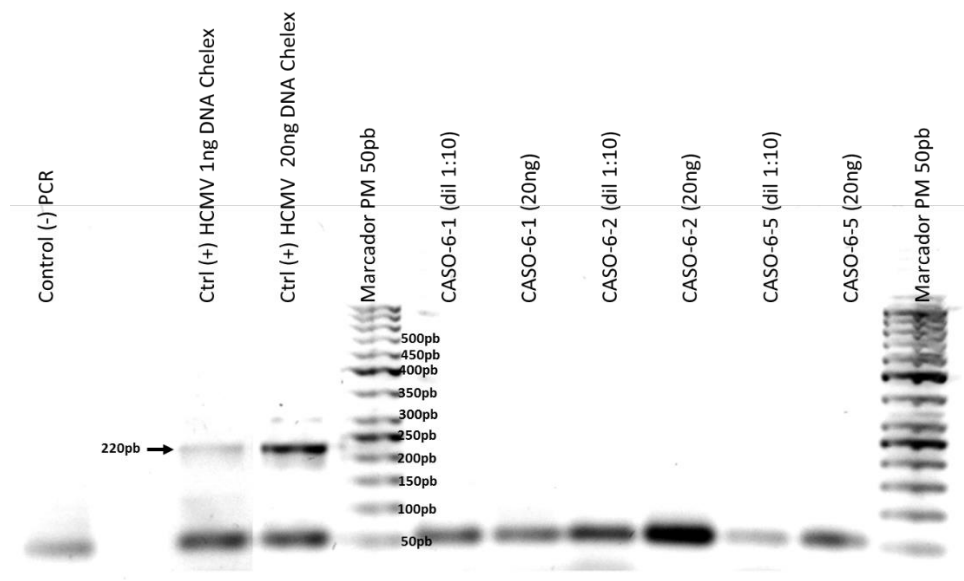


Figura 22. Amplificación de 220pb del gen viral UL123 (MIE) de HCMV para el CASO-6 extraído por el método de Chelex. No se observa amplificado en ninguna muestra. El control positivo fue DNA de HCMV extraído por el método de Chelex (1ng y 20ng). El DNA se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y tinción por GelRed.

Los productos de PCR para el CASO-1 se presentan en la Figura 23. En la cual observamos amplificado de 220pb del gen viral UL123 (MIE) en las muestras 2, 3 y 7 del CASO-1. En la muestra 10 del CASO-1 no hubo ningún amplificado. Se obtuvieron los fragmentos de tamaño esperado en los dos controles positivos (1ng y 20ng) de DNA extraído por el método de Chelex. En el control negativo de PCR no se obtuvo amplificado.

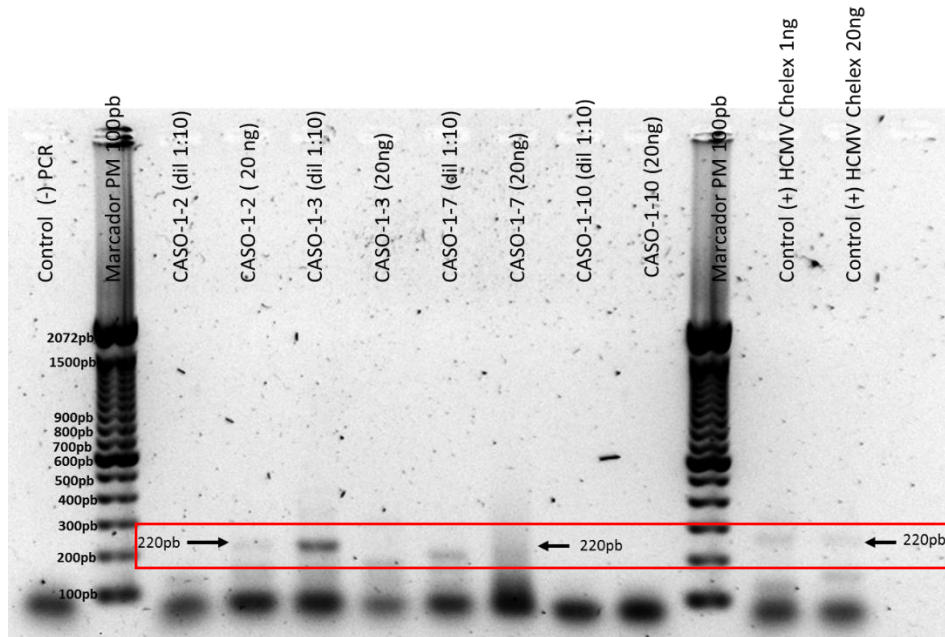


Figura 23. Amplificación de 220pb del gen viral UL123 (MIE) de HCMV para el CASO-1 extraído por el método de Chelex. El control positivo de PCR fue DNA de HCMV extraído por el método de Chelex (1ng y 20ng). Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y teñido con GelRed.

En la Figura 24 encontramos los productos de la PCR para el CASO-2. Se observan amplificados en todos los extractos, pero con diferente dilución. Para el CASO-2-1 solo amplificó un producto aparentemente menor al esperado de aproximadamente 200pb con una dilución 1:10, mientras que al colocar 20ng no hay ningún amplificado. En el CASO-2-3 hubo amplificado con una dilución 1:10 del extracto, a diferencia de donde se colocaron 20ng en el que no hubo ningún producto. El CASO-2-10 también amplificó el fragmento de 220pb con la dilución 1:10 y no hay amplificado al colocar 20ng. Para el CASO-2-11 hubo un fragmento de 220pb al colocar 20ng del extracto y no hubo amplificado en la dilución 1:10.

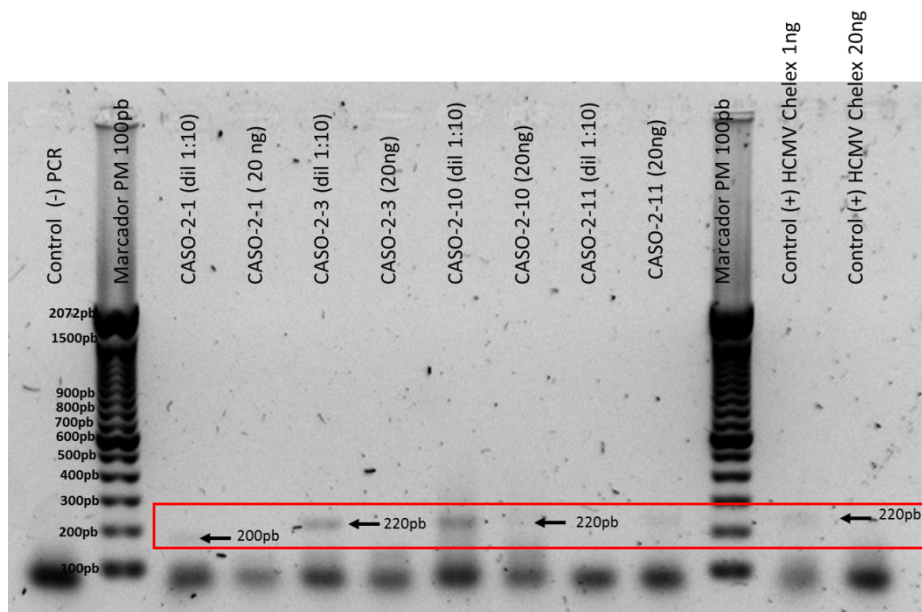


Figura 24. Amplificación de 220pb del gen viral UL123 (MIE) de HCMV para el CASO-2 extraído por el método de Chelex. El control positivo de PCR fue DNA de HCMV extraído por el método de Chelex (1ng y 20ng). El DNA se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y tinción con GelRed.

6.4.1 Ensayo de restricción con enzima BshNI

En la Figura 25 se observan los productos del ensayo de restricción usando DNA purificado de gel para las muestras 2 y 7 del CASO-3 y DNA de HCMV de la cepa Towne, así como los productos de restricción usando DNA de HCMV de la cepa Towne sin purificar de gel. Se observa que al someter a digestión con la enzima BshNI (homóloga a BanI) el DNA de HCMV de la cepa Towne sin purificación de gel, se obtienen los dos fragmentos esperados (132pb y 88pb). En las muestras CASO-3-2 y CASO-3-7 se obtienen los productos esperados y para la muestra CASO-3-7 se observa DNA sin restringir. Con la muestra de DNA de HCMV de la cepa Towne purificado del gel, se obtienen los dos fragmentos esperados, pero se tiene DNA sin restringir. Se colocó DNA sin restringir para cada muestra como control si digerir.

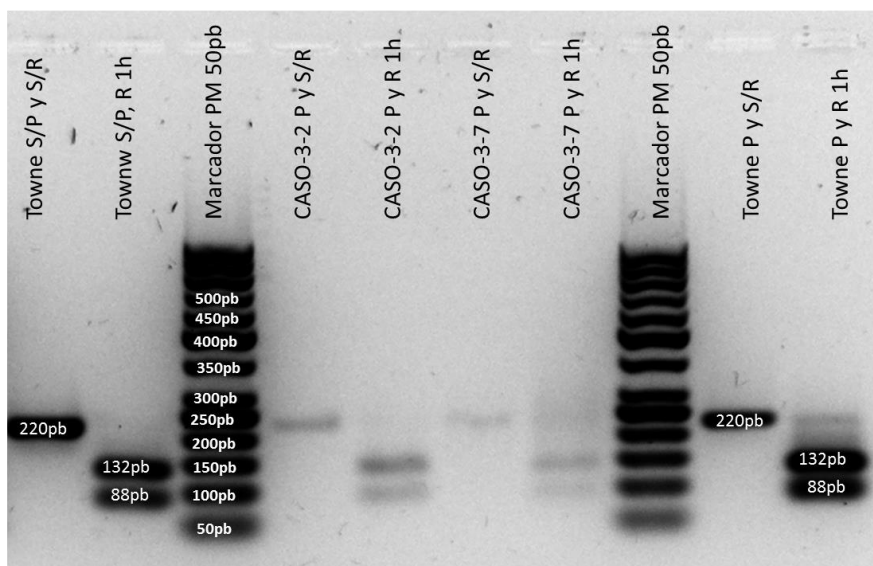


Figura 25. Ensayo de restricción con la enzima BshNI (Bani) para el CASO-3-2 y el CASO-3-7. El control positivo es una amplificado de 220pb de DNA de HCMV de la cepa Towne. S/P=Sin purificar, S/R=Sin restringir, P=Purificado y R=Restringido. Los productos de la digestión se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.0% y teñido con GelRed.

En total los estudios que amplificaron el fragmento de 220pb del gen viral UL123 fueron 5, lo que equivale al 42% (5/12). Los casos positivos fueron CASO-5, CASO-4, CASO-3, CASO-2 y CASO-1. Los órganos positivos de cada caso se observan en la Tabla 10.

Tabla 10. Órganos positivos a infección por HCMV de los cinco estudios.

Estudio	Órgano
CASO-5-1	Pulmón
CASO-5-9	Encéfalo
CASO-4-4	Pulmón
CASO-4-5	Hígado
CASO-4-8	Encéfalo
CASO-3-2	Bazo
CASO-3-7	Pulmón
CASO-3-10	Hígado
CASO-2-1	Encéfalo
CASO-2-3	Hígado
CASO-2-10	Pulmón
CASO-2-11	Bazo, intestino
CASO-1-2	Bazo
CASO-1-3	Pulmón
CASO-1-7	Hígado
CASO-1-10	Encéfalo

En 2/5 de los neonatos fallecidos se encontró DNA de HCMV en todos los tejidos analizados. Los tejidos más frecuentemente afectados fueron pulmón (5/5 = 100%), encéfalo (4/5 = 80%) y hígado (4/5 = 80%). La distribución de la infección con HCMV por año estudiado se encuentra en la tabla 11. En la cual observamos que, en el año 2012 de 3 estudios evaluados, solo uno resultado positivo a infección por HCMV, mientras que en el año 2013 de 4 estudios evaluados 2 casos fueron positivos a IC por HCMV. Finalmente, en el año 2014 solo 2 casos resultaron positivos a HCMV de 5 estudios evaluados.

Tabla 11. Casos encontrados de infección por HCMV en el INPer en los años estudiados (2012-2014).

Año	Casos con infección	Casos sin infección
2012	1	2
2013	2	2
2014	2	3

6.5 Técnica PCR-RFLPs

Los resultados de la amplificación de un fragmento de aproximadamente 305pb del gen viral UL55 (gB) para el CASO-3 y CASO-4 se observan en la Figura 26, en la cual hay amplificado en las muestras 2, 7 y 10 del CASO-3 y las muestras 4, 5 y 8 del CASO-4. Se obtuvieron los productos esperados en los controles positivos de PCR para 1ng y 20ng. El control negativo de PCR no tuvo amplificadas.



Figura 26. Amplificación de un fragmento de 305pb del gen viral UL55 (gB) para el CASO-3 y CASO-4. Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y teñido con GelRed.

En la Figura 27, observamos los productos de la PCR del gen UL55 (gB) del CASO-2. Se observa que sí amplificaron los productos esperados en todas las muestras colocadas

(CASO-2-3, CASO-2-10 y CASO-2-11). También amplificaron los controles positivos de HCMV (1ng y 20ng). No hubo amplificados en el control negativo de PCR.

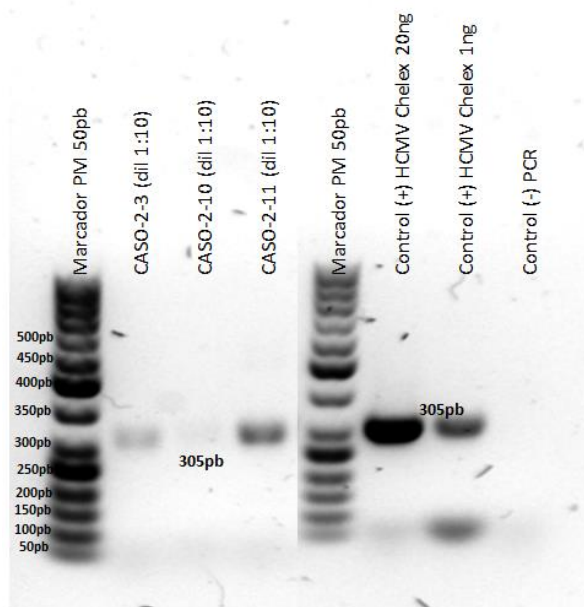


Figura 27. Amplificación de un fragmento de 305pb del gen viral UL55 (gB) para el CASO-2. El control positivo fue DNA de HCMV extraído por el método de Chelex. El DNA se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y tinción con GelRed.

En la Figura 28 se observan los productos de PCR para el gen viral UL55 (gB) de las muestras 1, 3, 7 y 10 del CASO-1 y las muestras 1 y 9 del CASO-5. Se obtuvo el fragmento esperado de aprox. 305pb en todas las muestras colocadas. Los controles positivos de PCR (1ng y 20ng) también amplificaron el producto esperado. El control negativo de PCR no obtuvo amplificado.

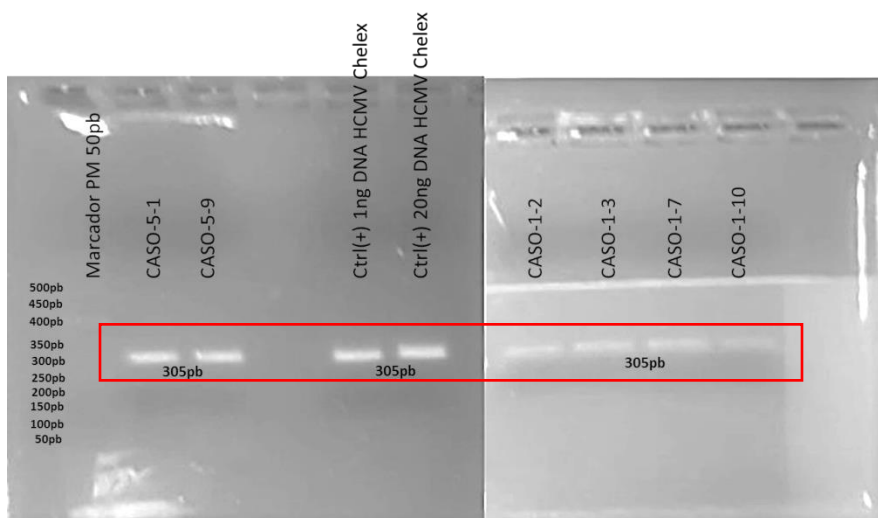


Figura 28. Amplificación de un fragmento de 305pb del gen viral UL55 (gB) para el CASO-5 y el CASO-1. Las muestras cargadas fueron el total del producto de la PCR para su posterior purificación en gel. Visualizado en un transiluminador de onda corta. Tinción SYBR Green™.

Para conocer los genotipos se tomó como referencia el artículo de Chou y Dennison¹⁶ para determinación de los 4 genotipos diferentes (Figura 29 y Tabla 12).

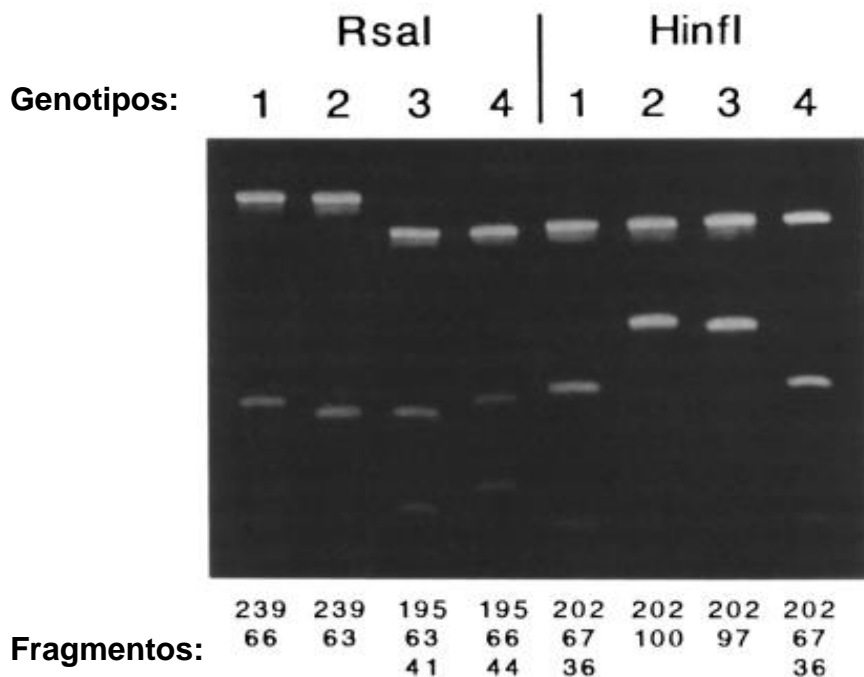


Figura 29. Digestión de restricción de la parte amplificada de glicoproteína B (bases 1319-1604). Enzimas RsaI y HinfI producen perfiles de digestión fácilmente identificables para los grupos 1-4 de HCM.

Tabla 12. Fragmentos esperados del ensayo de restricción para la glicoproteína B de cada genotipo.

Enzima	RsaI				HinfI			
Genotipo	1	2	3	4	1	2	3	4
Fragmentos	239	239	195	195	202	202	202	202
	66	63	63	66	67	100	97	67
			41	44	36			36

Para determinar los genotipos de HCMV se realizaron ensayos de digestión con las enzimas RsaI y HinfI. En la Figura 30 se observa la digestión del CASO-5-1 y CASO-5-9. La muestra CASO-5-1 en digestión la enzima RsaI obtuvo dos bandas (239pb y 67pb), con la enzima HinfI también obtuvo 2 bandas (202pb y 100pb), determinando el genotipo gB2 para este tejido. Para la muestra CASO-5-9 con la enzima RsaI se observan 2 bandas (239pb y 67pb), mientras que para la enzima HinfI se observan 4 bandas (202pb, 100pb, 66pb y 36pb), además se observa DNA sin restringir; se determinó que el genotipo gB es una coinfección gB1/gB2. Se realizó el mismo ensayo de restricción para los controles positivos de HCMV para 1ng y 20ng, determinando una coinfección de genotipos gB1/gB2.

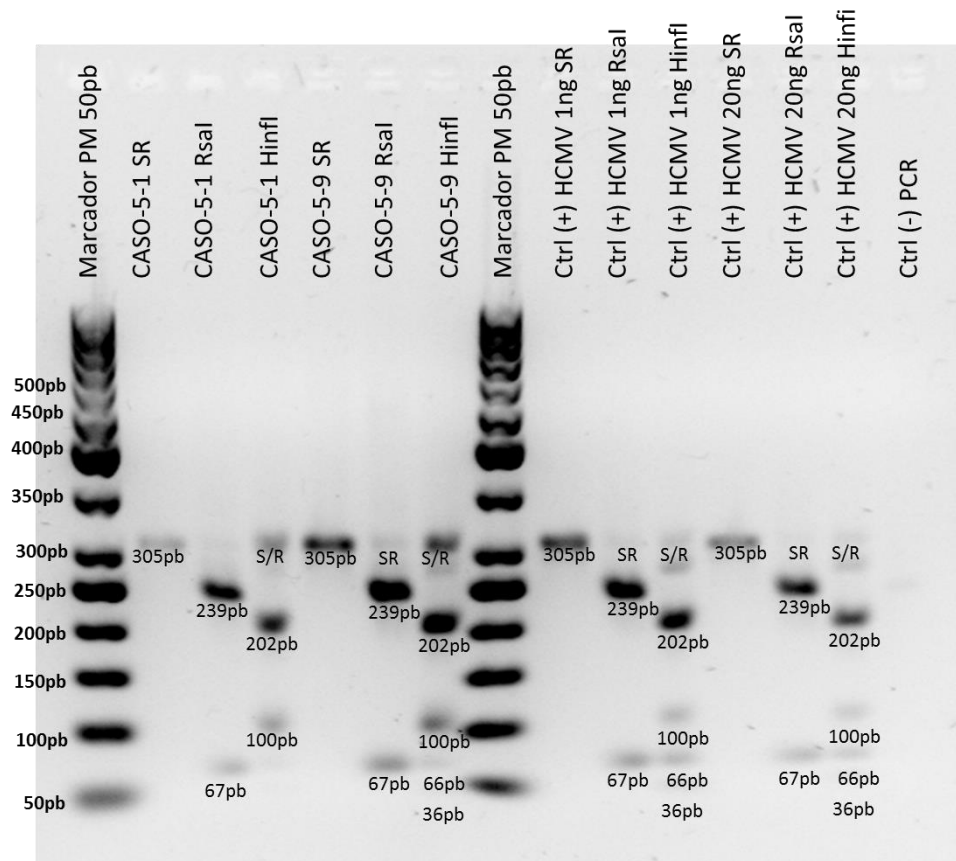


Figura 30. Ensayo de restricción con las enzimas Rsal y HinfI para el CASO-5. SR=sin restringir, pb=pares de bases. Imagen representativa del genotipo gB2 y la mezcla de genotipo gB1/gB2. El DNA del ensayo se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.0% y tinción con GelRed.

Los productos de dos ensayos de restricción del CASO-4 se observan en la Figura 31. Para la muestra 5 del CASO-4 (Figura 31A) en digestión con la enzima Rsal se obtuvieron fragmentos de 239pb y 67pb. Con la digestión enzimática de HinfI se obtuvieron fragmentos de 202pb y 100pb. Determinando un genotipo gB2 para esta muestra. Para el CASO-4-4 y el CASO-4-5 se observa solo un fragmento con la enzima Rsal de 239pb, y con la enzima HinfI se observa un fragmento de 202pb. El genotipo queda indeterminado, pero con sospecha de gB1 o gB2.

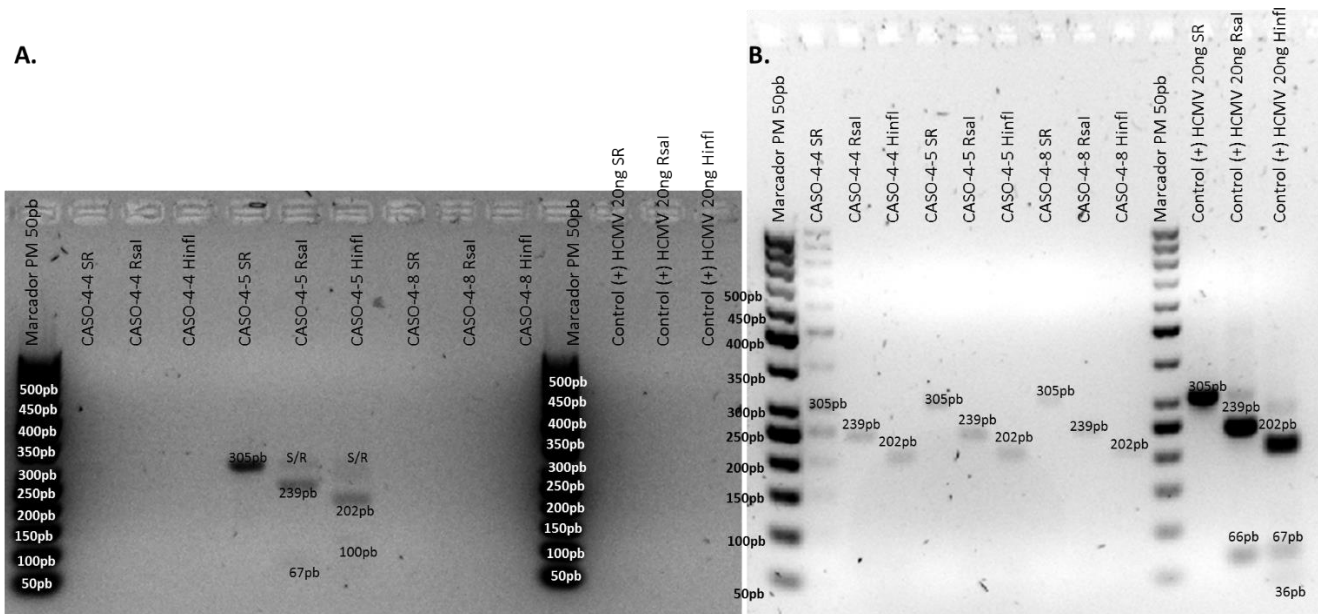


Figura 31. Ensayo de restricción con las enzimas Rsal y HinfI para el CASO-4. A. Primer ensayo con CASO-4. B. Segundo ensayo con CASO-4. Imagen representativa del genotipo gB2. SR=sin restringir, pb = pares de bases. El DNA del ensayo de restricción se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.0% y teñido con GelRed.

Los resultados de la digestión para el CASO-3 se observan en la Figura 32. Para el CASO-3-2 y el CASO-3-7 (Figura 32A y B) con la enzima HinfI se obtuvieron los fragmentos de tamaño aproximado de 202pb y 100pb, la digestión con la enzima Rsal produjo los fragmentos de tamaño aproximado de 239pb y 76pb. Se observa una ligera banda sin restringir del control positivo de 20ng (Figura 32A). En el CASO-3-10 (Figura 32B) con la enzima HinfI se obtuvo un fragmento de 202pb, y la digestión con la enzima Rsal se obtuvo un producto de 239pb. El genotipo gB2 en el CASO-3. El control positivo de PCR (1ng de DNA del bloque de riñón HCMV positivo extraído por Chelex) en digestión con la enzima HinfI produjo tres fragmentos de tamaño aproximado de 202pb, 67pb y 32pb; con la enzima Rsal obtuvimos un fragmento de 239pb y otro de 67pb (Figura 32B). Determinando con ello el genotipo gB1 para el control positivo de HCMV.

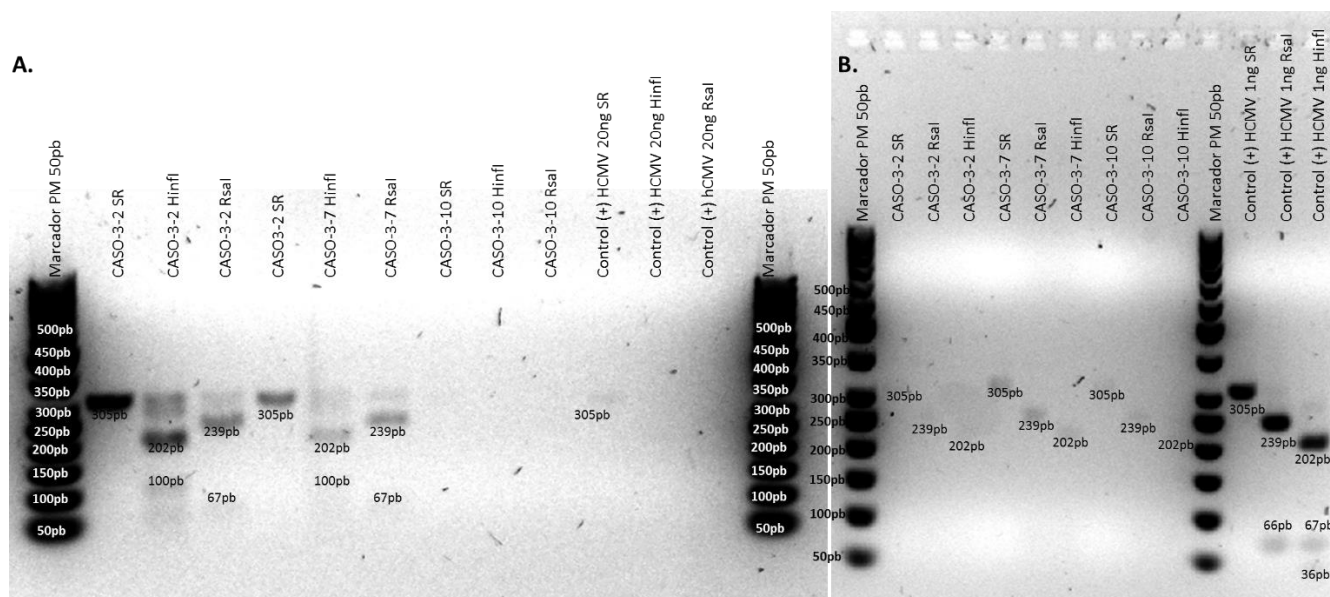


Figura 32. Ensayo de restricción con las enzimas RsaI y HinfI para el CASO-3. A. Primer ensayo con el CASO-3. **B.** Segundo ensayo con el CASO-3. Imagen representativa del genotipo gB2 obtenido con las muestras. SR=sin restringir, pb = pares de bases. El control positivo fue DNA de HCMV obtenido por el método de Chelex, con el genotipo gB1. Los productos de restricción se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.0% y teñido con GelRed.

El ensayo de restricción con las enzimas RsaI y HinfI del CASO-2 se observa en la Figura 33. El CASO-2-3 al digerirse con la enzima RsaI produjo dos fragmentos de tamaño aproximado de 239pb y 66pb, con la enzima HinfI se observan igualmente dos fragmentos de baja intensidad de tamaño aproximado de 202pb y 67pb. El CASO-2-10 con la endonucleasa RsaI se observa un fragmento de 239pb de baja intensidad y con la enzima HinfI se observa una banda de baja intensidad de 202pb. Para el CASO-2-11 la digestión con RsaI produjo dos fragmentos, uno de 239pb y otro de 66pb; en la digestión con HinfI se observan 3 fragmentos de tamaños 202pb, 67pb y 36pb. Determinando así el genotipo gB1 para este estudio. En el control positivo se observan, varias bandas con la digestión enzimática de HinfI: 4 fragmentos de tamaño aproximado de 202pb, 100pb, 67pb y 36pb. Con la enzima RsaI se observan las bandas de tamaños 239pb y 66pb. Determinando así una mezcla de genotipos gB1/gB2.

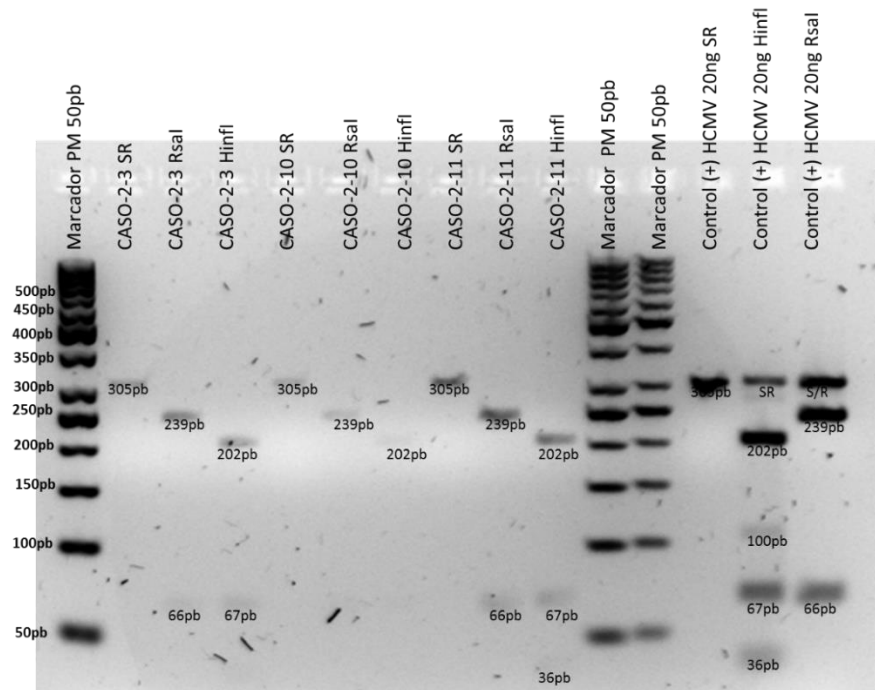


Figura 33. Ensayo de restricción con enzimas RsaI y HinfI para el CASO-2. SR = sin restringir, pb=pares de bases. Imagen representativa del genotipo gB1 obtenido de las muestras. El DNA del ensayo se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.0% y teñido con GelRed.

6.5.1 Genotipos de gB

En la Tabla 13 se indica el genotipo encontrado en cada órgano de los casos positivos. El genotipo. El genotipo gB2 se encontró en 3/5 (60%), gB1 en 1/5 (20%) y una mezcla de genotipos gB1/gB2 en 1/5 (20%). No se encontraron genotipos gB3 ni gB4.

Tabla 13. Genotipos encontrados en los órganos de los casos positivos para HCMV.

Estudio	Órgano	Genotipo gB
CASO-5-1	Pulmón	gB2
CASO-5-9	Encéfalo	gB1/gB2
CASO-4-4	Pulmón	gB2
CASO-4-5	Hígado	gB2
CASO-4-8	Encéfalo	gB2
CASO-3-2	Bazo	gB2
CASO-3-7	Pulmón	gB2
CASO-3-10	Hígado	gB2
CASO-2-1	Encéfalo	gB1
CASO-2-3	Hígado	gB1
CASO-2-10	Pulmón	gB1
CASO-2-11	Bazo, intestino	gB1
CASO-1-2	Bazo	gB2
CASO-1-3	Pulmón	gB2
CASO-1-7	Hígado	gB2
CASO-1-10	Encéfalo	gB2

En la Tabla 14, se observan los hallazgos clínico-patológicos y citopatológicos reportados en los 5 casos positivos en los expedientes clínicos del departamento de Anatomía Patológica de INPer.

Tabla 14. Hallazgos clínico-patológicos y citopatológicos encontrados en los casos positivos para HCMV.

Estudio	Órgano	Signos clínico patológicos
CASO-5	Pulmón	Pulmones atelectasia de reabsorción 40% Enfisema 10%
	Encéfalo	Hemorragia focal de matriz germinativa
CASO-4	Pulmón	Hipoplasia pulmonar bilateral
	Hígado	Hidronefrosis riñón derecho
	Encéfalo	
CASO-3	Bazo	Tejido pulmonar c/ material amorfo intraalveolar
	Pulmón	Tejido pulmonar c/ material necrótico
	Hígado	Tejido pulmonar c/ material hemorrágico Cambios sugestivos de infección por HCMV
CASO-2	Encéfalo	Hipoxia aguda grave
	Hígado	Cerebelo c/hematoma extenso
	Pulmón	Hígado congestión y hemorragia
	Bazo, intestino	
CASO-1	Bazo	Coartación aortica
	Pulmón	Atresia de vías biliares
	Hígado	Hipoxia
	Encéfalo	Microcefalia

6.6 Caso especial: Óbito femenino de 32 semanas

Para el óbito de 32 semanas, se realizó el procedimiento ya mencionado en la metodología. La amplificación del fragmento de 220pb del gen viral UL123 (MIE) del CASO-E se observa en la Figura 34, donde podemos observar el amplificado de todas las muestras (1, 3, 6 y 146) y a las diferentes condiciones de dilución. En los controles positivos de PCR (1ng y 20ng) sí amplificó el producto esperado. El control negativo de PCR no obtuvo ningún amplificado.

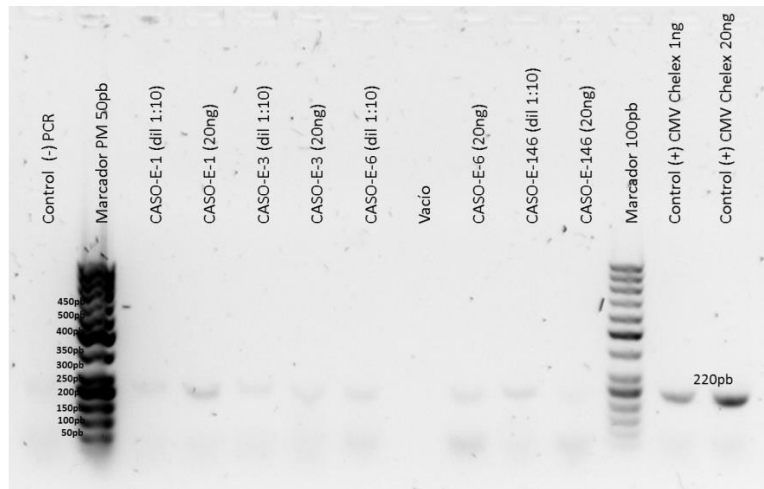


Figura 34. Amplificación de un fragmento de 220pb del gen viral UL123 (MIE) de HCMV para el CASO-E. El control positivo fue DNA de HCMV extraído por el método de Chelex (1ng y 20ng). Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y teñido con GelRed.

Los productos de la amplificación del gen UL55 (gB), se observan en la Figura 35. Se obtuvo el fragmento esperado en todas las muestras del óbito (1, 3, 6, y 146) y en los dos controles positivos de PCR. No se obtuvo amplificado en el control negativo de PCR.

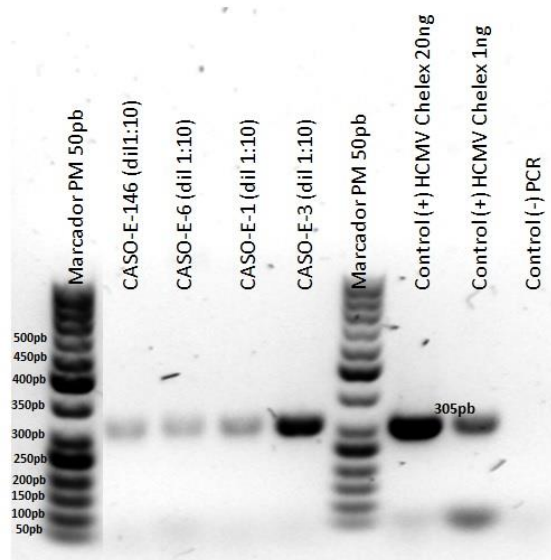


Figura 35. Amplificación de un fragmento de 305pb del gen viral UL55 (gB) para el CASO-E. El DNA se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y teñido con GelRed.

Los resultados del ensayo de restricción con las enzimas RsaI y HinfI para el óbito (CASO-E) se observan en la Figura 36. Para la muestra CASO-E-146 (Placenta), al someterla a digestión con la enzima RsaI se tuvieron fragmentos de 239pb y 66pb, con la enzima HinfI se obtuvieron fragmentos de 202pb, 67pb, y 36pb. La digestión con la RsaI de la muestra CASO-E-6 (Bazo) dio como resultado los fragmentos de tamaño aproximado de 239pb y 66pb (banda tenue), la digestión con HinfI obtuvo los productos de 202pb y 67pb (banda tenue). Para muestra CASO-E-3 (encéfalo) la digestión con RsaI mostró fragmentos de alta intensidad de 239pb y 66pb, la restricción con HinfI mostró fragmentos de alta intensidad de tamaños aproximados de 202pb, 67pb y 36pb. La última muestra CASO-E-1 (encéfalo) muestra las mismas bandas que la muestra CASO-E-3. El genotipo determinado para este óbito femenino de 32 semanas es gB1.

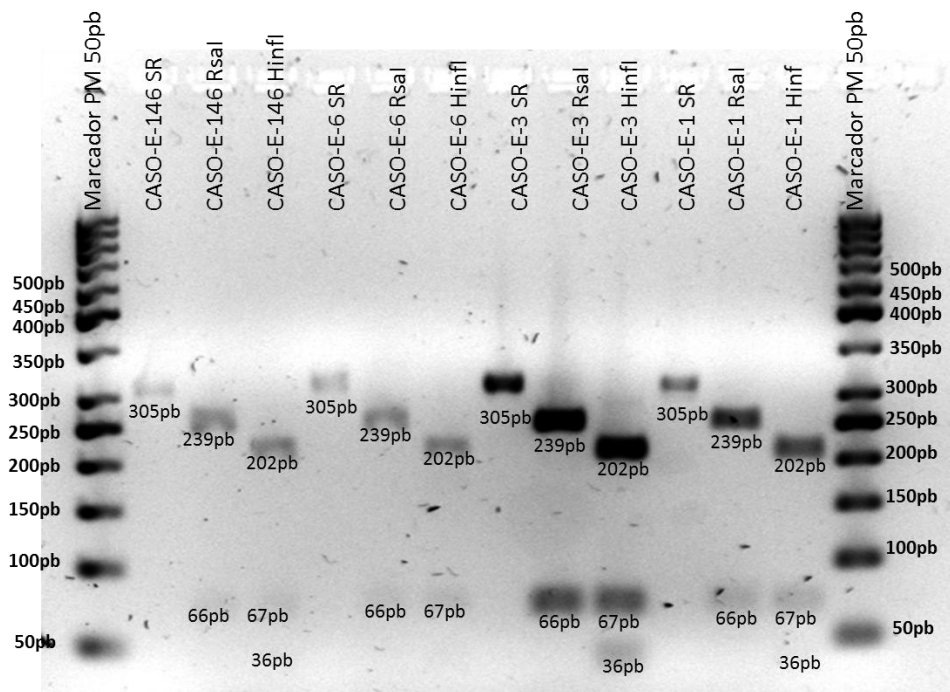


Figura 36. Ensayo de restricción con las enzimas RsaI y HinfI para el CASO-E. SR=sin restringir, pb=pares de bases. Los productos del ensayo se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.0% y teñido con GelRed.

7. **Discusión.**

La fijación de tejidos en formalina y su inclusión en bloques de parafina (FFPE) es un método estándar para la preservación a largo plazo de especímenes de distintas patologías realizado en la mayoría de los centros de salud de segundo y tercer nivel de atención. El tejido FFPE presenta una excelente preservación en la estructura de los tejidos y permite un estudio morfológico tridimensional del mismo, además se pueden tomar varias muestras al tiempo. El fácil procesamiento, la preservación a largo tiempo, el bajo costo de almacenamiento y el transporte son algunas de las ventajas más notorias de los tejidos FFPE. La obtención de DNA a partir de tejidos humanos preservados representa una herramienta para realizar estudios epidemiológicos, diagnóstico molecular, estudios relacionados con el cáncer y terapia farmacológica, mediante pruebas moleculares como PCR, análisis de restricción, polimorfismo, microarreglos y secuenciación.^{79, 80} Sin embargo, este material preservado presenta ciertos retos experimentales, por ejemplo: la parafina es una barrera física y el formaldehído (componente activo de la formalina) promueve la generación de entrecruzamiento (“cross-linking” en inglés) entre ácidos nucleicos y proteínas, lo que ocasiona inconvenientes durante la extracción de DNA e inhibe la PCR.⁸¹ Las condiciones en el proceso de fijación, el pH bajo y la excesiva manipulación durante la extracción limitan la obtención de DNA de alto peso molecular y calidad a partir de tejidos FFPE.⁷⁹

En el presente trabajo se realizó la extracción de DNA de muestras de tejido FFPE de neonatos con sospecha de infección congénita, utilizando dos métodos de extracción que presentan las ventajas de eliminación del uso de disolventes, menor manipulación por parte del analista y menor costo por proceso. Se empleó un kit comercial (Zymo Research FFPE DNA Miniprep™) incorporando modificaciones implementadas por el grupo de investigación para optimizar la obtención de material amplificable por PCR; y se empleó Chelex-100™ una resina quelante que captura iones metálicos polivalentes en soluciones, el efecto de esta sustancia es prevenir a través de su acción quelante la ruptura del DNA a altas temperaturas catalizada por los iones involucrados en la muestra de trabajo.

El método de extracción de DNA por kit comercial, al cual llamamos kit modificado, obtuvo resultados favorables con respecto a la relación de D.O. 260/280 (una medida de pureza) ya que el 58%(25/43) resultó óptimo para su uso en ensayos moleculares, además en el 67%(29/43) de las muestras se obtuvo un rendimiento de DNA $\geq 1\mu\text{g}$, lo cual es suficiente

para su uso en PCR y ensayos moleculares posteriores. Nuestra propuesta del kit comercial (Zymo Research) modificado es una buena alternativa para llevar a cabo las extracciones de DNA de tejidos FFPE debido a que al ser eliminado el paso de desparafinado previo, disminuye la manipulación de las muestras y se reduce el riesgo en la salud del analista al no usar disolventes tóxicos como xilol, cloroformo y fenol.

Con el método de extracción de DNA por Chelex se obtuvo un rendimiento de DNA $\geq 1\mu\text{g}$ en el 100% (43/43) de las muestras analizadas, lo cual indica que es un buen método para extraer DNA en altas concentraciones. El uso de Chelex es menos costosa que otros métodos que emplean más reactivos y es un protocolo fácil de realizar.

Considerando las pruebas estadísticas realizadas el método de extracción por Chelex fue el que mayor cantidad de DNA obtuvo en la extracción de las muestras. Para la relación de D.O 260/280 como una medida de pureza no hubo diferencia significativa entre ambos métodos.

El DNA extraído con ambos métodos fue adecuado para amplificar fragmentos de aproximadamente 200pb (gen *GAPDH* y gen UL123) y hasta 300pb (gen UL55); la no amplificación del gen *GAPDH* de algunas muestras, pudo deberse a la presencia de agentes inhibidores de la DNA Polimerasa, como la parafina, en el extracto de DNA.

Para la amplificación del gen viral se utilizaron los *primers* PPF-220-HCMV y PPR-220-HCMV diseñados en el laboratorio; utilizando como referencia los *primers* MIE-4 y MIE-5 reportados por Demmler⁸² para amplificar un fragmento de 435pb. Este gen es la región principal del antígeno mayor immediate-early (MIE) de la cepa Towne de HCMV, el cual tiene un sitio de corte para la enzima de restricción BanI. El propósito de diseñar este par de *primers*, fue reducir el número de pb se deseaba amplificar y mantener el sitio de corte de la enzima BanI (homólogo a BshNI) para realizar la confirmación de la infección por HCMV.

Con respecto a la identificación de HCMV en los casos, se encontró DNA de HCMV en 5 de los 12 casos incluidos en este estudio. El pulmón fue el órgano más frecuentemente afectado (5/5) en el cual se reportaron hallazgos clínico-patológicos sugestivos de infección por HCMV en el reporte de necropsia, ya que los neonatos positivos presentaron hipoxia e hipoplasia pulmonar. Además, el CASO-3 presento hallazgos citopatológicos de infección por HCMV, de acuerdo con los expedientes de Anatomía Patológica del INPer, tejido pulmonar con material amorfo intraalveolar, necrótico y hemorrágico. De acuerdo con lo reportado por Martínez-

Contreras *et al*, HCMV es el agente viral más frecuentemente asociado a neumonías, síndrome de dificultad respiratoria (SDR) y complicaciones pulmonares en recién nacidos.⁸³

El segundo órgano más afectado fue el encéfalo (4/5), seguido del hígado (4/5). HCMV tiene una etiología importante en la discapacidad neurológica en neonatos. Los signos y síntomas neurológicos más comúnmente observados en neonatos con IC por HCMV incluyen: microcefalia, calcificaciones intracraneales, letargia, convulsiones, hipotonía, pérdida auditiva neural y coriorreinitis.²⁸ Esto concuerda con algunos antecedentes reportados en los expedientes de Anatomía Patológica, por ejemplo el CASO-2, que tuvo un hematoma en el cerebelo y fue positivo a HCMV en el tejido analizado.

HCMV en hígado de pacientes no inmunocomprometidos o recién nacidos causa una hepatitis aguda, en la que se reconocen como hallazgos clínico-patológicos la necrosis leve de los hepatocitos, la predominancia de células mononucleares (mezcla de linfocitos pequeños y grandes, incluidas formas atípicas).^{84, 85} Si bien estos cambios son característicos, no propios de la enfermedad, se encontraron cambios clínico-patológicos en tejido de recién nacidos con muerte neonatal temprana, de acuerdo con los expedientes de las necropsias. Tal es el CASO-2 con hígado congestionado y con hemorragia.

Una manera de confirmar que el fragmento de DNA amplificado corresponde a HCMV, fue realizar un ensayo de restricción con la enzima BshNI (un homólogo de la enzima BanI). Comprobamos que sí corresponde a un fragmento de DNA viral de HCMV debido a que obtuvimos los fragmentos esperados. En algunos extractos se requiere de mayor cantidad de enzima para no encontrar fragmentos sin restringir. Diversos grupos a nivel internacional trabajan en la epidemiología molecular de este virus en infección congénita, así como en los marcadores de virulencia. A pesar de este hecho, no existen muchos estudios acerca de los genotipos de HCMV en infección congénita en nuestro país.¹⁶

El efecto de la variación de las cepas de HCMV sobre las propiedades biológicas del virus es un tópico de gran interés. Cada aislado clínico tiene el potencial de una identidad única, lo cual inicia la hipótesis que la variación entre estos genotipos afecta la gravedad de la infección por HCMV.⁴⁹ Nosotros encontramos el genotipo gB2 en 4 de los 5 casos positivos a HCMV y gB1 en solo 1 caso de 5, y de manera complementaria una coinfección gB1/gB2 en el tejido cerebral de un solo caso. Esto concuerda con lo reportado por Arellano-Galindo

(2014), en donde se encontró al genotipo gB2 en el 66% (13/17) de las muestras de sangre seca de recién nacidos con infección congénita, seguido del genotipo gB1 con el 17% y el otro 17% con genotipo gB3. El 47% de la infección materna se trató de una coinfección.²³

Se ha reportado que el genotipo gB1 es el más frecuente en pacientes pediátricos trasplantados de médula ósea que desarrollan infección activa por HCMV.⁸⁶ Por otro lado, se ha propuesto que los genotipos gB2 y gB3 son más neurotrópicos porque han sido más frecuentemente aislados en líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con SIDA infectados con el virus.⁸⁷ El genotipo gB2 se ha asociado también con secuelas a largo plazo, ya que es el genotipo que preferiblemente se transmite de madre a hijo en las infecciones mixtas y en otros estudios ha sido descrito como el más prevalente.²³ Sin embargo, otros investigadores no han establecido una relación directa entre la evolución de la enfermedad en fetos o recién nacidos y el genotipo de la glicoproteína B, a pesar de que hayan identificado un genotipo que prevaleciera sobre los demás.⁸⁸ Esto nos sugiere que la capacidad de una cepa del virus con un determinado genotipo de gB de producir la enfermedad, en un paciente inmunosuprimido, depende directamente de factores intrínsecos que producen tropismo viral hacia ciertos tejidos.

De manera complementaria se encontró el genotipo del control positivo de HCMV de un tejido de riñón, resultando en una mezcla de los genotipos gB1/gB2. Encontrar una mezcla de genotipos, tiene una probabilidad del 62% de acuerdo con lo reportado por Arellano-Galindo, en México.²³ También se tiene reportado una distribución del 42% con mezcla de genotipos gB1/gB2 en muestras sanguíneas de recién nacidos con infección congénita.⁸⁹

Finalmente, se realizó la identificación en un óbito de 32 semanas de gestación que tuvo hallazgos citopatológicos sugestivos de infección viral. Con el método PCR-RFLPs, se detectó al genotipo gB1. Los tejidos de este óbito fueron recientemente fijados en formalina y embebidos en parafina, por lo que los procesos de fijación y el pH bajo, al momento de hacer las extracciones no intervinieron de manera excesiva en la extracción de DNA, por los métodos estudiados. El conocimiento de si determinados genotipos guardan relación con las diferentes evoluciones de la enfermedad, permitiría disponer de una nueva herramienta diagnóstica para una mejor intervención médica.

8. Conclusiones.

- Se encontraron los genotipos gB1 y gB2 en la población estudiada, no se encontraron genotipos gB3 ni gB4.
- El genotipo gB2 fue más el frecuentemente encontrado en 4 de 5 casos positivos a HCMV.
- Los tejidos más afectados fueron pulmón, cerebro e hígado, con 5/5, 4/5 y 4/5, respectivamente.
- Se confirmó la infección congénita debido a que se identificó HCMV en recién nacidos menores a 3 semanas de vida.
- Se realizó la correlación clínico-patológica y citopatológica con la presencia de HCMV en los órganos infectados.
- Se cumplieron así los objetivos del presente trabajo, proporcionando un apoyo para la implementación de diagnóstico molecular de infecciones virales en la población que atiende el Instituto.

9. Perspectivas

A la fecha, son pocos los estudios que se han realizado para la detección de IC por HCMV en población mexicana, además de la determinación de los genotipos de gB para relacionarla con la gravedad de la infección. La mayoría se ha enfocado en determinar la seroprevalencia, que ayuda como tamizaje. La infección por HCMV tampoco se puede diagnosticar con base en un cuadro clínico debido a que comparte características comunes con otras patologías.

Se sugiere:

- Aumentar el número de casos a analizar para determinar la prevalencia de infección congénita en esta población.
- Analizar la relación entre el genotipo y el cuadro clínico en el neonato y la madre.

10. Referencias.

1. Gámez SS, Ruiz MP, Navarro Marí JM. Infección por citomegalovirus humano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2014, **32**: 15-22.
2. Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Medical microbiology and immunology* 2008, **197**(2): 65-73.
3. Weller TH. Cytomegaloviruses: a Historical Perspective. *Herpes : the journal of the IHMF* 2000, **7**(3): 66-69.
4. Chakravarti A, Kashyap B, Matlani M. Cytomegalovirus infection: an Indian perspective. *Indian journal of medical microbiology* 2009, **27**(1): 3-11.
5. Brennan DC. Cytomegalovirus in renal transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2001, **12**(4): 848-855.
6. Vornhagen R, Hinderer W, Sonneborn HH, Bein G, Matter L, The TH, *et al.* IgM-specific serodiagnosis of acute human cytomegalovirus infection using recombinant autologous fusion proteins. *Journal of virological methods* 1996, **60**(1): 73-80.
7. Kalejta RF. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 2008, **72**(2): 249-265, table of contents.
8. Griffiths PD. The 2001 Garrod lecture. The treatment of cytomegalovirus infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2002, **49**(2): 243-253.
9. Tomtishen JP, 3rd. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology journal* 2012, **9**: 22.
10. Dai X, Yu X, Gong H, Jiang X, Abenes G, Liu H, *et al.* The smallest capsid protein mediates binding of the essential tegument protein pp150 to stabilize DNA-containing capsids in human cytomegalovirus. *PLoS pathogens* 2013, **9**(8): e1003525.
11. Davison AJ, Dolan A, Akter P, Addison C, Dargan DJ, Alcendor DJ, *et al.* The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *The Journal of general virology* 2003, **84**(Pt 1): 17-28.
12. Yu D, Silva MC, Shenk T. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(21): 12396-12401.
13. Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M, *et al.* Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 1986, **234**(4776): 596-601.
14. Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *The Journal of clinical investigation* 2011, **121**(5): 1673-1680.
15. Griffiths PD. Cytomegalovirus. *Principles and Practice of Clinical Virology*. John Wiley & Sons, Ltd, 2009, pp 161-197.
16. Chou SW, Dennison KM. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *The Journal of infectious diseases* 1991, **163**(6): 1229-1234.

17. Frascaroli G, Sinzger C. Distinct properties of human cytomegalovirus strains and the appropriate choice of strains for particular studies. *Methods in molecular biology* 2014, **1119**: 29-46.
18. Torrús Tendero D. Utilidad de la antigenemia pp65 en el diagnóstico precoz de la enfermedad por citomegalovirus en los pacientes con infección VIH avanzada. 1997.
19. Baquero-Artigao F, Grupo de estudio de la infección congénita por citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología P. [Consensus document from the Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases (SEIP) on the diagnosis and treatment of congenital cytomegalovirus infection]. *Anales de pediatría* 2009, **71**(6): 535-547.
20. Adland E, Klenerman P, Goulder P, Matthews PC. Ongoing burden of disease and mortality from HIV/CMV coinfection in Africa in the antiretroviral therapy era. *Frontiers in microbiology* 2015, **6**: 1016.
21. Echaniz-Aviles G, Tamayo-Legorreta E, Cruz-Valdez A, Rangel-Flores H, Hernandez-Nevarez P, Gatica-Marquina R, *et al.* [Prevalence of antibodies against cytomegalovirus in women of reproductive age]. Prevalencia de anticuerpos contra citomegalovirus en mujeres en edad reproductiva. *Salud Publica Mex* 1993, **35**(1): 20-26.
22. Narvaez-Arzate RV, Olguin-Mexquitic L, Lima-Rogel V, Noyola DE, Barrios-Compean LM, Villegas-Alvarez C. Cytomegalovirus infection in infants admitted to a neonatal intensive care unit. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 2013, **26**(11): 1103-1106.
23. Arellano-Galindo J, Villanueva-Garcia D, Cruz-Ramirez JL, Yalaupari-Mejia JP, Uribe-Gutierrez G, Velazquez-Guadarrama N, *et al.* Detection and gB genotyping of CMV in Mexican preterm infants in the context of maternal seropositivity. *Journal of infection in developing countries* 2014, **8**(6): 758-767.
24. Baquero-Artigao F. [Congenital cytomegalovirus infection: is serological screening during pregnancy necessary?]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010, **28**(6): 363-369.
25. Nassetta L, Kimberlin D, Whitley R. Treatment of congenital cytomegalovirus infection: implications for future therapeutic strategies. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2009, **63**(5): 862-867.
26. Nogalski MT, Collins-McMillen D, Yurochko AD. Overview of human cytomegalovirus pathogenesis. *Methods In Molecular Biology (Clifton, NJ)* 2014, **1119**: 15-28.
27. Goodrum F. Human Cytomegalovirus Latency: Approaching the Gordian Knot. *Annual review of virology* 2016, **3**(1): 333-357.
28. Noyola DE, Jimenez-Capdeville ME, Demmler-Harrison GJ. Central nervous system disorders in infants with congenital cytomegalovirus infection. *Neurological research* 2010, **32**(3): 278-284.
29. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacology & therapeutics* 2003, **98**(3): 269-297.
30. Penfold ME, Dairaghi DJ, Duke GM, Saederup N, Mocarski ES, Kemble GW, *et al.* Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(17): 9839-9844.
31. Beltran PMJ, Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert review of proteomics* 2014, **11**(6): 697-711.
32. Mocarski ES, Shenk T, Griffiths PD, Pass RF. *Cytomegaloviruses*, 2013.

33. Isaacson MK, Juckem LK, Compton T. Virus entry and innate immune activation. *Current topics in microbiology and immunology* 2008, **325**: 85-100.
34. Compton T, Nowlin DM, Cooper NR. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 1993, **193**(2): 834-841.
35. Feire AL, Koss H, Compton T. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(43): 15470-15475.
36. Zarama Ortiz AM. Efecto de la infección del citomegalovirus sobre receptores SLAM en macrófagos murinos. 2014.
37. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Current opinion in microbiology* 2006, **9**(4): 423-429.
38. Cepeda V, Esteban M, Fraile-Ramos A. Human cytomegalovirus final envelopment on membranes containing both trans-Golgi network and endosomal markers. *Cellular microbiology* 2010, **12**(3): 386-404.
39. Poole E, Sinclair J. Sleepless latency of human cytomegalovirus. *Medical microbiology and immunology* 2015, **204**(3): 421-429.
40. Fish KN, Soderberg-Naucler C, Mills LK, Stenglein S, Nelson JA. Human cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cells. *Journal of virology* 1998, **72**(7): 5661-5668.
41. Mettenleiter TC. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus research* 2004, **106**(2): 167-180.
42. Dupont L, Reeves MB. Cytomegalovirus latency and reactivation: recent insights into an age old problem. *Reviews in medical virology* 2016, **26**(2): 75-89.
43. Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Reviews in medical virology* 2007, **17**(5): 355-363.
44. Arav-Boger R, Battaglia CA, Lazzarotto T, Gabrielli L, Zong JC, Hayward GS, *et al.* Cytomegalovirus (CMV)-encoded UL144 (truncated tumor necrosis factor receptor) and outcome of congenital CMV infection. *The Journal of infectious diseases* 2006, **194**(4): 464-473.
45. Blanco LJB, López MDF. TESIS DOCTORAL Citomegalovirus congénito: análisis de los genotipos virales. 2016.
46. Meyer-Konig U, Haberland M, von Laer D, Haller O, Hufert FT. Intragenic variability of human cytomegalovirus glycoprotein B in clinical strains. *The Journal of infectious diseases* 1998, **177**(5): 1162-1169.
47. Coaquette A, Bourgeois A, Dirand C, Varin A, Chen W, Herbein G. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2004, **39**(2): 155-161.
48. Tugizov S, Navarro D, Paz P, Wang Y, Qadri I, Pereira L. Function of human cytomegalovirus glycoprotein B: syncytium formation in cells constitutively expressing gB is blocked by virus-neutralizing antibodies. *Virology* 1994, **201**(2): 263-276.
49. Aragón-Franco R, Valdés-Espinosa RA, Villalba-Magdaleno JDA, Jiménez-Hernández E. Genotipo viral de la glucoproteína B en la infección por citomegalovirus humano en pacientes pediátricos con trasplante

de médula ósea. (Spanish). *Viral genotype of glicoprotein due to human B cytomegalovirus in pediatric patients post bo (English)* 2006, **60**(3): 164-175.

50. Torok-Storb B, Boeckh M, Hoy C, Leisenring W, Myerson D, Gooley T. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation. *Blood* 1997, **90**(5): 2097-2102.
51. Rasmussen L, Geissler A, Winters M. Inter- and intragenic variations complicate the molecular epidemiology of human cytomegalovirus. *The Journal of infectious diseases* 2003, **187**(5): 809-819.
52. Ross SA, Novak Z, Pati S, Patro RK, Blumenthal J, Danthuluri VR, et al. Mixed infection and strain diversity in congenital cytomegalovirus infection. *The Journal of infectious diseases* 2011, **204**(7): 1003-1007.
53. Zheng S, Shi Qiang S, Chao Chun Z, Ji Yan Z, Zhong Sheng Y. THE DETECTION AND CLINICAL FEATURES OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN INFANTS. *Fetal & Pediatric Pathology* 2010, **29**(6): 393-400.
54. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, de Deus Wagatsuma VM, Marin LJ, Duarte G, Figueiredo LTM. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Brazilian mothers and their congenitally infected infants. *Journal Of Medical Virology* 2007, **79**(8): 1164-1168.
55. Mewara A, Mishra B, Ratho RK, Kumar P. CYTOMEGALOVIRUS GLYCOPROTEIN B GENE POLYMORPHISM AND ITS ASSOCIATION WITH CLINICAL PRESENTATIONS IN INFANTS.
56. Trincado DE, Scott GM, White PA, Hunt C, Rasmussen L, Rawlinson WD. Human cytomegalovirus strains associated with congenital and perinatal infections. *J Med Virol* 2000, **61**(4): 481-487.
57. Boza Cordero R. CITOMEGALOVIRUS: DE LA INFECCIÓN NEONATAL A LAS INFECCIONES EN PACIENTES TRASPLANTADOS Y DE LA CITOMEGALIA A LA BIOLOGÍA MOLECULAR. *Revista Clínica Escuela de Medicina UCR-HSJD Vol 2 Núm 7 2011* 2011.
58. Gonzalez-Ramirez J, Uribe-Gutierrez G, Jimenez-Hernandez E, Velazquez-Guadarrama N, Bello-Gonzalez A, Vazquez-Meraz E, et al. Cytomegalovirus gB genotype distribution in Mexican children undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Intervirology* 2012, **55**(4): 318-320.
59. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad* 2013, **2**(2): 70-78.
60. Joshi M, Deshpande J. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research* 2010, **2**(1): 81-97.
61. Berg Rasmussen H. *Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting*, 2012.
62. Dai S, Long Y. Genotyping Analysis Using an RFLP Assay. In: Batley J (ed). *Plant Genotyping: Methods and Protocols*. Springer New York: New York, NY, 2015, pp 91-99.
63. Luque Cabrera J, Herráez Sánchez MA. *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética : conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Barcelona: Elsevier, 2001, 2001.
64. Valencia Pesqueira LM, Domínguez Rojas M. *Revisión actualizada de la reacción en cadena de la polimerasa (pcr)*, 2014.
65. Lo YMD, Chan KCA. Introduction to the Polymerase Chain Reaction. In: Lo YMD, Chiu RWK, Chan KCA (eds). *Clinical Applications of PCR*. Humana Press: Totowa, NJ, 2006, pp 1-10.

66. Chuang LY, Cheng YH, Yang CH. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology letters* 2013, **35**(10): 1541-1549.
67. Watson JD, Baker TA, Gann A, Levine M, Losik R. *Molecular biology of the gene*. San Francisco, California : Pearson/Benjamin, c2013, Seventh edition, 2013.
68. Razin S, Tully JG. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmatology : Diagnostic Procedures*. Academic Press: San Diego, 1996.
69. Bermingham N, Luettich K. Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology* 2003, **9**(3): 159-164.
70. McPherson MJ, Taylor GR, Quirke P. *PCR: A Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press, 1991.
71. Karp G. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos (6a. ed.)*. McGraw-Hill Interamericana: México, D.F., MX, 2011.
72. Brettschneider R. RFLP Analysis. In: Karp A, Isaac PG, Ingram DS (eds). *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*. Springer Netherlands: Dordrecht, 1998, pp 85-95.
73. Restriction Fragment Length Polymorphism. Springer Science & Business Media B.V. / Books; 2001. pp. 774-774.
74. Ramírez-Pacheco A, Moreno-Guerrero SS, Medina-Sanson A. Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico. *Gaceta Mexicana de Oncología* 2013, **12**(3): 162-173.
75. Rasmussen HB. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis-valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. *Gel Electrophoresis-Principles and Basics*. InTech, 2012.
76. Westermeier R. *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations*. John Wiley & Sons, 2016.
77. Yilmaz M, Ozic C, Gok İ. Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis. *Gel Electrophoresis-Principles and Basics*. InTech, 2012.
78. Heydt C, Fassunke J, Künstlinger H, Ihle MA, König K, Heukamp LC, *et al*. Comparison of Pre-Analytical FFPE Sample Preparation Methods and Their Impact on Massively Parallel Sequencing in Routine Diagnostics. *PLoS ONE* 2014, **9**(8): 1-11.
79. Zoraya DG, Maira Á, Andreína F, Dayahíndara V, María C. Extracción de ADN de muestras incluidas en parafina sin el uso de xilol para la detección y tipificación de VPH / DNA extraction from paraffin embedded samples without using xylene for HPV detection and typing. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2013(1): 83.
80. Bustamante JA, Astudillo M, Pazos Moncayo AJ, Bravo LE. Evaluación de dos métodos de extracción de ADN a partir de biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina en condiciones no optimas. *2011* 2011, **16**(2): 16.
81. Lin J, Kennedy SH, Svarovsky T, Rogers J, Kemnitz JW, Xu A, *et al*. High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using mineral oil. *Analytical biochemistry* 2009, **395**(2): 265-267.

82. Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *The Journal of infectious diseases* 1988, **158**(6): 1177-1184.
83. Martínez-Contreras A, Lira R, Maldonado-Rodríguez A, Rojas-Montes O, Álvarez-Muñoz MT, Soria-Rodríguez C, *et al.* Citomegalovirus: infección congénita y presentación clínica en recién nacidos con síndrome de dificultad respiratoria. (Spanish). *Cytomegalovirus: congenital infection and clinical presentation in infants with respiratory distress syndrome (English)* 2015, **53**(3): 286-293.
84. Ten Napel CH, Houthoff HJ, The TH. Cytomegalovirus hepatitis in normal and immune compromised hosts. *Liver* 1984, **4**(3): 184-194.
85. Claudia V, Gabriela V, Laura B, Edgardo S, Daniel S. Infección por Citomegalovirus con compromiso hepático en adultos inmunocompetentes / Cytomegalovirus infection with hepatic involvement in immunocompetent adults. *Medicina (Buenos Aires)* 2006(3): 206.
86. González-Ramírez J, Uribe-Gutiérrez G, Jiménez-Hernández E, Velázquez-Guadarrama N, Bello-González A, Vazquez-Meraz E, *et al.* Cytomegalovirus gB Genotype Distribution in Mexican Children Undergoing Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Intervirology* 2012, **55**(4): 318-320.
87. Fries BC, Chou S, Boeckh M, Torok-Storb B. Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients. *The Journal of infectious diseases* 1994, **169**(4): 769-774.
88. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Primache V, Dido P, Guidotti P, *et al.* CMV gB genotypes and outcome of vertical transmission: study on dried blood spots of congenitally infected babies. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2001, **21**(1): 75-79.
89. Rycel M, Wujcicka W, Zawilinska B, Paradowska E, Suski P, Gaj Z, *et al.* Mixed infections with distinct cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Polish pregnant women, fetuses, and newborns. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2015, **34**(3): 585-591.

11. Anexo I

Cuantificación de la relación de D.O 260/280 y el rendimiento de DNA en todas las muestras evaluadas.

MUESTRA	Kit modificado		Chelex-100	
	Relación de D.O 260/280	Rendimiento µg DNA	Relación de D.O 260/280	Rendimiento µg DNA
CASO-1-2	4.9	0.3	1.9	17.3
CASO-1-3	1.7	1.2	2.2	9.4
CASO-1-7	1.3	0.4	1.7	3.2
CASO-1-10	1.7	0.6	3	2.4
CASO-2-1	1.8	1	1.8	5.7
CASO-2-3	1.9	0.4	1.6	1.7
CASO-2-10	1.7	1.6	1.4	10.3
CASO-2-11	1.7	1.3	1.8	36.4
CASO-3-2	1.1	0	1.6	12.2
CASO-3-3	0	0	1.9	4.2
CASO-3-7	6	0.3	1.6	11.9
CASO-3-10	1.7	0.4	2	7.8
CASO-4-4	1.9	2.5	1.9	4.8
CASO-4-5	2.3	2.5	1.9	9.7
CASO-4-8	2.6	1.1	2	2
CASO-5-1	1.7	4	2.3	7.5
CASO-5-3	1.7	3	2.3	6.1
CASO-5-9	1.4	0.9	2.8	2.7
CASO-5-14	1.7	2.4	1.9	8.1
CASO-6-1	1.9	1.8	1.7	9.2
CASO-6-2	2	1.8	1.7	5.3
CASO-6-5	1.5	0.7	1.6	6.4
CASO-7-3	1.7	5.5	1.4	3.8
CASO-7-4	1.8	5.9	2	10.1
CASO-7-6	1.8	8.3	1.9	14.8
CASO-8-1	1.7	10.1	1.9	19.5
CASO-8-2	1.6	1.4	2	1.1
CASO-8-12	1.5	1.2	2	5.9
CASO-9-5	1.9	2.4	2.1	3.2
CASO-9-7	2.1	2.5	1.5	10.9
CASO-9-8	2.3	1.6	2	5.4
CASO-10-2	1.3	1.1	1.9	6
CASO-10-4	1.8	3.3	1.8	3.5
CASO-10-7	1.9	1.5	1.9	2.4
CASO-10-9	1.6	1	1.7	1.7
CASO-11-3	1.7	1.9	1.8	9.2
CASO-11-7	1.7	1.8	1.8	13.6
CASO-11-8	1.6	1.1	1.6	4.2
CASO-11-11	1.8	2.8	1.8	8
CASO-12-1	1.7	0.1	2.2	6
CASO-12-4	2.2	1.2	2.1	8.4
CASO-12-6	2.2	0.9	1.8	4.5
CASO-12-7	2.4	1.2	2	12.9



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

La Sociedad Mexicana de Bioquímica, AC

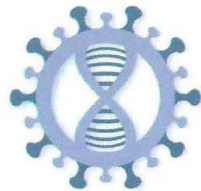
otorga la presente

Constancia

a

Areli Regina de la Cruz de la Cruz

por su participación como **PONENTE**, modalidad **CARTEL**, en el



X Congreso Nacional de Virología

Chautla, Puebla, México
24-27 de octubre de 2017


Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva
FMVZ-UNAM


Dra. Sofia L. Alcaraz Estrada
Centro Médico Nacional "20 de Noviembre"
ISSSTE


Dr. Carlos Sandoval Jaime
Instituto de Biotecnología
UNAM


MC. Monserrat E. García Hernández
FMVZ-UNAM