

29
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

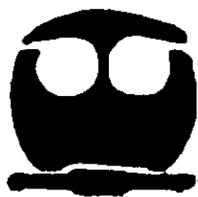
FACULTAD DE QUIMICA

ESTADO DE QUERETARO
MEXICO

ANALISIS MOLECULAR DE LA INFECCION
IN VITRO DE LA LINEA CELULAR U-937 POR
CITOMEGALOVIRUS HUMANO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARICRUZ CHAVARRIA BERNAL



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.



34115

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

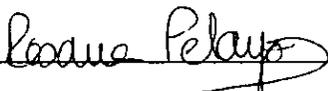
JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Prof. VELEZ PRATT GUADALUPE
VOCAL: Prof. LEON CHAPA SATURNINO DE
SECRETARIO: Prof. PELAYO CAMACHO ROSANA
1er SUPLENTE: Prof. BERRON ORTEGA PATRICIA ELVIRA
2do SUPLENTE: Prof. ORTEGA SOTO ENRIQUE

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**AREA DE INMUNOLOGIA DEL LABORATORIO
MULTIDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN,
PERTENECIENTE A LA ESCUELA MILITAR DE GRADUADOS
DE SANIDAD, S.D.N.**

ASESOR DEL TEMA:


M. en C. ROSANA PELAYO CAMACHO

SUPERVISOR TECNICO:


Tte.Cor.M.C. RAMON A. VALDES ESPINOSA

SUSTENTANTE :


MARICRUZ CHAVARRIA BERNAL

DEDICATORIAS:

A **Dios** por fortalecer mi espíritu cuando mas lo necesitaba, gracias por cuidarme siempre.

A mi **Padre** por ser el mejor amigo que he tenido, gracias por tu apoyo y comprensión en todo momento y en cualquier lugar; aunque a veces no estés de acuerdo con mis ideas.

A mi **Madre** por darme la vida, se que a tu forma me deseas lo mejor en la vida; te amo.

A **Martha** que me has soportado en todos los duros momentos de crisis, recordándome que “después de la tempestad viene la calma”, gracias por todos los buenos tiempos que me has dado y tus consejos que siempre llevo en mi mente.

A “**los Sánchez**” por esa forma de ver la vida, enseñándome nuevos horizontes, teniendo siempre los brazos abiertos para mi, brindándome su cariño sincero: “I left my heart in S.F”.

A **Dolores, Pedro y Lourdes**, a veces la vida no es como la deseamos y nos tropezamos muchas veces, pero hay que resistir y volverlo a intentar hasta alcanzar nuestros ideales sin claudicar en el camino; gracias por ser mis hermanos.

A la **U.N.A.M** por ser como mi segunda casa, que me permitió ser lo que soy; en especial a la Facultad de Química, de la cual me siento muy orgullosa de ser su alumna.



AGRADECIMIENTOS:

A la Escuela Militar de Graduados de Sanidad especialmente al Subdirector de Investigación **Gral. de Brigada Dr. Jorge Islas Marroquín** por el invaluable apoyo que me otorgó al permitirme realizar mi Trabajo Experimental en esta Institución.

A la **M. en C. Rosana Pelayo Camacho**, porque gracias a ella conoci el camino de la investigación, así como por el tiempo y consejos invertidos durante la realización de mi Tesis; gracias por la amistad.

Al **Tte. Cor. M.C. Ramón Valdés Espinosa**, por su valiosa y desinteresada dedicación en la realización de mi Tesis, así como sus consejos y por tener confianza en mí; gracias por su gran calidad humana y su amistad.

Al **M. en C. Pedro Sánchez Cruz** por su apoyo y consejos, así como el darme ese “jalón de oreja” cuando perdía mi horizonte, gracias por tu tiempo y tu amistad.

Al **Tte. Cor. M.C Jaime Berumen Campos**, por apoyarme otorgándome todas las facilidades para la realización de una parte importante del trabajo experimental de mi Tesis.

A la **Profesora Guillermina Sánchez S.** por todo lo que ha hecho por mí, por su invaluable y sincera amistad, así como sus oportunos consejos que han guiado gran parte de mi formación profesional, gracias por estos seis años de compartir buenos y malos momentos, espero seguir contando con su amistad.

A los profesores **Guadalupe Velez Pratt** y **Saturnino de León Chapa**, gracias a ellos por brindarme su tiempo y conocimientos en la revisión de mi Tesis.

A todos y cada uno de los Profesores que formaron parte importante en mi Desarrollo profesional; en especial a la **Profesora Socorro Alpizar**, por esa sonrisa siempre, sacándonos de apuros y brindándonos su amistad a todos los Q.F.B's.

Al laboratorio de Inmunoquímica de C.M.N. S.XXI, en especial al **Dr. Armando Isibasi A**, así como a los **Drs. Vianney Ortiz N.** y **Jorge Paniagua S.** y a la **M. en C. Natalia Martín O.** por sus consejos durante mi estancia en su laboratorio, así también al **Dr. José Moreno** del laboratorio de Reumatología e Inmunobiología por facilitarme el equipo de citometría de flujo durante la realización de mi Tesis.

A los compañeros de Biología Molecular, Farmacología y especialmente de Inmunología: Rommel, Toni, José D, José A, Toño, Mireya y Gabriel del Laboratorio Multidisciplinario de Investigación. de la E.M.G.S, por los buenos momentos y ese granito de arena que forma montañas.

A mis amigos Abelardo y Paty por disfrutar con ellos de agradables momentos e inolvidables recuerdos.

A Claudia Juárez por brindarme su amistad y su corazón.



“Gonna break these chains around me
Gonna learn to fly again
May be hard, may be hard
But I’ll do it
When I’m back on my feet again

Soon these tears will all be dryin’
Soon these eyes will see the sun
Might take time, might take time
But I’ll see it
When I’m back on my feet again

When I’m back on my feet again
I’ll walk proud down this street again
And they’ll all look at me again
And they’ll see that I’m strong

And I’m not gonna crawl again
I will learn to stand tall again
No I’m not gonna fall again
Cos I’ll learn to be strong ...”

Fragmento de la canción:

“When I’m back on my feet again”

Cantada por Michael Bolton.

“El secreto de la felicidad esta en mirar todas las maravillas del mundo y no olvidarse nunca de la meta que nos hemos trazado”.



INDICE

Abreviaturas	3
Indice de figuras	5
Introducción	6
1. Generalidades	
Citomegalovirus humano: Un virus emergente	7
1.1. Características biológicas del citomegalovirus humano	8
1.1.1. Estructura	8
1.1.2. Ciclo infeccioso	10
1.1.3. Patogénesis	10
1.2. La respuesta inmune hacia citomegalovirus humano	11
1.2.1. Respuesta inmune mediada por anticuerpos	11
1.2.2. Respuesta inmune mediada por células	11
1.3. Evasión de la respuesta inmune por citomegalovirus humano	12
1.3.1. Alteración de los mecanismos de presentación antigénica	12
1.3.2. Inmunosupresión	12
1.3.3. Ocultamiento viral	13
1.4. Latencia y persistencia virales	13
1.4.1. Marco conceptual	13
1.4.2. La latencia en la familia <i>Herpesviridae</i>	14
1.4.3. La latencia en la infección por citomegalovirus humano	16
2. Hipótesis	19
3. Objetivos	19
4. Estrategia experimental	20
4.1. Material	20
4.1.1. Líneas celulares	20
4.1.2. Hibridomas	20
4.1.3. Virus	21

4.1.4. Equipo	21
4.2. Metodología	23
4.2.1. Cultivo de líneas celulares	23
4.2.2. Producción y purificación de anticuerpos monoclonales	23
4.2.3. Cuantificación de proteínas	24
4.2.4. Producción del virus y determinación del título viral	24
4.2.5. Infección de células U-937 con la cepa viral AD-169	25
4.2.6. Cinéticas de infección	25
4.2.7. Detección de las proteínas virales	26
4.2.8. Extracción del DNA y amplificación por PCR	29
5. Resultados	32
5.1. Purificación de mAbs.	32
5.2. Replicación de CMVH en cultivo de fibroblastos de pulmón fetal humano	34
5.3. Obtención del DNA celular	36
5.4. Detección del gen IE-1 en DNA extraído de células infectadas por citomegalovirus humano.	37
5.5. Expresión de la proteína IE-1 en células U-937 infectadas por CMVH.	40
5.6. Análisis de la expresión de proteínas del complejo gB de CMVH durante la cinética de infección en células U-937	42
5.7. Búsqueda de secuencias virales en células cocultivadas con la línea U-937 infectada con CMVH.	47
6. Discusión	49
7. Conclusiones	53
8. Bibliografía	54

Abreviaturas

Ab:	Anticuerpo.
Ag:	Antígeno.
C-41:	Hibridoma productor de mAbs anti proteína gB de CMVH.
CMVH:	Citomegalovirus humano.
CTL	Linfocito T citotóxico
DNA:	Acido desoxirribonucleico.
D-MEM:	Medio de cultivo mínimo de Eagle modificado por Dulbecco.
E:	Proteína temprana del CMVH.
FACS:	Clasificador de células activadas por fluorescencia.
IE:	Proteína inmediata temprana del CMVH.
IE-1:	Familia principal de proteínas Inmediatas tempranas de CMVH.
kDa:	kilodalton.
L:	Proteína tardía del CMVH.
L-14:	Hibridoma productor de mAbs contra IE-1 de CMVH.
mAb:	Anticuerpo monoclonal.
MCMV:	Citomegalovirus murino.
MOI:	Multiplicidad de infección.
MRC-5:	Fibroblastos de pulmón fetal humano.
PBS:	Solución salina amortiguadora de fosfatos.
PI:	Yoduro de propidio.
SFB	Suero fetal bovino.
SIDA:	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
TBE:	Amortiguador de Tris-EDTA.

- U-373 MG: Línea celular de astrocitoma humano.
- U-937: Línea celular de linfoma histiocítico humano (premonocito).
- UFP: Unidades formadoras de placas.
- VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.
- VHS: Virus del herpes simple.

Indice de figuras

Esquema de la estructura del citomegalovirus humano	9
Purificación del mAb L-14	32
Purificación del mAb C-41	33
Infección en cultivos de fibroblastos MRC-5	34
Análisis del DNA celular	36
Detección de la expresión del gen viral IE-1 en cinéticas de cultivo mediante la técnica de PCR	38
Detección de la expresión de IE-1 en células U-937 por microscopía de fluorescencia	40
Detección de la expresión de IE-1 utilizando la técnica de FACS	41
Ensayo de “western blot” para evidenciar proteínas virales tardías	43
Detección de gB en células U-937,U-373 y MRC-5 infectadas, mediante la técnica de FACS	44
Resultados de PCR en ensayos de cocultivo	48

Introducción

El citomegalovirus humano (CMVH), miembro de la familia de los herpesvirus, es un patógeno distribuido mundialmente, capaz de originar infecciones agudas y crónicas, que representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en individuos inmunosuprimidos o inmunológicamente inmaduros. Después de la primoinfección, aún los huéspedes inmunocompetentes son incapaces de erradicar al virus, debido presumiblemente, a que el CMVH establece un estado de persistencia (infección productiva a bajos niveles) y/o latencia (infección no productiva), dichos estados forman parte de los múltiples mecanismos de evasión al sistema inmune que el virus ha desarrollado, entre los que también se cuentan: el ocultamiento viral, la inmunosupresión y la interferencia a los procesos naturales de presentación de antígeno.

Las bases celulares y moleculares que operan en el establecimiento de la persistencia y latencia de este virus aún resultan desconocidos debido en gran parte, a la carencia de un modelo *in vitro* de infección latente de células humanas. Algunas observaciones *in vivo* sugieren que los monocitos pudieran albergar al virus en un estado de latencia, a la vez que contribuyan a la diseminación viral, por lo que el presente trabajo contempla una parcial caracterización y análisis molecular de la infección por citomegalovirus humano en la línea celular U-937 (linfoma histiocítico humano), la cual es una línea premonocítica humana. Para ello, se realizaron cinéticas de infección a tiempos predeterminados con la cepa de citomegalovirus humano (AD-169) y se valoró la infección mediante la identificación de proteínas virales de expresión inmediata, de expresión tardía, y con la detección de material genético viral, así como la formación de nuevos viriones infectivos.

Los datos obtenidos de este estudio revelan la presencia del gen viral IE-1 desde el inicio y hasta el tercer día post-infección, no detectándose más durante el rastreo hasta 148 días post-infección. Por otro lado, es posible identificar el producto de este gen al interior de la célula hasta el cuarto día después del primocontacto con el virus, aunque el producto del complejo génico viral gB no fué evidenciable en ningún momento, contrastando con su franca expresión en células característicamente permisivas como fibroblastos y astrocitos. Además, el cocultivo de monocitos “infectados” con fibroblastos de pulmón fetal humano no originó la infección de estos últimos, indicando la no formación de nuevos viriones. En consideración a estos resultados, aparentemente en la línea celular U-937 son posibles los eventos de adsorción y penetración virales; así como transcripción y traducción limitada a las proteínas inmediatas tempranas, pero no el mantenimiento de una infección productiva ni la reactivación hasta los 148 días bajo las condiciones del sistema evaluadas.

1. Generalidades

CITOMEGALOVIRUS HUMANO: UN VIRUS EMERGENTE

El citomegalovirus humano (CMVH) es un miembro de la familia *Herpesviridae*, del que se conocen aproximadamente cien cepas y cuyo único huésped es el hombre, es clasificado como herpes virus humano 5⁽¹⁻³⁾. La infección exhibe características endémicas, del 60 al 80% de la población en países desarrollados y virtualmente el 100% en los países en vías de desarrollo la adquieren a lo largo de la vida⁽¹⁾. Se conoce que en México existen prevalencias superiores al 90% tanto en niños como en diversas poblaciones de adultos^(21,22). El CMVH es capaz de causar tanto infecciones agudas como crónicas y representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en individuos inmunosuprimidos y/o inmunológicamente inmaduros, siendo los principales grupos afectados, los recién nacidos, los individuos receptores de un transplante de órgano y los pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)^(4,13-17). En individuos inmunocompetentes la primoinfección cursa generalmente asintomática, sin embargo el huésped es incapaz de erradicar al virus debido al estado de persistencia (infección productiva a bajos niveles) y/o latencia (infección no productiva) que el virus desarrolla como una de las múltiples estrategias de evasión viral al sistema inmune^(5,9,25). Además, cuando el individuo se encuentra en un estado de inmunosupresión, el virus es capaz de reactivarse y causar enfermedad. Aún no se conoce con exactitud el o los mecanismos implicados en el establecimiento de latencia y/o persistencia viral, sin embargo se sabe que las principales estirpes celulares involucradas en dicho evento son las células epiteliales y los monocitos^(18,19,55).

El virus o sus productos pueden ser detectados mediante el empleo de cultivos, ensayo inmunoenzimático (ELISA), inmunofluorescencia e inmunotransferencia entre otros y la identificación del material genético con técnicas de amplificación *in vitro* del

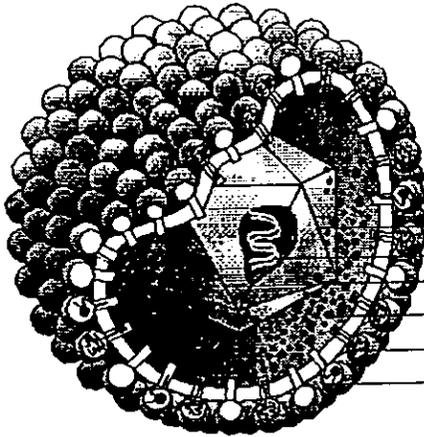
DNA utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) lográndose con ello alta sensibilidad y especificidad⁽⁶⁹⁾.

La caracterización molecular de la infección *in vitro* por CMVH de monocitos humanos, daría las bases para conseguir un modelo que permita estudiar el fenómeno de la latencia por el virus; ya que se ha reportado mediante detecciones de DNA viral por PCR en poblaciones celulares de sangre periférica tomadas al azar, que los monocitos constituyen el principal grupo celular que transporta DNA del virus en sujetos normales seropositivos⁽⁷¹⁾, no así los linfocitos T y B, en los cuales el DNA viral es poco perceptible, o en leucocitos polimorfonucleares donde no es detectable.

1.1 CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS DEL CMVH.

1.1.1 Estructura. El virión de CMVH posee todas las características morfológicas propias de los herpesvirus. Posee el DNA de mayor tamaño de todos los virus que infectan al humano (aproximadamente 230 kpb), el cual se encuentra localizado en el núcleo (*core*) de la partícula viral contenido dentro de la cápside, compuesta de 162 capsómeros y con una estructura icosaédrica. Los capsómeros miden 15 nm de diámetro y 20 de longitud, tienen un canal central de aproximadamente 3 nm de diámetro. Hay evidencias de que los capsómeros hacen proyecciones radiales de tipo rueda que corresponden a la estructura “triplex” de la cápside del virus Herpes Simplex, que se supone entrelaza a los capsómeros. La nucleocápside esta rodeada por una capa proteica denominada tegumento y finalmente por una envoltura de origen celular, proveniente de la membrana nuclear o del retículo endoplásmico. El virión desnudo mide 116 nm y la partícula viral completa aproximadamente 230 nm^(1,4,9,72).

CITOMEGALOVIRUS



NUCLEOCAPSIDE
DNA BICATENARIO
TEGUMENTO
MEMBRANA LIPIDICA
COMPLEJO GLICOPROTEINA I
COMPLEJO GLICOPROTEINA III

Figura 1: Esquema de la estructura del citomegalovirus humano.

1.1.2 Ciclo infeccioso. Se ha observado que los viriones pueden a través de sus proteínas gB, gH y gC fusionarse a la membrana celular; o bien en monocitos y macrófagos ser fagocitados solos o en grupos, en cuyo caso los fagosomas que contienen a los viriones son capaces de fusionarse con lisosomas y formar fagolisosomas, sitio en donde se digieren completamente las partículas⁽⁷³⁾. Existe la posibilidad de que dentro del fagosoma los viriones se fusionen con la membrana vacuolar y sean liberados en el citoplasma como cápsides desnudas, aunque éstas parecen estar protegidas por el tegumento viral y se hacen indistinguibles de las cápsides liberadas de la fusión en la membrana celular. Las cápsides desnudas viajan a través del citoplasma hasta el núcleo celular^(10,60,61).

La replicación del CMVH ocurre en el núcleo de las células infectadas e involucra genes inmediatos-tempranos (IE), tempranos (E) y tardíos (L); esta clasificación está basada en el tiempo de aparición del mRNA viral o proteína en la célula infectada. Los genes IE se transcriben desde las primeras 2 a las 20 horas de la infección, y los productos de su transcripción-traducción participan en la síntesis de más DNA viral, así como en la activación de los genes tempranos que tienen una duración de 24 horas o más después de la activación de los genes IE, por último las proteínas codificadas por los genes tardíos forman parte de la estructura del virión y son transcritas entre las 15 a 72 horas posteriores al ingreso del virus^(11,12).

1.1.3 Patogénesis. El CMVH provoca lesiones a través de por lo menos, dos mecanismos: la replicación viral e inmunopatología. La patogénesis de la infección en el huésped inmunosuprimido es compleja. La infección puede manifestarse como enfermedad localizada produciendo principalmente neumonitis intersticial, trastornos gastrointestinales y retinitis, o manifestarse como una enfermedad sistémica diseminada en donde prácticamente cualquier órgano puede ser afectado^(4,23). Aunque el CMVH es generalmente inocuo en personas inmunocompetentes, representa una causa importante de

morbilidad y mortalidad en individuos inmunosuprimidos; principalmente los recién nacidos con infección congénita, individuos receptores de un trasplante y pacientes con SIDA. También representan grupos de riesgo los individuos con inmunodeficiencias primarias, pacientes con neoplasias hematológicas y aquellos que reciben tratamientos inmunosupresores con radiación y/o drogas citotóxicas⁽²⁰⁾.

1.2 LA RESPUESTA INMUNE HACIA CITOMEGALOVIRUS HUMANO.

1.2.1 Respuesta inmune mediada por anticuerpos. Hay algunas evidencias de que la respuesta inmune mediada por anticuerpos no es completamente efectiva en la generación de un estado de protección hacia CMVH, debido a que son pocas las proteínas virales que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes y estos requieren de complemento, siendo la lisis efectiva en plasma pero no en otros espacios corporales. Sin embargo, aunque la presencia de anticuerpos en la madre no evita la infección intrauterina del producto, si evita daños mayores, pues en los productos de madres con primoinfección la afectación del producto es más severa que en los productos de madres con infección recurrente o reactivación viral^(24,25).

1.2.2 Respuesta inmune mediada por células. Se ha propuesto que la respuesta inmune celular es la encargada de controlar la infección. Las células T citotóxicas (CTL's) específicas contra el CMVH son capaces de provocar la lisis de células infectadas antes de la formación de una nueva progenie viral, evitando la extensión de la infección. Por otro lado se ha constatado experimentalmente un franco aumento en la actividad de células NK hacia células infectadas. Sin duda los linfocitos T cooperadores son fundamentales en el control de la infección debido a su participación en el desarrollo de CTL's y de IgG anti CMVH y en la producción de citocinas con actividad antiviral, entre ellas $IFN\gamma$ y $TNF\beta$ ⁽²⁴⁻²⁶⁾.

1.3 EVASION DE LA RESPUESTA INMUNE POR CITOMEGALOVIRUS HUMANO.

En la mayoría de los individuos infectados, la evasión de la respuesta inmune por el virus origina una infección crónica persistente o latente; ésta es seguida por recurrencias periódicas o infecciones secundarias con nuevos o mayores niveles de excreción viral. Se conocen varios mecanismos que el CMVH ha desarrollado para evadir la respuesta inmune: ocultamiento viral, inmunosupresión y alteración de los mecanismos naturales de generación y función de la respuesta inmune^(23,62).

1.3.1 Alteración de los mecanismos de presentación antigénica. Además de esconderse del sistema inmune e inducir inmunosupresión en el huésped, el CMVH ha desarrollado estrategias para impedir el establecimiento y/o la función de la respuesta inmune. Entre los mecanismos propuestos se han identificado la disminución de la expresión de moléculas de histocompatibilidad tanto de clase I como de clase II, inactivación de las células NK, y disminución de la actividad del complemento por incremento de las proteínas reguladoras^(6-8,49,50,54,59).

1.3.2 Inmunosupresión. La infección por el CMVH provoca una transitoria pero profunda inmunosupresión en individuos inmunocompetentes, mediada a través de: a) Alteración de la respuesta y producción de citocinas: Se ha observado que la infección viral causa desarreglos metabólicos en linfocitos y monocitos dañando su capacidad de producir y responder a IL-1 e IL-2^(56,63). b) supresión de la hematopoyesis: La infección por el virus suprime la hematopoyesis de células progenitoras, debido a la alteración de células mieloides CD34⁺ o células estromales y la consecuente perturbación de la producción de factores de crecimiento⁽⁴³⁾; c) Inducción de TGFβ: En estudios *in vitro* se ha observado un incremento de la producción del factor de crecimiento transformante beta

en fibroblastos, esta citocina inhibe la activación de macrófagos, células NK y CTL's y disminuye la expresión de moléculas de histocompatibilidad⁽⁶⁴⁾.

1.3.3 Ocultamiento viral. El CMVH ha desarrollado estrategias que le permiten pasar inadvertido por el sistema inmune durante un proceso infeccioso: a) variación antigénica. Se conocen más de 100 cepas del virus, que aunque presentan homologías de hasta el 80%, la respuesta inmune generada hacia una de ellas no protege contra la otra^(2,3); b) infección en continuidad. La proteína viral gB promueve la penetración del virus y la diseminación de la infección de una célula a otra a través de fusión de membranas⁽¹⁰⁾; c) enmascaramiento: el CMVH induce la sobre expresión del receptor para el Fc de IgG (FcR) en las células infectadas previniendo la lisis inmune, además el virión puede unir tanto β 2-m como FcR^(37,40); d) mimetismo molecular, el virus codifica para las proteínas US28, US27 y UL33 con alta homología a receptores para quimiocinas^(41,42), así el sistema inmune falla en el reconocimiento de moléculas extrañas, un ejemplo de esto son los receptores acoplados a la proteína G celular con los cuales comparten homología algunos polipéptidos generados por el CMVH y e) Latencia: el virus después de una primoinfección puede permanecer de por vida en el huésped en estado de latencia donde la expresión del genoma está confinada a los genes inmediatos-tempranos^(27,30).

1.4 LATENCIA Y PERSISTENCIA VIRALES.

1.4.1 Marco conceptual

Para las infecciones virales se han enunciado varias definiciones acerca de los conceptos de latencia y persistencia.

Para Stannier y cols.⁽⁴⁷⁾, la latencia es un estado en el cual se encuentra el DNA viral en la célula infectada, pero no se replica ni se transcribe, por lo cual no se detectan viriones infecciosos, como tampoco antígenos ni transcritos virales, aunque por medio de la reacción

en cadena de la polimerasa es detectable el genoma viral. Así también otros autores como Banks y Rouse⁽²⁸⁾ y Bodo Platcher⁽⁷⁶⁾ definen una infección latente como una infección persistente en donde el genoma viral esta presente, pero la expresión génica es limitada a los productos de genes tempranos y no se producen viriones infecciosos.

Durante una infección viral persistente, la expresión de la mayoría si no es que de todas las proteínas están relativamente disminuidas en proporción de sus niveles durante una infección aguda, así como la producción de viriones infecciosos⁽⁴⁸⁾.

1.4.2 La latencia en la familia *Herpesviridae*.

Algunos virus han desarrollado mecanismos de latencia como estrategia para permanecer en el huésped, esto les permite estar parcial o completamente ocultos al sistema inmune. En relación a los miembros de la familia *herpesviridae*, todos ellos presentan latencia aunque los eventos moleculares de la misma son diferentes para cada uno, asimismo las células blanco involucradas son distintas⁽²⁸⁾.

En los herpesvirus, el bloqueo a nivel de los genes inmediatos tempranos, e incluso quizá la expresión de los genes tempranos parece detener la activación de los genes tardíos, que son esenciales para una infección viral productiva; por lo que la persistencia viral ocurre como una evasión del sistema inmune del huésped, existiendo varios mecanismos que involucran esta evasión y sobrevivencia por parte de los virus; siendo los CTLs las principales células que pueden controlar la persistencia viral⁽⁴⁸⁾.

Los mecanismos de la persistencia viral se dividen a grandes rasgos en dos tipos:

1. Evasión de la vigilancia inmunológica:

- a) Eliminando moléculas de reconocimiento en células infectadas, alterando la expresión de proteínas virales y alterando la expresión de MHC.
- b) Aboliendo la función linfocito/macrófago, por medio de una inmunosupresión generalizada o selectiva

2. Alteración de la replicación y transcripción del virus:

- a) Por virus incompletos o defectuosos
- b) Por generación de mutantes o variantes
- c) Por disminución de la expresión de productos de genes virales⁽⁴⁸⁾.

En las infecciones por virus del herpes simple (VHS), en las que la latencia ocurre exclusivamente en células neuronales, la expresión de los genes es muy limitada porque solo una región del genoma de VHS es transcrita, además los transcritos que se producen en esta región llamados transcritos asociados a latencia (LATS), no codifican ningún producto de proteínas conocido. Por otro lado muchas neuronas no expresan optimamente moléculas del MHC clase I o clase II, por lo que los antígenos virales no pueden ser presentados apropiadamente a las células T, y en consecuencia no hay un buen reconocimiento y respuesta del sistema inmune⁽²⁸⁾. Durante una infección latente, el genoma viral parece estar presente como un episoma circular, sin detectarse productos de proteínas virales. El mecanismo preciso del establecimiento y mantenimiento de la latencia no está bien entendido aún, se han descubierto sitios periféricos como la planta del pie del ratón como tejido infectado de forma latente, aunque sin conocer la estirpe celular infectada, se cree que las infecciones latentes en los ganglios sensoriales pueden reactivarse para producir una progenie viral, que es transportada por los axones hacia la epidermis cerca del sitio original de infección⁽⁷⁴⁾.

Con respecto a la latencia del virus de varicela zoster (VZV), ésta es poco conocida; aunque al parecer VZV puede establecer latencia en las neuronas sensoriales, evadiendo así el sistema inmune de la misma forma que VHS, sin embargo en contraste con VHS donde solo los LATS son transcritos, varias regiones del genoma del VZV son transcripcionalmente activas durante la latencia⁽²⁸⁾

Por su parte el virus de Epstein Barr codifica proteínas que interfieren con la acción de las citocinas, éstas son cerca de 9 proteínas que pueden ser expresadas durante la latencia, incluyendo proteínas nucleares como EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, y LP, y proteínas de membrana integral LMPs 1 y 2, que además son antígenos para el sistema inmune. La célula blanco principal para la latencia del EBV es el linfocito B, que no solo expresa proteínas virales, también se puede activar y secretar inmunoglobulinas, pero una vez infectado difícilmente es controlado por el sistema inmune^(28,77).

La familia de los herpesvirus establece después de la primoinfección largos períodos de persistencia, por otra parte se han descrito varias estrategias de evasión del sistema inmune por parte de estos virus, tal es el caso de CMVH, donde la infección resulta en una variedad de trastornos que dependen del estado del sistema inmune del huésped, que puede establecer y mantener la latencia del virus, ya que la inmunosupresión severa o la inmunodeficiencia puede causar la reactivación del virus⁽²⁸⁾.

1.4.3 La latencia en la infección por CMVH

Para CMVH se ha propuesto que la latencia se lleva a cabo en células blanco y con mecanismos moleculares diferentes que los observados en VHS y VZV, en este virus la latencia se sugiere principalmente en linfocitos y macrófagos, que son ellos mismos miembros integrales del sistema inmune. Se ha estudiado el genoma del virus y se ha mostrado que la expresión de este es muy limitado, apareciendo confinada a solo genes inmediatos tempranos (cuyos productos de traducción se han detectado en varios órganos y tejidos, entre ellos riñón, pulmón, corazón y glándulas salivales⁽³⁰⁾) y posiblemente tempranos, sin conocerse aún si se generan productos génicos en células infectadas latentemente, o si estos productos pueden servir como blancos para el sistema inmune⁽²⁸⁾.

Durante la infección productiva CMVH tiene una cascada regulada de expresión génica, que se divide en tres fases: inmediata temprana, temprana y tardía; la inmediata temprana, tiene un papel principal en la regulación de la expresión de genes virales tempranos y tardíos, así como regulación de expresión de genes celulares. Por otro lado, los productos de genes virales tempranos están involucrados importantemente en la replicación viral de DNA y los genes tardíos codifican proteínas estructurales virales⁽¹¹⁾.

La infección por CMVH en un huésped inmunocompetente induce una respuesta inmune hacia el virus, pero esta respuesta no erradica al virus, así que el genoma viral se establece en el huésped en forma latente⁽²⁸⁾.

En las células infectadas por CMVH, el virus puede quedar latente por muchos mecanismos moleculares, como lo es presumiblemente el bloqueo de la expresión del gen IE-1; así como los genes tardíos como gB; los antígenos virales son escasos o no existen en la superficie celular. Se sabe que el bloqueo de la replicación del virus en células no permisivas ocurre principalmente en el paso después de la penetración y antes de la replicación del DNA viral, como en el caso de los monocitos primarios en cultivo, que se han encontrado que son semipermisivos para CMVH, sin embargo, si primero son estimuladas las líneas monocíticas con ésteres de forbol, para favorecer su diferenciación, pueden soportar una replicación viral limitada, ya que en cultivos primarios de líneas celulares de granulocitos-macrófagos, se han detectado nuevos transcritos virales, conociéndose que el virus puede ser reactivado bajo ciertas condiciones de cultivo⁽⁷⁾.

En individuos seropositivos al CMVH pero sin infección aguda, se ha detectado un bajo y esporádico nivel de expresión de partículas virales infectivas en la orina, por lo que se ha aceptado parcialmente que en este caso el virus se encuentra en estado de persistencia, y en estado de latencia cuando solo se expresan los genes IE del virus.

Inicialmente se propusieron los linfocitos y la médula ósea como los sitios de latencia para el virus. Posteriormente se observó que durante la viremia, el virus es expresado en células polimorfonucleares (PMNL) pero no fué posible asociar a estas células como blanco de latencia debido a que en individuos asintomáticos no se encuentra en ellos el genoma del CMVH⁽³⁵⁾. Recientemente se ha demostrado que los monocitos y las células endoteliales están implicadas en el establecimiento de la latencia viral^(31,32,55).

El mecanismo de diseminación propuesto contempla que durante una primoinfección con viremia una de las principales células infectadas son los monocitos, cuando éstos viajan hacia tejidos llevan partículas virales a las células endoteliales, en donde el virus por mecanismos desconocidos entra en un estado de latencia. En una posible reactivación posterior la célula endotelial sería fuente de transmisión viral para monocitos los cuales nuevamente se encargarían de diseminar el virus por todo el organismo⁽⁵⁵⁾.

Actualmente no se conoce la forma en que ocurre la reactivación del citomegalovirus latente, ni la importancia relativa entre reinfección y reactivación en el paciente inmunosuprimido; así como tampoco hay resultados concluyentes que demuestren el sitio del organismo que funciona como reservorio viral y el papel que juegan los leucocitos en el mantenimiento de la latencia y como vehículos de transmisión viral.

2. Hipótesis.

La línea celular U-937 (linfoma histiocítico humano) la cual mantiene características de los monocitos puede ser infectada por CMVH y es capaz de soportar una infección persistente o latente por este virus.

3. Objetivo General.

Determinar si ocurre la infección *in vitro* con citomegalovirus humano de las células U-937 (monocitos humanos) y la capacidad de las mismas para desarrollar una infección latente o persistente, mediante el análisis molecular de genes y proteínas virales.

Objetivos Particulares.

1. Determinar la presencia de secuencias genómicas virales en cinéticas de infección por CMVH de la línea U-937.
2. Analizar la expresión de la proteína inmediata-temprana IE-1 y del complejo tardío gB de CMVH en células U-937 infectadas.
3. Evaluar la replicación de nuevos viriones infectivos en monocitos U-937 infectados por CMVH.

2. Hipótesis.

La línea celular U-937 (linfoma histiocítico humano) la cual mantiene características de los monocitos puede ser infectada por CMVH y es capaz de soportar una infección persistente o latente por este virus.

3. Objetivo General.

Determinar si ocurre la infección *in vitro* con citomegalovirus humano de las células U-937 (monocitos humanos) y la capacidad de las mismas para desarrollar una infección latente o persistente, mediante el análisis molecular de genes y proteínas virales.

Objetivos Particulares.

1. Determinar la presencia de secuencias genómicas virales en cinéticas de infección por CMVH de la línea U-937.
2. Analizar la expresión de la proteína inmediata-temprana IE-1 y del complejo tardío gB de CMVH en células U-937 infectadas.
3. Evaluar la replicación de nuevos viriones infectivos en monocitos U-937 infectados por CMVH.

4. Estrategia experimental

4.1. MATERIAL.

4.1.1 Líneas celulares.

U-937: ATCC CRL-1539 Linfoma histiocítico humano.

U-373 MG: ATCC HTB-17 Astrocitoma humano.

MRC-5: ATCC CCL-171 Fibroblastos de pulmón fetal humano.

4.1.2 Hibridomas.

L-14: ATCC HB-8554 Productor de anticuerpos monoclonales anti proteínas inmediatas tempranas (IE-1 o UL-123) de 72 KDa de CMVH.

C-41: ATCC HB-9215 Heterohibridoma (células de mieloma murino y linfocitos de bazo humano) productor de anticuerpos monoclonales anti proteína gB específica de CMVH de 55-130 KDa.

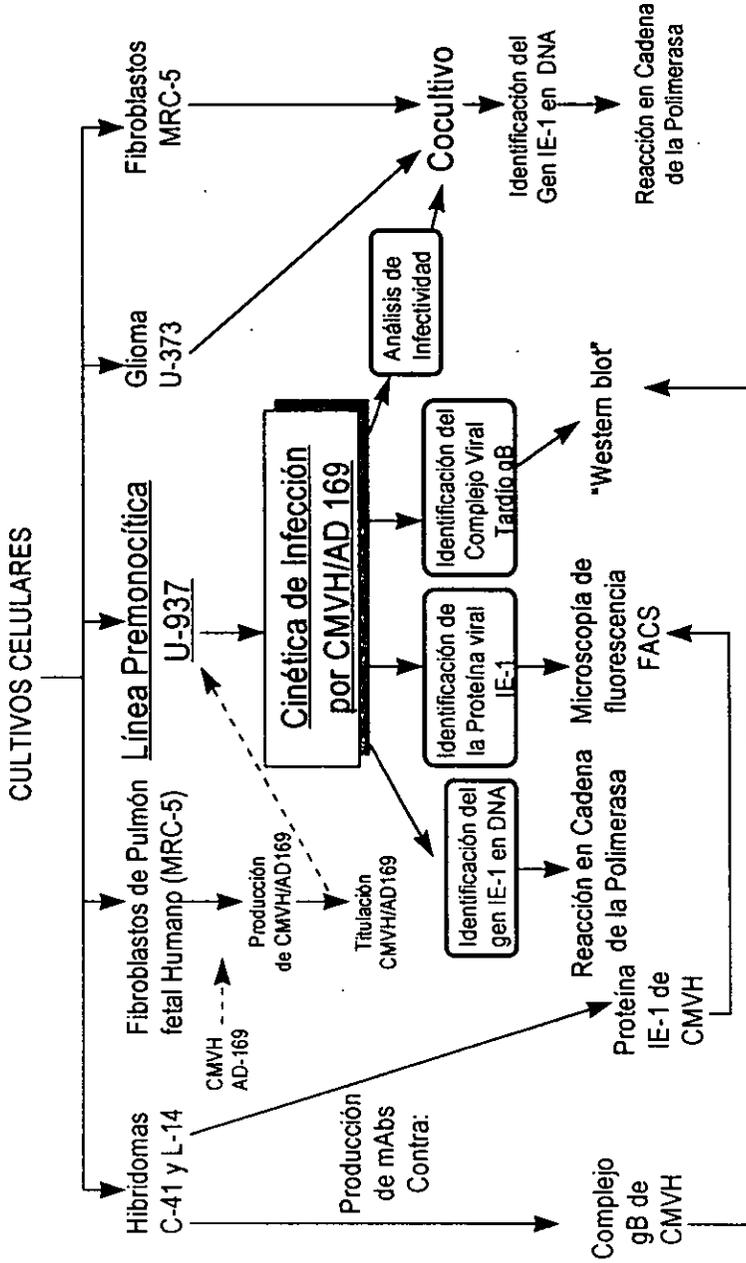
4.1.3 Virus.

Citomegalovirus humano (CMVH) cepa AD-169 ATCC VR-538, propagado en células MRC-5.

4.1.4 Equipo.

- Estufa de CO₂ a 37°C para el cultivo de células forma Scientific.
- Campana de flujo laminar Labconco Purifier Class II.
- Cámara de electroforesis y de electrotransferencia Life Technologies Gibco BRL.
- Fuente de poder Modelo 250 Life Technologies Gibco BRL.
- Termociclador de DNA Perkin Elmer Cetus.
- FACSorter Becton-Dickinson, con el programa de cómputo LYSIS II para el procesamiento de datos.
- Cámara fotográfica Polaroid DS-34.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



4.2. Metodología.

4.2.1 Cultivo de líneas celulares.

Las líneas celulares MRC-5, U-373 MG, U-937 se cultivaron *in vitro* en presencia de 5% de CO₂ y a 37°C, en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium Gibco BRL) suplementado al 10% de SFB (Gibco BRL), con 1mM de piruvato de sodio, penicilina 100 UI/ml, L-Glutamina 2mM; MRC-5 y U-373 MG se cultivaron hasta la obtención de una monocapa celular confluyente, los subcultivos se realizaron en una relación de pase 1:2 previo proceso de tripsinización (Tripsina-Verseno 0.05% *In vitro*)⁽⁶⁶⁾.

4.2.2 Producción y purificación de anticuerpos monoclonales.

Los hibridomas L-14 y C-41 se cultivaron *in vitro* en condiciones de 5% de CO₂ a 37° C , en medio RPMI 1640 suplementado al 10% de SFB (Gibco BRL), con 1mM de piruvato de sodio, penicilina 100 UI/ml, L-Glutamina 2mM; el sobrenadante de cultivo se precipitó con sulfato de amonio y se dializó con amortiguador salina-boratos; purificándose los mAbs utilizando una columna de afinidad de proteína A-sepharosa, a una velocidad de 25-30 ml/h, la levigación de la IgG unida se realizó utilizando glicina-HCl 1M a pH 2.4 y las fracciones de 1 ml se neutralizaron de inmediato con 70 µl de tris 1M.

4.2.3 Cuantificación de proteínas.

La cuantificación del contenido de proteínas de los mAbs purificados se realizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm , empleando la relación una unidad de absorbancia es igual a 1.44 mg/ml⁽⁶⁵⁾.

4.2.4 Producción del virus y determinación del título viral.

El virus se propagó en células MRC-5 de generación 20 a 26, se cosechó el sobrenadante cuando las células en confluencia mostraron el 80% del efecto citopático. El título viral se determinó considerando el número de unidades formadoras de placas (UFPs), empleando diluciones seriadas (10^{-7} - 10^0) de una suspensión viral para infectar monocapas confluentes de MRC-5 en botellas de cultivo de 75 cm², las cuales se dejaron preabsorber durante 2 h en medio DMEM al 2%, se lavaron 2 veces con PBS estéril o medio sin suero, después se les adicionó una monocapa de medio DMEM-agar al 2% SFB, una semana mas tarde se les adicionó otra monocapa igual que la anterior, a la siguiente semana se fijaron las células con paraformaldehído al 10%, se vació el agar y se tiñó con azul de bromofenol y se contó el número de UFP, empleando la relación número de placas por el inverso de la dilución. Se determinó que el título viral fue de 1×10^8 UFP/ml. Este título es válido por aproximadamente 6 meses manteniendo el virus a -70°C en alicuotas de máximo 5 ml para evitar inactivación del virus por descongelación-congelación para su uso; después comienza a disminuir el título viral⁽⁷⁰⁾.

4.2.5 Infección de células U-937 con la cepa viral AD-169.

Las células monocíticas U-937 (1×10^7 células) se lavaron con PBS estéril centrifugando por 5 minutos a 1000 g, y se infectaron en 1 ml de medio RPMI 1640 Gibco al 2 % SFB, utilizando 100 μl del virus AD-169 por cada millón de células, para tener una multiplicidad de infección (MOI) de 10, se centrifugó a 1500 g por 1 h a temperatura ambiente, el inóculo se decantó y se resuspendió el paquete celular con medio RPMI al 10% SFB⁽⁵¹⁾.

4.2.6 Cinéticas de infección.

Las células U-937 cultivadas fueron infectadas y se llevó a cabo una cinética de infección cosechando 2×10^6 células para la identificación de DNA viral por PCR⁽⁶⁹⁾, 4×10^6 células para los estudios de cocultivo, 1×10^6 células para identificar proteínas inmediatas tempranas e igual número para proteínas tardías. Cada una de ellas según el esquema preestablecido. Se partió inicialmente de un cultivo en botella de 75 cm² con un total de 10×10^6 células, manteniendo en promedio una población de 20×10^6 células, con una densidad de 700,000 células/ml con cambio de medio y ajuste de la población celular según fué necesario.

4.2.6.1 Identificación de DNA viral por PCR.

Se cosecharon 2×10^6 células diariamente durante los primeros 14 días, y posteriormente cada cuatro días durante 4 meses. Después de ser cosechadas las células U-937 y lavadas dos veces con PBS centrifugando a 1200 g por 5 minutos, se resuspendieron en 100 μ l de PBS y se congelaron a -20°C hasta el momento de la extracción de DNA y análisis por PCR⁽⁶⁹⁾.

4.2.6.2 Células U-937 infectadas con la cepa AD-169, en cocultivo con células MRC-5 y U-373 MG sin infectar.

Las células U-937 infectadas, se cosecharon y se adicionaron a una botella de cultivo (Nunclon) que contenía células MRC-5 o U-373 MG al 75% de confluencia, dejando en cocultivo por 5 días en medio DMEM al 2%, y las células en suspensión se cosecharon para su posterior análisis por PCR previa extracción de DNA, las células adherentes se dejaron 2-3 días más en cultivo, se cosecharon previa tripsinización y se analizaron igual que las anteriores por PCR.

4.2.6.3 Identificación de proteínas inmediatas tempranas (IE1).

Se cosecharon células U-937 infectadas y el mismo número de células no infectadas para llevar a cabo su análisis por microscopía de fluorescencia, también se cosecharon el mismo número de células cada 24 horas para llevar a cabo su análisis poblacional por FACS como se indica mas adelante; las células fueron lavadas 2 veces con PBS-BSA 1% antes de someterlas a marcaje.

4.2.6.4 Identificación de proteínas tardías.

Se cosecharon 1×10^6 células a partir del tercer día post-infección los días 3,5,8,11,y 14 después fueron lavadas 2 veces con PBS centrifugando a 1200 g por 5 minutos resuspendiendo en 0.5 ml de PBS, se congelaron las muestras a -20°C , para posteriormente someter las proteínas virales a su análisis por inmunotransferencia, también se cosecharon 1×10^6 células cada 24 horas para llevar a cabo su análisis poblacional por FACS como se indica a continuación.

4.2.7 Análisis de las proteínas virales.

4.2.7.1 Inmunofluorescencia indirecta.

a) Microscopía de fluorescencia.

Para el estudio de la expresión de la proteína IE se cosecharon 2×10^6 células infectadas con CMVH, se lavaron con 3 ml de PBS centrifugando 5 minutos a 800 g entre cada incubación, se pusieron en contacto con 10 μg del mAb L-14, incubando 20 minutos a 4°C , se realizó un lavado, y se agregaron 10 μg del segundo anticuerpo fluoresceinado (cabra anti-cadena H y L de IgG de ratón marcado con isotiocianato) incubando 20 minutos a 4°C , se lavaron, y se fijaron las células con formaldehído al 3.7% en 1 ml de

PBS, incubando 20 minutos a 4°C, se lavaron y se resuspendieron con 20 µl de solución de montaje (glicerol-PBS) para colocarlas en un minicubreobjetos, secando las orillas con papel absorbente, sellando con barniz primero dos lados y posteriormente los otros dos lados, las preparaciones fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia, tomando en cuenta el porcentaje de células marcadas.

b) Citometría de flujo (FACS).

Para el estudio de las proteínas inmediatas tempranas (IE) y las proteínas tardías gB en las células U-937, las células (1×10^6) cosechadas a los diferentes tiempos de infección se pusieron en contacto con 1 µg de mAb L-14 o C-41 mas 10 µl de PBS-BSA 1% -saponina 0.3%, (se utilizó como control 1 µg del mAb no relacionado Y3, que reacciona con antígenos de clase I murinos), durante 30 minutos a 4°C, se realizaron dos lavados con PBS-BSA 1% -saponina 0.1%⁽⁵²⁾ centrifugando a 1200 g por 5 minutos, entre cada incubación. Se utilizó como segundo anticuerpo 1 µg del conjugado fluoresceinado (cabra anti-cadena H y L de IgG de ratón marcado con FITC para L-14, mientras que para C-41 se empleo cabra anti-Fc de la molécula de IgG de humano marcado con FITC), mas 10 µl de PBS-BSA 1% -saponina 0.3%, se incubó en obscuridad durante media hora a 4°C, finalmente se agregaron 500 µl de yoduro de propidio (1:100) en PBS-BSA 1%, para diferenciar a las células que permeabilizaron su membrana de las que no; se determinó la intensidad de fluorescencia de grupos de 5000 células marcadas con el mAb correspondiente, analizando las diferencias que presentaron las poblaciones infectadas de las no infectadas, a través de citometría de flujo utilizando FACSorter B-D y el programa LYSIS II.

4.2.7.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

Las células (1×10^6) cosechadas a los diferentes tiempos de infección se lavaron y resuspendieron en 0.5 ml de PBS, se sonicaron en baño de hielo, 3 ciclos de 1 min sonicando por 1 min de descanso, centrifugando a 2000 g por 15 min a 4°C, se guardó el sobrenadante a -70°C con 5 μ l de inhibidores de proteasas como PMSF (100 mg/ml) y EDTA (10mM), el contenido de proteína se cuantificó por espectrofotometría a 280 nm. El lisado se diluyó en amortiguador de muestra, empleando 40 μ g de proteína por carril para llevar a cabo el corrimiento por electroforesis.

La SDS-PAGE se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa, en condiciones reductoras y gradiente discontinuo de pH, el gel introductor contenía 5% de acrilamida, 0.13% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, APS y TEMED. El gel separador contenía 10% de acrilamida-bisacrilamida, 0.19% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8. Como amortiguador de muestra se usó Tris-HCl 1.5 M pH 6.8, que contenía SDS al 2%, β -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%.

El corrimiento electroforético se llevó a cabo empleando 20 mA por placa hasta alcanzar el gel separador, donde se incrementó a 25 mA, se empleó como amortiguador de corrimiento Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%, pH 8.3, posteriormente los geles se tiñeron durante 1 h en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-ácido acético-agua (45:10:45) y el exceso de colorante se eliminó empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85)^(65,68).

4.2.7.3 Inmunoelctrotransferencia (Western Blot).

La electrotransferencia de los geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa (PNC), se llevó a cabo durante una hora a 400mA, en una cámara de electrotransferencia horizontal, se empleó como amortiguador para la transferencia glicina 192 mM, metanol al 24% en tris 20 mM. Transcurrido este tiempo y para comprobar que la transferencia se llevo a cabo, se tiñó el PNC con solución de Rojo de Ponceau al 5% en TCA 7.5 % w/v, se observaron y marcaron los carriles y se lavó el PNC con PBS, se cortaron los PM y se tiñeron con solución de tinta china al 1% PBS-Tween 20 al 0.05%, el resto se incubó 3 h a 37°C en agitación, en solución de bloqueo (gelatina al 1% en PBS o leche 1.5% en PBS-Tween 20 al 0.05%). Después de 3 lavados con PBS-T y 1 con PBS, el PNC se incubó 2h a 37°C en agitación con el sobrenadante de cultivo purificado de C-41 [1.58 mg/ml] empleando dilución 1:8; posteriormente se lavó 3 veces con PBS-T y 1 con PBS, y se incubó 2 h a 37°C con el suero de cabra anti IgG H+L conjugado a peroxidasa de rábano, a una dilución óptima (1:3000), una vez pasado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS-T y 1 con PBS para finalmente colocarlo en solución de sustrato de diaminobencidina durante 2 minutos y detener la reacción lavando con agua^(65,68).

4.2.8 Extracción de DNA y amplificación por PCR.

4.2.8.1 Extracción de DNA.

El paquete celular de 2×10^6 células se resuspendió en 600 μ l de amortiguador de extracción, se adicionó 1 μ l de RNAsa pancreática y se incubó a 37°C 1 h, se adicionó 5 μ l de proteinasa K para tener una concentración de 100 μ g/ml e incubó a 65°C 20 minutos. Se adicionó fenol saturado con Tris-HCl pH 8, se agitó por 10 minutos y centrifugó 10 minutos a 8000 g a 4°C, se recuperó la fase acuosa dejando el precipitado en la interfase, se adicionó fenol/ cloroformo/ alcohol isoamílico, se agitó por 5 minutos y centrifugó 5 minutos a 8000 g a 4°C, se tomó la fase acuosa, y se adicionó cloroformo/ alcohol isoamílico (en todos los casos se

adicionó un volumen igual de la fase orgánica); se agitó por 2 minutos y centrifugó 5 minutos a 8000 g a 4°C, se tomó la fase acuosa y adicionó 200 µl de acetato de amonio 5M + 1 volumen de isopropanol frío mezclando completamente, se incubó a -20°C por toda la noche.

Se centrifugó a 8000 g 15 minutos a 4°C; se decantó el sobrenadante, el pellet es DNA, se lavó con Etanol 70% 1 ml, se agitó suavemente y centrifugó a 8000 g 15 minutos a 4 °C; se repitieron los lavados dos veces; se secó el pellet y resuspendió en 50 µl de TE; se cuantificó a 260 nm y 280 nm y se obtuvo la relación de pureza y concentración para su posterior análisis por PCR, almacenándose las muestras a -20°C por un máximo de un mes⁽⁶⁸⁾.

Amplificación por PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa requiere la utilización de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP), la enzima taq DNA polimerasa y oligonucleótidos sintéticos iniciadores específicos para amplificar la región deseada.

Utilizamos en este trabajo los oligonucleótidos necesarios para amplificar las secuencias conservadas del gen inmediato temprano de citomegalovirus humano de acuerdo a lo publicado por Brytting y cols. y con las modificaciones introducidas en nuestro laboratorio.

Brevemente la técnica utilizada consta de:

Iniciadores “C”= 5'-TGA-GGA-TAA-GCG-GGA-GAT-GT-3'

 “D”= 5'-ACT-GAG-GCA-AGT-TCT-GCA-GT-3'

El primero corresponde a los nucleótidos 1729-1748 complementarios de la cadena antisentido y “D” son nucleótidos 1951-1970 complementarios de la cadena en sentido del cuarto exon de CMVH del gen IEA1 localizado en el fragmento *EcoRI* J de la cepa AD-169; la región amplificada es de 242 pares de bases⁽⁶⁹⁾.

Se ajustó la cantidad de DNA de las muestras a 1 µg en un máximo de 10 µl en TE (10 mM tris, 1mM EDTA pH 8), y se preparó la mezcla de reacción que consiste en: 0.1 mM de nucleótidos, 10 mM de tris-HCl, 2mM de MgCl₂, 50 mM de NaCl, 0.3 µg/ µl albúmina sérica bovina (BSA), 0.25 µM de cada uno de los dos oligonucleótidos y 0.5 U de taq

aquaticus) DNA polimerasa y 1 µg del DNA problema, completando con agua destilada estéril a un volumen final de 30 µl. La reacción fue llevada a cabo en un termociclador Perkin Elmer, con un programa de desnaturalización de 95°C por 5 min 30 seg, 40 ciclos de 92°C 30 seg, 53°C 30 seg, 72°C 30 seg, finalizando con 72°C por 10 min como extensión final.

En cada ensayo de PCR se incluyó un control de reactivos, el control positivo fue 0.05 µg de DNA de MRC-5 infectadas con citomegalovirus humano hasta observar el efecto citopático. Los productos de PCR (10 µl / muestra) fueron separados en un gel de agarosa al 2% adicionado con 2 µl de bromuro de etidio (1µg/100µl) y visualizados bajo luz ultravioleta para identificar la banda correspondiente a 242 pb.

5. Resultados

5.1. Purificación de mAbs.

Empleando el sobrenadante de los hibridomas L-14 y C-41, se obtuvieron los mAbs anti IE-1 y anti complejo gB del CMVH respectivamente, precipitando con sulfato de amonio y purificando por columna de afinidad con proteína A-sepharosa (Figuras #2 y #3). A las fracciones eluidas se les determinó la concentración de proteínas por espectrofotometría a 280 nm, y el pico de mayor absorbancia (fracción 6 para L-14 y 10-13 para C-41) fué utilizado en los análisis de infección.

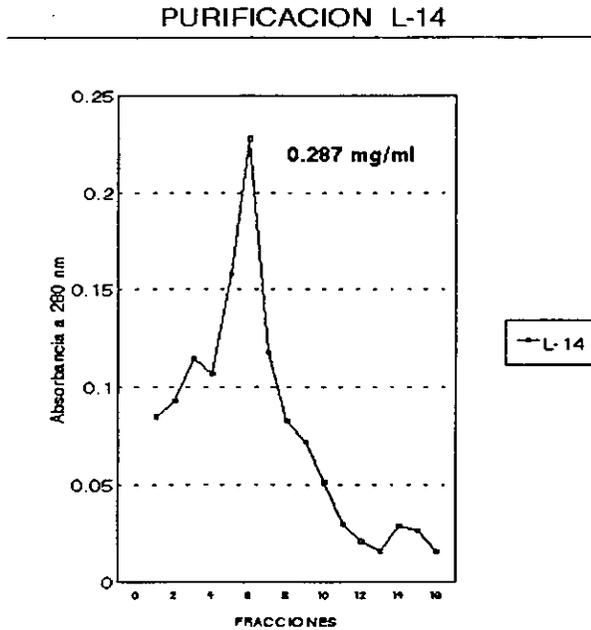


Figura #2: Purificación del mAb anti IE-1 de CMVH, producido por el hibridoma L-14.

PURIFICACION C-41

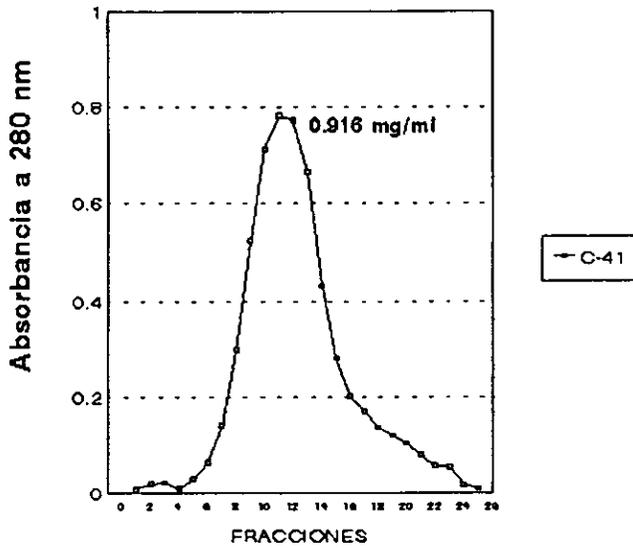


Figura #3: Purificación del mAb anti gB de CMVH, obtenido del hibridoma C-41.

5.2. Replicación de CMVH en cultivo de fibroblastos de pulmón fetal humano.

Los fibroblastos de pulmón fetal humano (MRC-5) permiten la replicación del CMVH cepa AD-169, una vez confluentes los cultivos (figura #4), se infectaron con el virus para permitir su replicación (figura #5) y al observarse el efecto citopático en el 80% de la monocapa celular a los 7 días post-infección (figura #6), se tomó una alicuota del sobrenadante para determinar la titulación viral.

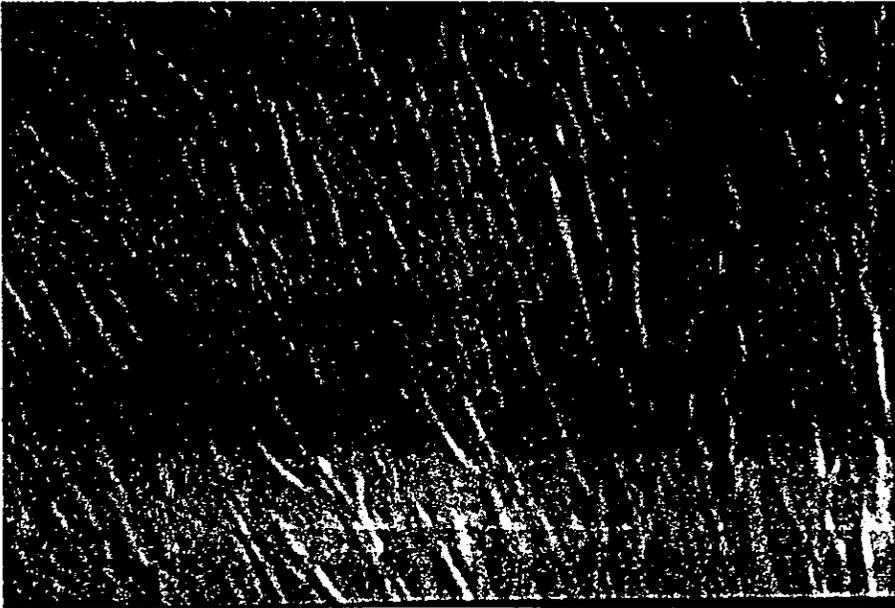


Figura #4: Cultivo de fibroblastos MRC-5; se observa la morfología normal de la monocapa de células sin infectar.

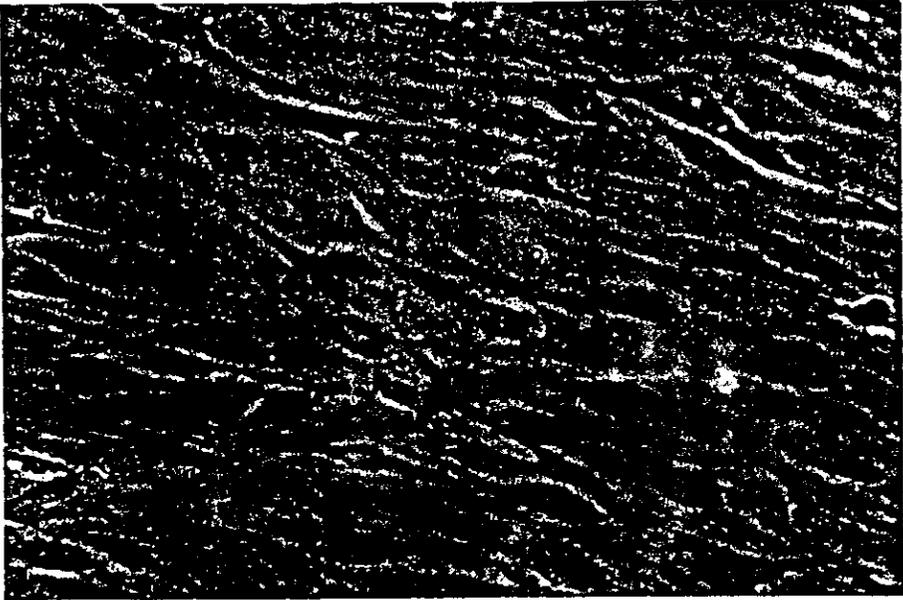


Figura #5: Células MRC-5 en un cultivo a las 24 horas de infección con CMVH, se observan los cambios morfológicos.



Figura #6: Cultivo de MRC-5 a los 7 días de infección con CMVH, se muestran las inclusiones citoplasmáticas, cambios citopáticos y pérdida de la morfología celular.

5.3. Análisis del DNA celular

Para corroborar que el DNA obtenido de las células infectadas con citomegalovirus se encontraba en condiciones óptimas, sin degradación, se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2% (Figura #7).

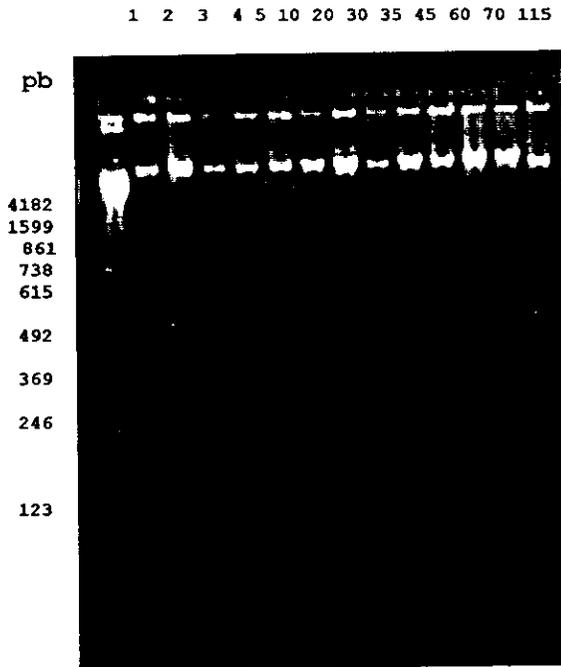


Figura #7: Muestras de DNA celular a diferentes días de infección, empleando como marcador de tamaño molecular 123 pb DNA en escalera, observándose que todas las muestras presentan DNA íntegro y de alto peso molecular.

5.4. Detección de la expresión del gen viral IE-1 en cinéticas de cultivo mediante la técnica de PCR.

Se llevó a cabo una cinética de infección de 4 meses en la línea celular U-937 infectada con la cepa AD-169, obteniendo muestras de DNA a los tiempos indicados en la metodología, y fueron amplificadas por PCR, (Tabla 1); los productos de la misma fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% (Figura #8), un cultivo paralelo de células U-937 no infectadas fueron analizadas también por PCR (Tabla 2).

Día	Gen IE-1	Día	Gen IE-1	Día	Gen IE-1
1	positivo	14	negativo	95	negativo
2	positivo	14	negativo	99	negativo
3	positivo	16	negativo	102	negativo
4	negativo	23	negativo	127	negativo
5	negativo	30	negativo	129	negativo
6	negativo	40	negativo	130	negativo
7	negativo	42	negativo	134	negativo
8	negativo	43	negativo	137	negativo
9	negativo	51	negativo	139	negativo
10	negativo	71	negativo	144	negativo
11	negativo	76	negativo	146	negativo
12	negativo	78	negativo	148	negativo
MRC-5 / CMVH		positivo			

Tabla 1: Detección del gen viral IE-1 en cinéticas de cultivos de células U-937 infectadas con CMVH; Análisis del genoma por PCR, indicando como positivo la detección de la banda de 242 pb correspondiente al gen viral IE-1.

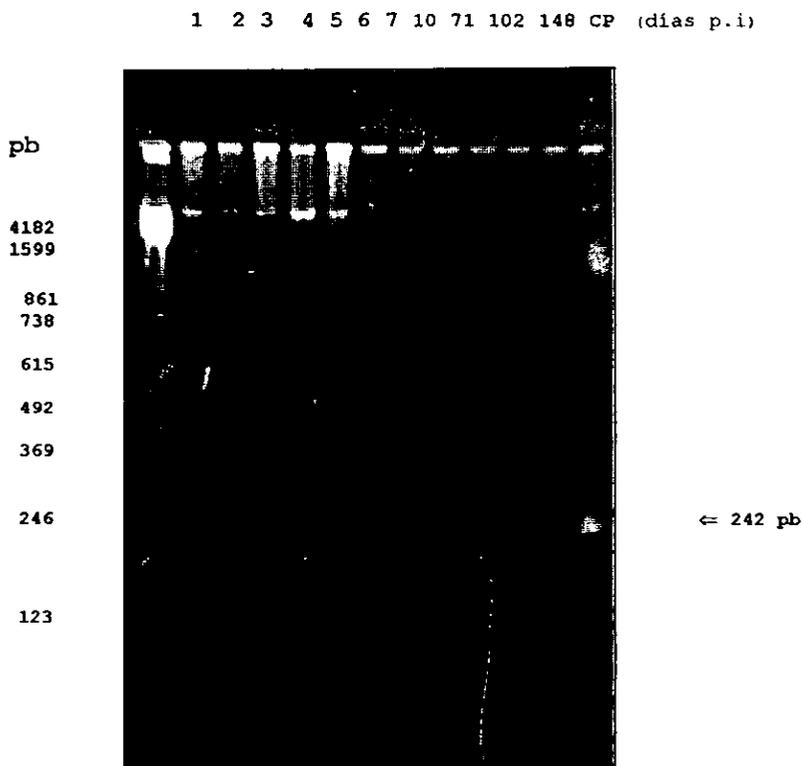


Figura #8: Presencia del gen viral IE-1 durante 72 horas post-infección de células U-937. El fragmento amplificado con los iniciadores empleados es de 242 pb, apreciándose este en los primeros tres días de infección y no se detecta más al menos hasta 148 días post-infección (4 meses). Testigo positivo (CP) células MRC-5 infectadas con CMVH. Marcador de tamaño molecular: Escalera de DNA de 123 pb.

CÉLULAS U-937 NO INFECTADAS

Día	Gen IE-1	Día	Gen IE-1	Día	Gen IE-1
1	negativo	23	negativo	99	negativo
2	negativo	30	negativo	102	negativo
3	negativo	36	negativo	127	negativo
4	negativo	40	negativo	129	negativo
9	negativo	43	negativo	130	negativo
16	negativo	95	negativo	134	negativo
MRC-5 /CMVH		positivo			

Tabla 2: Testigos negativos de PCR: DNA de células U-937 no infectadas y analizadas a diferentes tiempos paralelamente a las células infectadas.

5.5. Expresión de la proteína IE-1 en células U-937 infectadas por CMVH.

Las células U-937 infectadas con CMVH fueron analizadas por microscopía de fluorescencia (Figura #9), empleando el mAb L-14, detectándose la proteína viral.

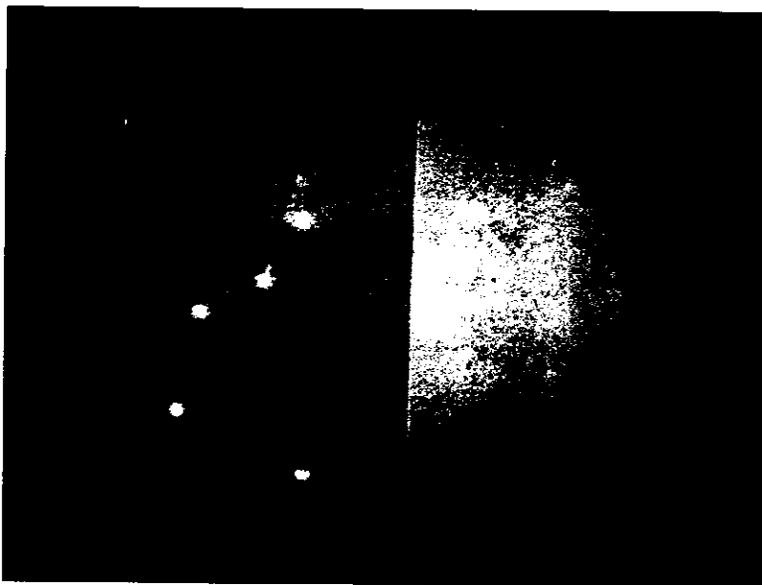


Figura #9: Detección mediante microscopía de fluorescencia de la expresión de la proteína IE-1 en células U-937 infectadas con CMVH durante 48 horas. A la derecha las células sin infectar marcadas con el mAb L-14, a la izquierda se encuentran las células infectadas con CMVH marcadas con el mismo anticuerpo, detectando la proteína IE-1.

En la cinética de infección se demostró mediante FACS utilizando el mAb L-14, la presencia de la proteína inmediata temprana 1 (IE-1), la cual se expresa en forma diferencial dependiendo del tiempo post-infección. Como se observa, el pico de mayor expresión de IE-1 es a las 48 horas post-infección, después decae parcialmente hasta prácticamente desaparecer a las 120 horas (Figura #10).

IE-1 INTRACELULAR en U-937

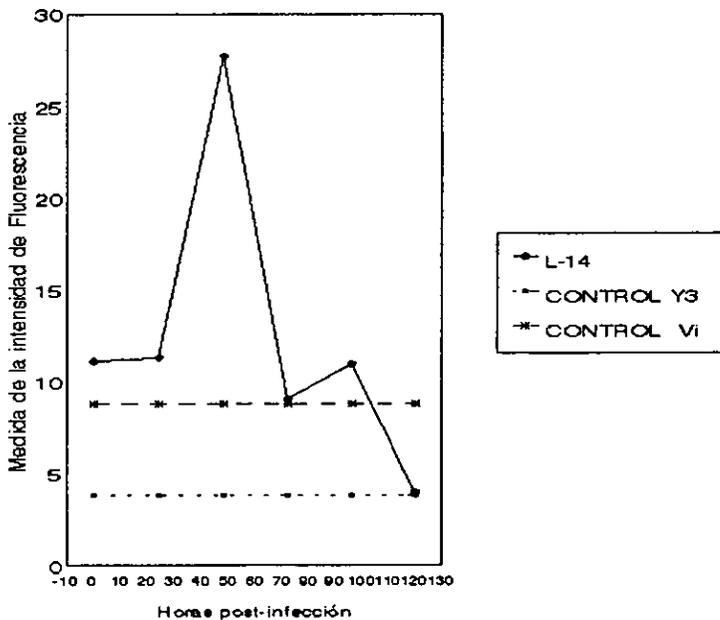


Figura #10: Análisis mediante FACS de la cinética de la expresión intracelular de IE-1 en células U-937 infectadas con CMVH. La línea continua corresponde al marcaje con mAb L-14 que reconoce a la proteína IE-1, se utilizó como control de fluorescencia el anticuerpo no relacionado Y3 y como control de la IE-1 el marcaje en células no infectadas (línea discontinua).

5.6. Análisis de la expresión de proteínas del complejo gB de CMVH durante la cinética de infección en células U-937.

En la cinética de infección, mediante inmunoensayo en papel de nitrocelulosa “Western blot”(WB), utilizando el mAb C-41 que reconoce el complejo viral tardío gB, no se detectó la expresión de esta proteína en células U-937. Los testigos positivos fueron células U-373 y MRC-5 infectadas que si expresan el complejo gB (Tabla 3 y Figura #11).

Línea celular			
Día post-infección	U-937	U-373	MRC-5
0 (no infección)	negativo	negativo	negativo
1	negativo	ND	ND
3	negativo	ND	ND
5	negativo	positivo	positivo
8	negativo	ND	ND
11	negativo	ND	ND
13	negativo	ND	ND
15	negativo	ND	ND

Tabla 3: Expresión de gB detectado por WB, se muestran los diferentes días de análisis de la cinética de infección en las células U-937 infectadas por CMVH, indicándose como negativo la ausencia en la detección de la expresión de la proteína gB, como positivo la detección de esta proteína, y ND cuando no se realizó la prueba.

"Western blot"

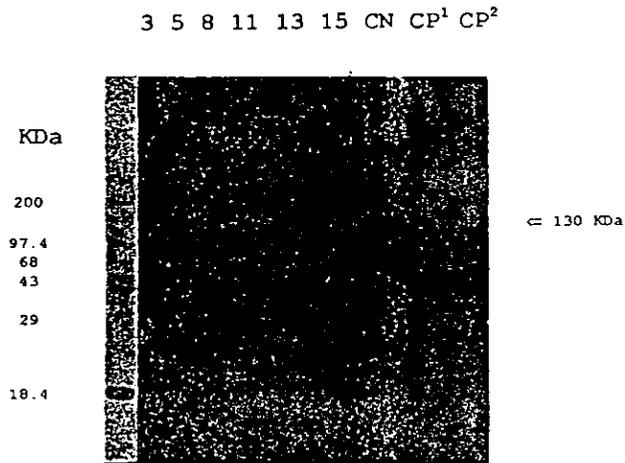


Figura #11: Detección de gB mediante inmunoensayo en papel de nitrocelulosa, el número de carril indica el día post-infección en las células U-937. En los testigos positivos, MRC-5/CMVH (CP¹) y U-373 /CMVH (CP²) puede observarse una banda en 130-136 KDa, se utilizó como testigo negativo células MRC-5 no infectadas (CN). A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular.

Utilizando el mAb C-41 y mediante FACS, se analizó a las células U-937 infectadas, los valores de fluorescencia son inferiores a los controles negativos (Figura #12).

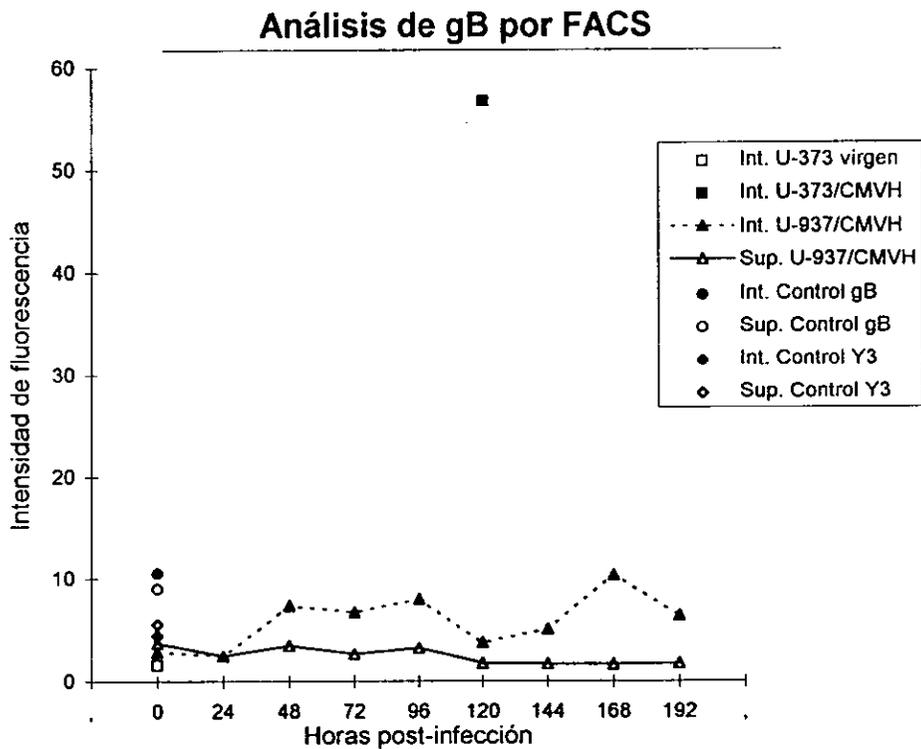


Figura #12: La línea discontinua corresponde al marcaje intracelular con mAb C-41 que reconoce a la proteína gB, la línea continua corresponde al marcaje en superficie empleando el mismo mAb, en ambos casos utilizando como control de fluorescencia un anticuerpo no relacionado Y3 y como control de gB el marcaje en células no infectadas.

FACS C-4I Intracelular

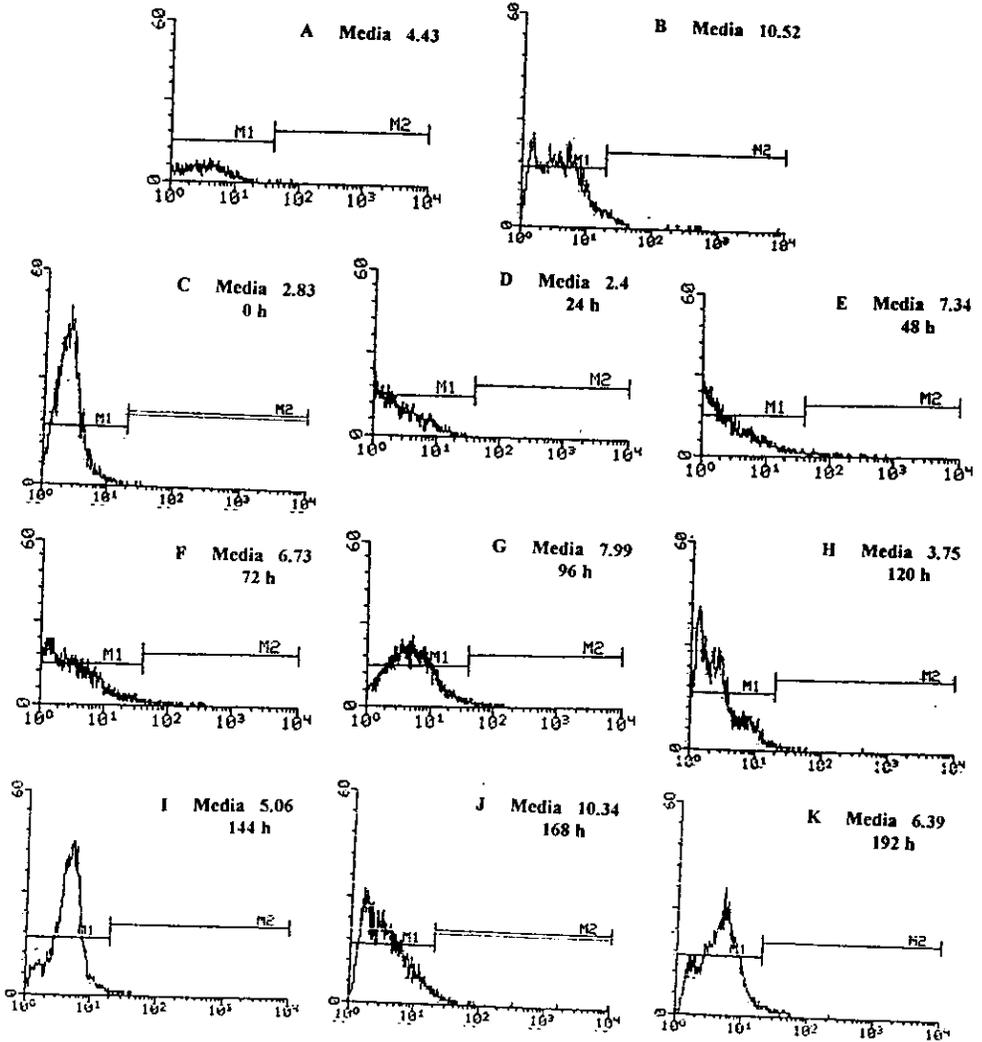
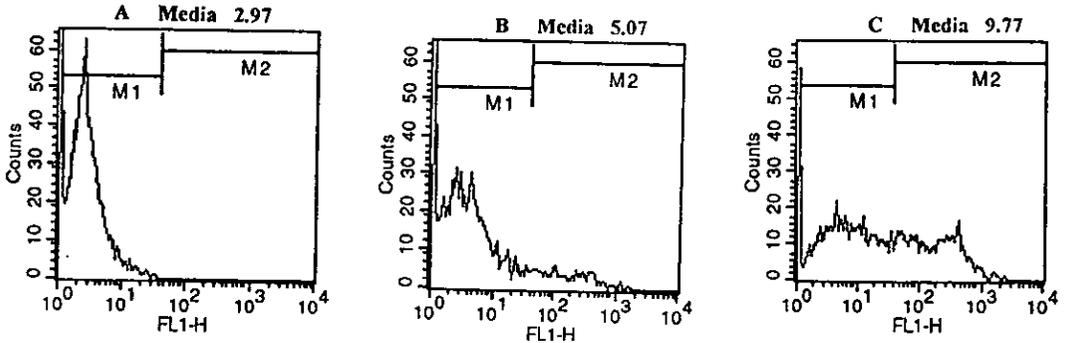


Figura 13: Expresión de la proteína gB detectado por FACS; el histograma A es control de fluorescencia empleando un anticuerpo no relacionado Y3, y como control de gB el marcaje en células no infectadas (histograma B). los histogramas C-K, diferentes tiempos de infección en células U-937.

FACS C-41 Intracelular

Fibroblastos MRC-5



Astrocitomas U-373

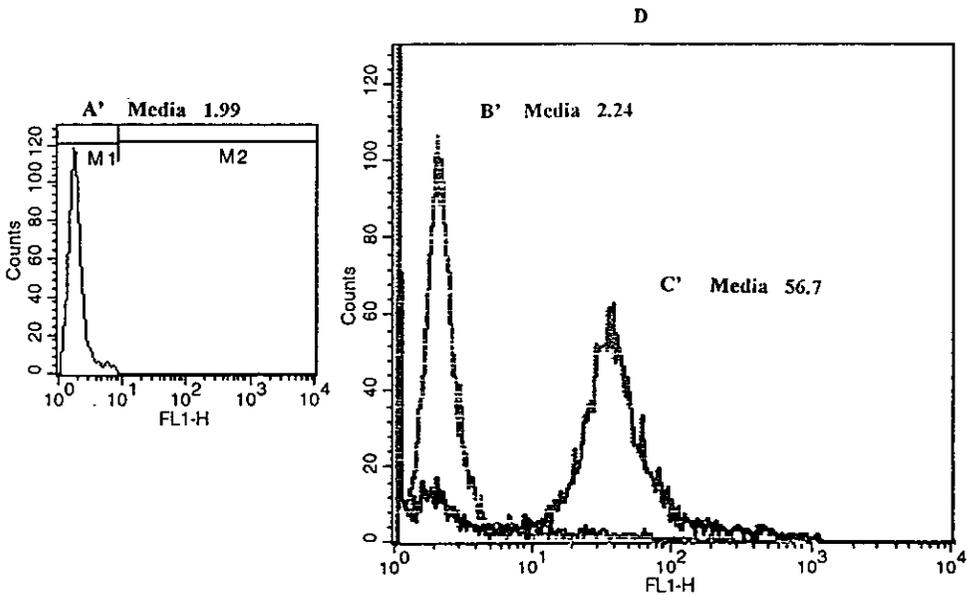


Figura 14: Expresión de la proteína gB detectado por FACS; los histogramas A, A' son controles de fluorescencia empleando un anticuerpo no relacionado Y3, y como control de gB el marcaje en células no infectadas B, B', marcaje en células MRC-5 infectadas con CMVH (C), y en células U-373 infectadas con CMVH (C'), el histograma D indica el traslape entre las células U-373 infectadas (C') y células U-373 no infectadas (B').

5.7. Búsqueda de secuencias virales en células cocultivadas con la línea U-937 infectada con CMVH.

Células U-937 obtenidas a los días 3,6,10 y 14 post-infección, se cocultivaron con células U-373 o MRC-5 durante 4 días. Posteriormente se purificó el DNA de estas últimas y se amplificaron por PCR para la detección de secuencias virales (Tabla 4 y Figura #15).

Día post-infección U-937	U-937 infectada	MRC-5 cocultivada con U-937 infectada	U-373 cocultivada con U-937 infectada
3	negativo	negativo	negativo
6	negativo	negativo	negativo
10	negativo	negativo	negativo
14	negativo	negativo	negativo

Tabla 4: Amplificación del gen IE-1 de CMVH en DNA extraído de células cocultivadas con la línea U-937 a diferentes tiempos post-infección.

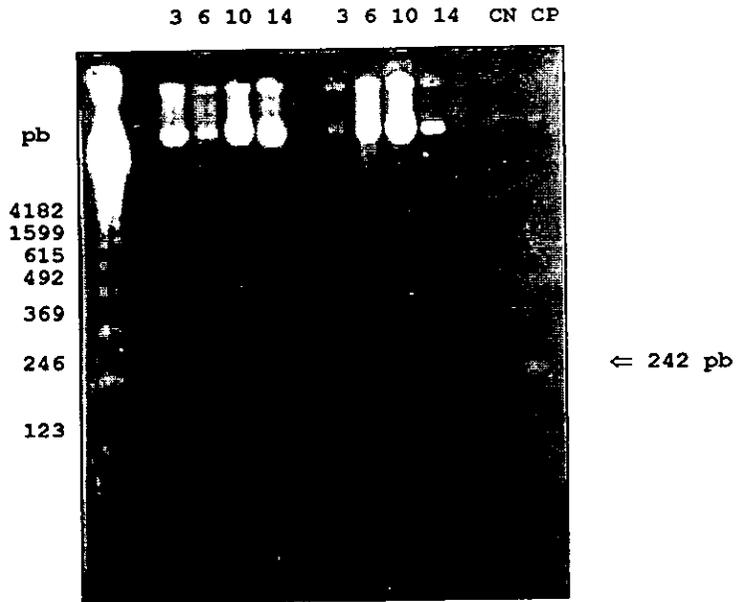


Figura #15: Productos de PCR en gel de agarosa al 2%, el primer carril corresponde al marcador de tamaño molecular 123 pb DNA en escalera. Los carriles de la izquierda corresponden a las muestras de los días 3,6,10,14 del DNA extraído de MRC-5 cocultivadas con U-937 y los de la derecha a los correspondientes en U-373, el control negativo (CN) fue células MRC-5 no infectadas y el control positivo (CP) células MRC-5/CMVH.

6. Discusión.

En los últimos años se ha observado un incremento en los casos de inmunodeficiencias tanto naturales como iatrogénicas, lo que ha permitido el establecimiento de infecciones oportunistas por citomegalovirus humano, el cual infecta prácticamente a toda la población mundial y aunque el hospedero resuelve en la mayoría de los casos la infección aguda, el virus no es erradicado y permanece en estado de persistencia y/o latencia de por vida, siendo capaz de reactivarse en caso de inmunosupresión. De esta forma el CMVH se ha convertido en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los recién nacidos infectados in utero, los individuos receptores de un trasplante de órgano y en pacientes con SIDA. El desarrollo de estrategias que permitan mejores pronósticos en los pacientes infectados requiere conocer tanto el sitio como los mecanismos responsables de la generación y el mantenimiento de la latencia viral, sin embargo su estudio se ha limitado por la especificidad de especie, de manera que no es posible extrapolar directamente observaciones de la infección en modelos animales a la de los seres humanos, por lo que la mejor alternativa es la búsqueda de sistemas celulares *in vitro* que reflejen, aún cuando sea parcialmente, la infección en humanos.

Debido a que la propuesta de los monocitos como células involucradas en el fenómeno de latencia y transporte de CMVH, deriva de algunas observaciones de infección *in vivo*, resulta muy interesante el análisis de la infección *in vitro* de líneas monocíticas, las cuales representan un posible modelo de estudio de la latencia *in vitro*. Con este fin, se realizó la evaluación molecular de genes y proteínas virales en cultivos de monocitos U-937 infectados con CMVH en un seguimiento hasta 4 meses post-infección.

En este estudio se utilizó la línea MRC-5 (fibroblastos humanos) como un control de infección productiva por CMVH, detectándose el DNA viral por PCR, la proteína estructural gB a las 120 h y el efecto citopático característico en las células infectadas a los 7 días post-infección (figuras 3-5).

Por otro lado, el análisis del DNA de células U-937 infectadas a 10 MOI con CMVH AD169 demostró al gen IE-1 por medio de la técnica de PCR hasta el tercer día p.i., después del cual no se detectó más y continuó así hasta el final del cuarto mes (tabla 1 y figura 8), lo cual nos indica que la célula si se infecta y expresa el gen IE-1 solamente al inicio de la infección, sugiriendo un bloqueo probablemente a nivel de transcripción de genes IE, lo cual detendría la activación de genes L, que son esenciales para la infección productiva.

La confirmación de la expresión del gen viral IE-1 se realizó a través de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo en monocitos infectados, observándose la franca expresión intracelular de IE-1 solo hasta el 2° día post-infección (figura 10).

El siguiente análisis fué la expresión de la proteína tardía gB de CMVH en la cinética de infección realizada en las células U-937 infectadas, mediante electrotransferencia, con resultados negativos en todos los días de análisis, excepto para los testigos positivos que fueron realizados en células que completan el ciclo viral como lo son los fibroblastos MRC-5 y los astrocitomas U-373 MG infectados, las cuales si expresaron este complejo proteico de 130 Kda (Figura #11); así también se realizó un ensayo de FACS para la detección de esta proteína de forma intracelular y en superficie para los monocitos infectados, obteniendo en ambos casos resultados negativos (Figura #12). Debido a que gB es una proteína estructural del virión su ausencia nos indica la no formación de nuevos viriones en los monocitos U-937 infectados por CMVH.

Nuevamente los resultados se dirigen a la incapacidad de completar el ciclo viral, ya sea por factores represores asociados a la célula hospedero o por carencia de elementos génicos virales suficientes para la iniciación de la replicación de genes tardíos.

Por último se evaluó en células U-937 infectadas la formación de nuevos viriones capaces de infectar células MRC-5 o U-373 MG mediante un cocultivo de 4 días. Esto fue posible gracias a que las células U-937 son no adherentes mientras que MRC-5 y U-373 MG son adherentes. Los resultados de PCR revelaron la absoluta incapacidad de infección productiva y ensamblaje de nuevos viriones infectivos a células adyacentes, lo que parece

lógico sobretodo al recordar que la activación de los genes tardíos está probablemente detenida, y que éstos son esenciales para la infección productiva del virus.

Los mecanismos moleculares que controlan la permisividad de las células a la replicación del CMVH aún no están determinados. En otros sistemas virales los eventos de absorción y penetración virales determinan la permisividad de la célula. Sin embargo en varios estudios se ha demostrado que el CMVH puede penetrar una variedad de células humanas y de origen no humano sin capacidad para replicarse en ellas. Por consiguiente existen factores celulares que determinan el resultado de la infección por el CMVH después de su entrada.

Probablemente los monocitos adquieren al CMVH en los estados tempranos de su lineage, en la médula ósea, y el genoma viral podría pasar de los progenitores monocíticos a sus células hijas en ausencia de una infección productiva hasta que su estado de diferenciación permite la reactivación del virus.

El control de la expresión de los genes IE es un mecanismo muy probable que puede mantener la latencia viral en los monocitos de sangre periférica, es de suponer que el bloqueo de la expresión de proteínas IE del CMVH puede estar involucrado con el mecanismo de mantenimiento de la latencia, como sucede en otros herpesvirus, tal es el caso de HSV y EBV, en los cuales su latencia se debe al bloqueo de la expresión de sus respectivos genes IE.

Parece ser que el mecanismo por el cual el virus se mantiene en células mieloides en un portador sano normal depende del estado de diferenciación de la célula. En los monocitos circulantes se ha sugerido que el DNA viral es transportado en ausencia de expresión de genes virales detectables, sugiriendo que estos transporten el virus en forma latente, como una infección no productiva; así cuando los monocitos se diferencian a macrófagos tisulares, el bloqueo de la expresión del gen IE es eliminado, dando lugar a la reactivación viral y una infección productiva, resultando un órgano que puede ser considerado persistentemente infectado con bajos niveles de infección productiva continua.

Con estos antecedentes parece atractivo pensar en la correlación entre la diferenciación celular y la permisividad para una infección productiva por CMVH, por lo que se hipotetiza que células indiferenciadas (como el monocito) pueden proveer un medio ambiente en el cual el virus puede persistir o permanecer en un estado de latencia con la expresión restringida de genes, y que de la diferenciación "terminal" a macrófagos resulte una señal que permita la reactivación génica y una subsecuente infección productiva; por lo cual es necesario diferenciar la línea premonocítica a macrófago para evaluar la probable reactivación viral.

7. Conclusiones.

1. La línea premonocítica U-937 es susceptible de ser infectada *in vitro* por la cepa de citomegalovirus humano AD-169.
2. El citomegalovirus humano no establece una infección persistente ni latente en la línea premonocítica U-937.
3. La infección por CMVH de monocitos U-937 es abortiva.

8. Bibliografia.

1. Ho, M. Cytomegalovirus: Biology and Infection. 2a. ed., New York: Plenum Press, 1991.
2. Chou, S. (1989). Reactivation and recombination of multiple cytomegalovirus strains from individual organ donors. *J. Infect. Dis.* **160**:11-15.
3. Eizuru, Y., Minamishima, Y., Hirose, M. (1990). Isolation of multiple cytomegalovirus strains from a patient with adult T cell leukemia. *Intervirology* **31**(6): 355-358.
4. Spector, S., Lancz, G. (1986). *Clinical virology*. 2a. ed., Elsevier, N.Y., U.S.A., pp. 540-553.
5. Sissons, J.G.P., Borysiewicz, L.K., Rodgers, B., Scott, D. (1986). Cytomegalovirus its cellular immunology and biology. *Immunol. Today* **7**(2):57-61.
6. Barnes, P.D., Grundy, J.E. (1992). Down-regulation of the class I HLA heterodimer and β 2-microglobulin on the surface of cells infected with cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **73**:2395-2403.
7. Yamashita, Y., Shimokata, K., Mizuno, S., Yamaguchi, H., Nishiyama, Y. (1993). Down-regulation of the surface expression of class I MHC antigen by human cytomegalovirus. *Virology* **193**:727-736.
8. Warren, A.P., Ducroq, D.H., Lehner, P.J., Boriysiewicz, L.K. (1994). Human cytomegalovirus-infected cells have unstable assembly of major histocompatibility complex class I complexes and are resistant to lysis by cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* **68**(5):2822-2829.
9. Fields, B.N., Knipe, D.M., et al. (1990) *Virology*. 2a ed., N.Y. U.S.A., Raven press, pp. 1787-1793.

10. Navarro, D., Paz, P., Tugizov, S., Topp, K., La Vail, J., Pereira, L. (1993). Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology* 197:143-158.
11. Wathen, M., Stinski, M. (1982). Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection. *J. Virol.* 41: (2)462-477
12. Severi, B., Landini, M.P., Cenacchi, G., Zini, N., Maraldi, N.M. (1992). Human cytomegalovirus nuclear and cytoplasmic dense bodies. *J. Arch. Virol.* 123: 193-207.
13. Stagno, S., Pass, R.F., Cloud, G., Britt, W.J., Henderson, R.E., Walton, P.D., Veren, D.A., Page, F., Alford, C.A. (1986). Primary cytomegalovirus infection in pregnancy: incidence, transmission to fetus and clinical outcome. *J.A.M.A.* 256:1904-1908.
14. Adler, S.P., McVoy, M.M. (1989). Cytomegalovirus infections in seropositive patients after transfusion. *Transfusion.* 29:667-671.
15. Chou, S. (1989). Neutralizing antibody responses to reinfecting strains of cytomegalovirus in transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 160:16-21.
16. Drew, W.L. (1988). Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 158:449-456.
17. Barry, P.A., Pratt-Lowe, E., Peterskin, B.M., Lucino, P.A. (1990). Cytomegalovirus activates transcription directed by the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type I. *J. Virol.* 64:2932-2940.
18. Adler, SP. (1990). New insights into human cytomegalovirus infections. *Prog. Med. Virol.* 37:136-155.

19. Grundy, J.E. (1990). Virologic and pathogenetic aspects of cytomegalovirus infection. *Rev. Infect. Dis.* **12**:S711-S719.
20. Kinney, J.S., Onorato, I.M, Stewart, J.A. (1985). Cytomegaloviral infection and disease. *J. Infect. Dis.* **151**(5):772-774.
21. Reynoso, E., Mohar, A., Sánchez, P., Sobrevilla, P., Verástegui, E.(1992). Prevalencia de seropositividad a citomegalovirus en pacientes con neoplasias hematológicas. *Cancerología* **38**(4):1695-1699.
22. Echániz, G., Tamayo, E., Cruz, A., Rangel, H., Hernández, P., Gatica, R., Calderón, E. (1993). Prevalencia de anticuerpos contra citomegalovirus en mujeres en edad reproductiva. *Salud Publica Mex.* **35**:20-26.
23. Minton, J., Sissons, J.G.P. (1992). Viruses, immunity to. en Roitt, I.M., Delves. P.J. *Encyclopedia of immunology*. Vol. III, Academic Press., San Diego, U.S.A., pp 1556-1559.
24. Koszinowski, U.H., Del Val, M., Reddehase, M.J. (1990). Immune response to cytomegalovirus infection. *Curr. Top. Micro. Immunol.* **154**:189-220.
25. Rasmussen, L. (1990). Immune response to human cytomegalovirus infection. *Curr. Top. Micro. Immunol.* **154**:221-254.
26. Davignon, J.L., Clément, D., Alriquet, J., Michelson, S., Davrinche, C. (1995). Analysis of the proliferative T cell response to human cytomegalovirus major immediate-early protein (IE-1): phenotype, frequency and variability. *Scand. J. Immunol.* **41**: 247-255.
27. Bruggeman, C. (1993). Cytomegalovirus and latency: an overview. *Virchows Archiv B Cell Pathology.* **64**:325-333.

28. Banks, T.A., Rouse, B.T. (1992). Herpesviruses-immune escape artists? *Clin. Infect. Dis.* 14:933-941.
29. Dutko, F. J., Oldstone, M.B.A. (1981). Cytomegalovirus causes a latent infection in undifferentiated cells and is activated by induction of cell differentiation. *J. Exp. Med.* 154:1636-1651.
30. Toorkey, C.B., Carrigan, D.R. (1989). Immunohistochemical detection of an immediate early antigen of human cytomegalovirus in normal tissues. *J. Infect. Dis.* 160: (5) 741-751.
31. Sinclair, J.H., Baillie, L.A., Bryant, J.A., Taylor-Wiedeman, J.A., Sissons, J.G.P. (1992). Repression of human cytomegalovirus major immediate early gene expression in a monocytic cell line. *J. Gen. Virol.* 73: 433-435.
32. Rice, G.P.A., Schrier, R.D., Oldstone, M.B.A. (1984). Cytomegalovirus infects lymphocytes and monocytes: virus expression is restricted to immediate-early gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6134.6138.
33. Soderberg, C., Larsson, S., Bergstedt-Lindqvist, S., Moller, E. (1993). Definition of a subset of human peripheral blood mononuclear cells that are permissive to human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 67(6):3166-3175.
34. Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J.G.P., Sinclair, J.H. (1993). Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J. Virol.* 68(3):1597-1604.
35. Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J.G.P., Borysiewicz, K., Sinclair, J.H. (1991). Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* 72:2059-2064.

36. McKeating, J.A., Griffiths, P.D., Grundy, J.E. (1987). Cytomegalovirus in urine specimens has host β -2 microglobulin bound to the viral envelope: a mechanism of evading the host immune response?. *J. Gen. Virol.* 68:785-792.
37. Keller, R., Peitchel, R., Goldman, J.N., Goldman, M. (1976). An IgG-Fc receptor induced in cytomegalovirus-infected human fibroblasts. *J. Immunol.* 116(3):772-777.
38. Stannard, L.M. (1989). β -2 microglobulin binds to the tegument of cytomegalovirus: an immunogold study. *J.Gen. Virol.* 70:2179-2184.
39. Frey, J., Einsfelder, B. (1984). Induction of surface IgG receptors in cytomegalovirus-infected human fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* 138:213-216.
40. McKeating, J.A., Griffiths, P.D., Weiss, R.A. (1990). HIV susceptibility conferred to human fibroblasts by cytomegalovirus-induced Fc receptor. *Nature* 343:659-661.
41. Chee, M.S., Satchwell, S.C., Preddie, E., Weston, K.M., Barrell, B.G. (1990). Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature* 344:774-777.
42. Gao, J-L., Murphy, P. (1994). Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional β chemokine receptor. *J. Biol. Chem.* 269(46):28539-28542.
43. Kapasi, K., Rice, G.P.A. (1986). Role of the monocyte in cytomegalovirus-mediated immunosuppression *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 154:881-884.
44. Rinaldo, C.R., Carney, W.P., Ritcher, B.S., Black, P.H., Hirsch, M.S. (1980). Mechanisms of immunosuppression in cytomegalovirus mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 141:488-495.

45. Carney, W.P., Hirsch, M.S. (1981). Mechanisms of immunosuppression in cytomegalovirus mononucleosis. II. Virus-monocyte interactions. *J. Infect. Dis.* 144(1):47-54.
46. Buchmeier, N.A., Cooper, N.R. (1989). Suppression of monocyte functions by human cytomegalovirus. *Immunology* 66:278-283.
47. Stannier, P., Taylord, D., Kitchen, A., Wales, N., Tyms, A. (1989). Persistence of cytomegalovirus in mononuclear cells in peripheral blood from blood donors. *Br. Med. J.*, 289: 897-898.
48. Oldstone, M. (1989). Viral Persistence. *Cell*, 56: 517-520.
49. Browne, H., Smith, G., Beck, S., Minson, T. (1990). A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and $\beta 2$ microglobulin. *Nature* 347:770-772.
50. Yamashita, Y., Shimokata, K., Saga, S., Mizuno, S., Tsurumi, T., Nishiyama, Y. (1994). Rapid degradation of the heavy chain of class I major histocompatibility complex antigens in the endoplasmic reticulum of human cytomegalovirus-infected cells. *J. Virol.* 68(12):7933-7943.
51. Ho, W-Z., Cherukuri, R., Ge, S-D., Cutilli, J.R., Song, L., Whitko, S., Douglas, S.D. (1993). Centrifugal enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection and human cytomegalovirus geneexpression in human primary monocyte/macrophage *in vitro*. *J. Leuk. Biol.* 53:208-212.
52. Jacob, M.C., Favre, M., Bensa, J.C. (1991). Membrane cell permeabilisation with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. *Cytometry*. 12:550-558.

53. Ibañez, C.E., Schrier, R., Ghazal, P., Wiley, C., Nelson, J. (1991). Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J. Virol.* **65**(12):6581-6588.
54. Jones, T.R., Hanson, L.K., Sun, L., Slater, J.S., Stenberg, R.M., Campbell, A.E. (1995). Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J. Virol.* **69**(8):4830-4841.
55. Waldman, W.J., Knight, D.A., Huang, E.H., Sedmak, D.D. (1995). Bidirectional transmission of infectious cytomegalovirus between monocytes and vascular endothelial cells: an *in vitro* model. *J. Infect. Dis.* **171**:263-272.
56. Scott, D.M., Rodgers, B.C., Freeke, C., Buitter, J., Sissons, P. (1989). Human cytomegalovirus and monocytes: limited infection and negligible immunosuppression in normal mononuclear cells infected *in vitro* with mycoplasma-free virus strains. *J. Gen. Virol.* **70**:685-694.
57. Schrier, R.D., Nelson, J.A., Oldstone, M.B. (1985). Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. *Science* **230**: 1048-1051.
58. Minton, E.J., Tysoe, C., Sinclair, J.H., Sissons, J.G.P. (1994). Human cytomegalovirus infection of the monocyte /macrophage lineage in bone marrow. *J. Virol.* **68**(6):4017-4021.
59. Sánchez Cruz, P. (1996). Modulación de la expresión de moléculas del MHC en la infección por citomegalovirus humano, Tesis de Maestría. E.N.C.B. I.P.N.

60. Compton, T., Nowlin, D.M., Cooper, N.R. (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**: 834-841.
61. Wright, J.F., Kurosky, A., Pryzdial, E.L.G., Wasi, S. (1995). Host cellular annexin II is associated with cytomegalovirus particles isolated from cultured human fibroblasts. *J. Virol.* **69**:(8) 4784-4791.
62. Sánchez, P., Pelayo, R. (1996). Múltiples estrategias de evasión de la respuesta inmune por citomegalovirus humano: Mecanismos moleculares. *LABORAT-acta.* **8**:(3) 65-73.
63. Kapasi, K., Rice, G.P.A. (1988). Cytomegalovirus infection of peripheral blood mononuclear cells: effects on interleukin-1 and -2 production and responsiveness. *J. Virol.* **62**:3603-3607.
64. Michelson, S., Alcamí, J., Danielpour, D., Bachelierie, F., Picard, L., Bessia, C., Paya, C., Virelizier, J. (1994). Human cytomegalovirus infection induces transcription and secretion of transforming growth factor β 1. *J. Virol.* **68**(9):5730-5737.
65. Harlow, E., Lane, D. (1988), *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory., N.Y., U.S.A p:274-7, 298-9, 309, 636-8.
66. Jacoby. W.B., Pastan, I.H. (1979). *Cell Culture.* Academic. Press, San Diego, Cal. U.S.A. p:119-221.
67. Coligan, J.E., Kruisbeck, A.M. and Margulies D.H. (1992). *Current Protocols in Immunology.* John Wiley & Sons, N.Y. U.S.A. p: 2.7.2-5 ; 8.4.2-4.
68. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory Press., N.Y., U.S.A p:6.3-6.20, 6.36-6.44, 14.5-14.28.

69. Brytting, M., Sundqvist, V., Stalhandske, P., Linde, A., and Wahren, B. (1991). Cytomegalovirus DNA detection of an immediate early protein gen with nested primer oligonucleotides. *J. Virol. Methods*, **32**: 127-138.
70. Wentworth, B., French, L. (1970). Plaque assay of Cytomegalovirus strains of human origin. *P.S.E.B.M.*, **135**: 253-258.
71. Sinclair, J., Sissons, P. (1996). Latent and persistent Infections of monocytes and macrophages. *Intervirology* , **39**:293-301.
72. Gibson, W. (1996). Structure and assembly of the virion. *Intervirology* , **39**:389-400.
73. Britt, W., Mach, M. (1996). Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* , **39**:401-412.
74. Roitt, I.M; Delves, P.J; *Encyclopedia of Immunology*. Vols 1-3 Academic Press 1992 Londres.
75. Fields,B.N; Knipe, D.M; et al. (1995) *Virology* 3rd. Ed. N.Y. U.S.A. Raven Press pp 1789-1793.
76. Plachter, B; Sinzger, C; Jahn, G; (1996) Cell types involed in replication and distribution of Human Cytomegalovirus. *Advances in virus research*, **46**:195-261.
77. Henderson, S; Huen,D; Rowe, M; Dawson, C; Johnson, G; Rickinson, A; (1993). Epstein Barr virus-coded BHRF-1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:8479-8483.