PROTOCOLO PARA INFECCIÓN DE CÉLULAS EA.HY926 POR DISTINTAS CEPAS DE CITOMEGALOVIRUS HUMANO Y DETERMINACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO DE LATENCIA

Maria Alejandra Florez Baquero

UNIVERSIDAD EL BOSQUE

PROGRAMA DE PATOLOGÍA ORAL Y MEDIOS DIAGNÓSTICOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

BOGOTÁ DC.- AGOSTO 2020

HOJA DE IDENTIFICACION

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Patología oral y medios diagnósticos
Título:	Protocolo para infección de células EA.hy926 por distintas cepas de citomegalovirus humano y determinación del establecimiento de latencia
Grupo de Investigación:	Virología
Línea de investigación:	Patogénesis viral
Tipo de investigación:	Posgrado /grupo
Residentes:	Maria Alejandra Florez Baquero
Director:	Dra. Sonia del Pilar Bohórquez Ávila
Asesor metodológico:	Dra. Sandra Patricia Castaño Duque

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

TIANA CIAN LEAL	Presidente del Claustro
CAMILO ALBERTO ESCOBAR JIMÉNEZ	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
CRISTINA MATIZ MEJÍA	Secretaria General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ	Directora Área Bioclínica
ALEJANDRO PERDOMO RUBIO	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA MANRIQUE	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología
YENNY MARITZA GARCIA TARAZONA	Director(a)Programa de Patología oral y medios diagnósticos

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen
Abstract

	Pág.
1. Introducción	**1**
2. Marco teórico	**4**
3. Planteamiento del problema	**13**
4. Justificación	**14**
5. Situación Actual	**15**
6. Objetivos	**17**
7. Metodología del Proyecto	**18**
7.1. Tipo de estudio	**18**
7.2. Población y muestra	**18**
7.3. Materiales y métodos	**18**
8. Consideraciones éticas	**22**
9. Resultados	**23**
10. Discusión	**24**
11. Conclusiones	**27**
12. Referencias bibliográficas	**28**

LISTADO DE FIGURAS

		Págs.
Figura 1	**Procedimiento de descongelación de células EA.hy926.** Diseñada por Maria Alejandra Florez.	**18**
Figura 2	**Procedimiento de disociación enzimática de las células y siembra en botella T-75.** Diseñada por Maria Alejandra Florez.	**19**
Figura 3	**Procedimiento de infección de células EA.hy926**. Diseñada por Maria Alejandra Florez.	**20**
Figura 4	**Experimento de infección en caja de 12 pozos.** Diseñada por Maria Alejandra Florez.	**20**
Figura 5	**Procedimiento de electroforesis en gel de agarosa.** Diseñada por Maria Alejandra Florez.	**21**

RESUMEN

PROTOCOLO PARA INFECCIÓN DE CÉLULAS EA.HY926 POR DISTINTAS CEPAS DE CITOMEGALOVIRUS HUMANO Y DETERMINACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO DE LATENCIA

Antecedentes: La infección *in vivo* de células endoteliales por citomegalovirus tiene un papel fundamental en el desarrollo de patologías asociadas con este virus; permite la replicación viral, el establecimiento de latencia y facilita el paso del virus desde la sangre a los tejidos. Los estudios que evalúan la latencia se realizan en cultivos primarios y no en líneas celulares como EA.hy926 y normalmente se emplean cepas de laboratorio.
Objetivo: Estandarizar un protocolo de cultivo e infección de células Eahy926 con cepas de HCMV y determinar el establecimiento de latencia.
Metodología: Las células EA.hy926 se cultivaron en DMEM + SFB al 10% + antibiótico - antimicótico al 2%, se incubaron en una atmósfera de CO2 al 5% y 37ºC. Estas células se tomaron en pasaje doce. Cuando alcanzaron una confluencia del 90%, se sembraron en placas de 12 pozos, 60,000 por pozo. Después de 24 horas, se infectaron con Towne y un aislado clínico con un MOI de 0.1 y 0.5. Se centrifugaron a 337*g* durante 30 minutos a 25 ° C, se incubaron durante 2 horas a 37 ° C. Se retiró el inóculo y se adicionó medio fresco. Las células fueron evaluadas a las 24, 48, 72 y 96 horas postinfección.
Resultados: El establecimiento de infección de Towne se detectó por PCR a un MOI de 0.1 a las 48 y 96 horas posinfección. Se observó efecto citopático a un MOI de 0,5 a las 48, 72 y 96 horas posinfección. No se observó efecto citopático en las células infectadas con el aislado clínico en los tiempos evaluados. La latencia se puede determinar mediante RT-PCR para los genes UL138, UL111A, UL81-UL82, US28 o por inmunofluorescencia indirecta para la proteína UL138 o para IE1 /2 que no se debe detectar si se establece latencia.
Conclusiones: El modelo de infección en células EA.hy926 es una buena alternativa para el estudio de infección latente en células endoteliales y es una opción segura y económica.
La infección lítica por Towne se puede detectar en las células EAhy926, con los MOI y tiempos evaluados. El mismo resultado no se observó con el aislado clínico.

Palabras claves: citomegalovirus, células endoteliales, latencia

ABSTRACT

PROTOCOL FOR EA.HY926 CELLS INFECTION WITH DIFFERENT STRAINS OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS AND DETERMINATION OF THE ESTABLISHMENT OF LATENCY

Background: In-vivo infection of endothelial cells by cytomegalovirus has a fundamental role in the development of pathologies associated with this virus. It allows viral replication, the establishment of latency and facilitates the passage of the virus from the blood to the tissues. Studies evaluating latency are performed in primary cultures and not in cell lines such as EA.hy926, and laboratory strains are normally used.
Objective: To standardize a culture and a protocol for EA.hy926 cells infection with HCMV strains and determine the establishment of latency.
Methods: EA.hy926 cells were grown in DMEM + 10% SFB + 2% antibiotic-antimycotic solution. Cells were incubated at a 5% CO2 atmosphere and 37ºC. These cells were taken in passage twelve. After reaching 90% confluence, cells were plated in 12-well plates, 60,000 per well. 24 hours later, they were infected with Towne strain and clinically isolated with MOI of 0.1 and 0.5. They were centrifuged at 337*g* for 30 minutes at 25°C, and incubated for 2 hours at 37°C. The inoculum was removed and fresh medium was added. The cells were evaluated at 24, 48, 72 and 96 hours post infection.
Results: The establishment of infection by Towne strain was detected by PCR at MOI of 0.1, 48 and 96 hours post infection. Cytopathic effect was observed at MOI of 0.5, 48, 72 and 96 hours post infection. No cytopathic effect was observed in cells infected with the clinical isolate at the evaluated times. Latency can be determined by RT-PCR for the following genes: UL138, UL111A, UL81-UL82, US28; or by indirect immunofluorescence for UL138 protein or for IE1/2, which should not be detected if latency is established.
Conclusions: The EA.hy926 cell infection model is a good alternative for the study of latent infection in endothelial cells, and is a safe and economical option.
Lytic infection with Towne strain can be detected in EA.hy926 cells with MOIs and times evaluated. The same result was not observed with the clinical isolate.

Keywords: cytomegalovirus, endothelial cells, latency

1. Introducción

El citomegalovirus humano (HCMV) es un virus ubicuo altamente prevalente alrededor del mundo siendo más frecuente en países subdesarrollados. La infección primaria usualmente ocurre en la infancia y es asintomática o genera muy pocos síntomas, después de la primoinfección citomegalovirus establece latencia de por vida (Griffiths et al., 2015; Calderaro et al., 2016).

La capacidad de citomegalovirus para establecer latencia es una de las características más importantes de este virus; las células en las que se reconoce el establecimiento de latencia son las CD34+ de médula ósea, principalmente. También los monocitos CD14+ de sangre periférica y células endoteliales (Jarvis & Nelson, 2002; Reeves et al., 2004; Goodrum, 2016).

A partir de las células CD34+ de médula ósea el virus pasa a las células del linaje mieloide y se encuentra en sangre periférica en los monocitos; cuando estas células se activan y diferencian a macrófagos puede ocurrir la replicación viral y diseminación a diferentes órganos y tejidos. Esto al parecer explica la gran variedad de complicaciones asociadas a la reactivación viral (Goodrum, 2016). Igualmente, en un hospedero infectado puede ocurrir reinfección con una cepa diferente.

Se debe resaltar que la reactivación viral puede ser asintomática y se puede detectar en la saliva, orina y otros fluidos corporales por un mecanismo conocido como descarga viral asintomática; estas descargas virales son la vía más importante de transmisión (Cannon et al., 2011; Sanbonmatsu et al., 2014; Bohórquez et al., 2016).

En individuos inmunosuprimidos, citomegalovirus es el principal agente viral asociado con complicaciones como neumonía, hepatitis, gastroenteritis, retinitis, fracaso del trasplante y enfermedad injerto contra hospedero. Por lo mismo, HCMV es un factor importante que puede afectar el pronóstico de los trasplantes de órganos sólidos y de precursores hematopoyéticos (Griffiths et al., 2015). En mujeres embarazadas, citomegalovirus es la causa principal de infecciones congénitas produciendo anormalidades en el neurodesarrollo, retraso en el crecimiento intrauterino, hepatoesplenomegalia, ictericia neonatal, púrpura, corioretinitis y sordera neurosensorial (Sanbonmatsu et al., 2014).

Citomegalovirus presenta un tropismo celular amplio; como ya se dijo, infectas células precursoras hematopoyéticas de la médula ósea, monocitos de sangre periférica, fibroblastos, hepatocitos, células epiteliales, neuronas y células endoteliales (Collins-McMillen et al., 2018). En estas últimas se han detectado antígenos de citomegalovirus y secuencias de ácidos nucleicos *in vivo*, se ha demostrado que soportan el ciclo viral completo y se ha observado *in vitro* que puede ocurrir infección productiva (Ricotta et al., 2001).

Cuando se produce una infección lítica en células endoteliales se puede desencadenar una lesión vascular directa por replicación viral. También se ha demostrado un aumento en la producción de moléculas de adhesión, interleucina 6, factor de crecimiento transformante β y quimiocinas, que conlleva a la activación de linfocitos T que provocan daño endotelial (Lebedeva et al., 2018). Por esta razón se ha asociado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como: ateroesclerosis, esclerosis vascular del trasplante, tromboembolismo venoso, entre otras (Ji et al., 2012; Jia et al., 2017; Ceccarelli et al., 2018). Además, las células endoteliales actúan como reservorios de virus en latencia desde los cuales este puede diseminarse a diferentes órganos donde se pueden presentar las complicaciones anteriormente mencionadas.

Aunque se ha reportado persistencia y latencia de HCMV en células endoteliales (Jarvis & Nelson, 2002; Reeves et al., 2004), no se ha reportado en la literatura, si el establecimiento de latencia es variable dependiendo la cepa de citomegalovirus y del tipo de células endoteliales que se afecten. Los sistemas *in vitro* han sido de gran importancia para el estudio de la latencia de HCMV, ya que el número de células que contienen virus latentes en el huésped infectado es muy bajo (entre 1: 10,000 a 1: 100,000 células con genomas virales) (Larsson et al, 1998) y actualmente no hay manera de identificar estas células en el huésped (Collins-McMillen et al., 2018). Las células que albergan virus en latencia pueden identificarse con técnicas de biología molecular como PCR, inmunofluorescencia indirecta o; western blot.

Los cultivos celulares primarios de células endoteliales son costosos y difíciles de mantener. Por esta razón, se requiere evaluar el establecimiento de latencia en líneas celulares endoteliales que mantengan las características de las células primarias pero que permitan un mayor número de pasajes y que su mantenimiento sea más económico. Sin embargo, hasta el

momento no se ha establecido un protocolo de cultivo e infección para líneas celulares endoteliales que permita el estudio in vitro de una infección latente. En este trabajo se propuso estandarizar un protocolo de cultivo e infección de células Eahy926 con cepas de citomegalovirus humano y determinar el establecimiento de latencia.

2. Marco teórico

Epidemiología de la infección por citomegalovirus

La prevalencia de infección por citomegalovirus varía entre el 40-99% alrededor del mundo presentando mayor seroprevalencia en América del sur, África y Asia y menor seroprevalencia en Europa occidental y Estados Unidos (Cannon et al., 2010). Las diferencias en estos datos pueden estar determinadas por variaciones geográficas, etnia, sexo y nivel socioeconómico, se ha reportado mayor riesgo de adquirir más tempranamente la infección por citomegalovirus en personas que se encuentran en condiciones socioeconómicas desfavorables (Cannon et al., 2010; Cannon et al., 2011; Griffiths et al., 2015).

En Colombia la mayoría de los estudios realizados para determinar la prevalencia de infección por citomegalovirus se han llevado a cabo en receptores y donantes de trasplante renal, se determinó que la mayor parte de las infecciones por citomegalovirus se presentan durante la infancia y el riesgo de infección en adultos se reportó en menos del 10%.

Entre los años 1986 y 1989, en la ciudad de Medellín, se evaluó la infección por citomegalovirus en 598 candidatos a trasplante, siendo 548 (91.7%) positivos. En el mismo trabajo se evaluaron 225 donantes intrafamiliares, siendo positivos el 86.7%; además, se realizó la comparación con una muestra de 105 individuos sanos, como control, con una positividad para HCMV del 74.3%. En conclusión, se observó una mayor prevalencia en los receptores de trasplante (Ossa et al., 1988; Correa et al., 1989).

Asimismo, en el año 2007 se llevó a cabo la evaluación de 189 receptores de trasplante renal, encontrando que 91.3% tenían infección previa al trasplante y que el 87% de los donantes cadavéricos eran positivos para IgG anti HCMV (López, 2015). Lo que explica que el riesgo en adultos con trasplante es la infección previa del paciente o del donante de órganos.

De igual manera Arias-Murillo et al., (2016) estudiaron la seroprevalencia en pacientes de trasplante renal entre 2010 y 2014, evaluaron 1813 donantes y 3313 receptores; siendo positivos para IgG 1562 donantes (86.2%) y 3016 (91%) trasplantados; determinaron la

edad como una variable asociada a una mayor prevalencia de anticuerpos IgG tanto en donantes como en receptores de trasplante renal.

Por otra parte, Salamanca-Rojas et al (2018) evaluaron 154 muestras de suero de mujeres en edad fértil entre 16 y 40 años, con el fin de evaluar el riesgo de infección congénita. La seropositividad IgG anti-citomegalovirus fue de 90,9%.
Lanzieri et al (2014) evaluaron infecciones congénitas por HCMV en los EE. UU, concluyeron que solo el 25% de los casos de citomegalovirus encontrados al nacer se debió a una infección materna primaria durante el embarazo, lo que resalta la importancia de comprender el impacto de las infecciones no primarias, es decir, reinfección y reactivación por latencia en madres seropositivas.

Ciclo viral

Citomegalovirus es un betaherpesvirus caracterizado por una replicación lenta y un tropismo amplio para los tipos de células que es capaz de infectar dentro del hospedador (Goodrum, 2016). El HCMV tiene un genoma de ADN bicatenario de aproximadamente 230 kilopares de bases, que codifica posiblemente hasta 751 proteínas, así como muchos ARN pequeños y largos no codificantes (Goodrum, 2016). Su genoma se compone de los dominios *"unique long"* (UL) y *"unique short"* (US), que están flanqueados en un extremo por secuencias repetidas terminales (TRL y TRS) y en el otro por secuencias repetidas internas (IRL e IRS), estas regiones contienen casi todos los genes de citomegalovirus. (Murphy et al.,2003; Sanbonmatsu et al., 2014).

El ciclo viral del citomegalovirus se puede dividir en tres fases: infección lítica, infección latente y reactivación. La infección primaria con HCMV produce una infección lítica generalmente leve o asintomática en individuos inmunocompetentes, caracterizada por una alta expresión génica viral y la producción de viriones infecciosos, la mayoría de estos viriones son eliminados por el sistema inmune del huésped, sin embargo, algunos permanecen estableciendo una infección latente de por vida. En la fase de latencia, el genoma viral está presente y se mantiene dentro de la célula huésped sin producción de viriones infecciosos, pero el virus mantiene la capacidad de reactivarse desde la latencia para producir

nuevos viriones; estas reactivaciones ocurren esporádicamente y son controladas por el sistema inmune de un huésped inmunocompetente (Slobedman, 2010).

En primer lugar, la glicoproteína gB de la envoltura permite la unión inicial a la célula, se ha demostrado que gB interacciona con una serie de receptores celulares, incluido EGF-R, PDGF-Rα e integrinas (α2β1, α6β1 y αvβ3) (Griffiths et al., 2015). Además, el complejo de glicoproteínas gM-gN interacciona con proteoglicanos como heparán sulfato. Conjuntamente la formación del trímero gH-gL-gO esencial para la entrada en todos los tipos celulares, es importante para desencadenar la fusión de gB con la membrana plasmática (Nguyen & Kamil, 2018).

Después del ingreso del virus en la célula por fusión de membranas se liberan la nucleocápside y las proteínas del tegumento en el citosol, posteriormente la cápside se dirige hacia el núcleo donde se libera el ADN viral. La expresión génica inicia con la expresión de los genes inmediatamente tempranos mediante la síntesis de las proteínas α implicadas en el ciclo lítico, seguido de la expresión de los genes tempranos que codifican para las proteínas β y finalmente la expresión de los genes tardíos que codifican para las proteínas γ estructurales (Sanbonmatsu et al., 2014; Griffiths et al., 2015). La expresión de los genes tardíos inicia el ensamblaje de la cápside en el núcleo, seguido de la salida de esta al citosol. A continuación, la cápside se asocia con las proteínas del tegumento en el citosol para finalmente ser liberadas las partículas infecciosas (viriones) junto con cuerpos densos no infecciosos (Jean Beltran & Cristea, 2014).

Transmisión

Citomegalovirus puede ser transmitido a través de una variedad de vías como el contacto con fluidos corporales de personas infectadas con descargas virales asintomáticas, transmisión vertical de madre a hijo, la actividad sexual, transfusión de sangre y el trasplante de órganos (Cannon et al., 2011).

Las descargas virales asintomáticas se definen como la presencia de viriones en las secreciones de individuos infectados que no presentan signos ni síntomas, ocurren en fluidos corporales como la saliva, orina, leche materna, lágrimas y semen (Cannon et al., 2011; Bohórquez et al., 2016; Collins-McMillen et al., 2018)

La transmisión vertical puede ser transplacentaria desde una madre con una infección nueva o recientemente adquirida, durante el paso por el canal de parto y por la leche materna, esta última es la forma de transmisión más común en el primer año de vida (Boppana & Fowler, 2007).

En adultos puede ocurrir transmisión por contacto sexual y por último la trasmisión iatrogénica se da como resultado de transfusiones o por trasplantes (Boppana & Fowler, 2007; Cannon et al., 2011).

Tropismo

En un sentido amplio el tropismo celular se refiere a la afinidad de un virus por tipos específicos de células y especies (Sinzger et al., 2008). El citomegalovirus tiene tropismo por gran variedad de células como leucocitos (polimorfonucleares y monocitos/macrófagos), células epiteliales de glándulas y tejido mucoso, células de músculo liso principalmente en el tracto gastrointestinal, fibroblastos, células dendríticas, hepatocitos y células endoteliales *in vivo* (Jean Beltran & Cristea, 2014).

Existe una discrepancia entre el tropismo celular *in vivo* y en cultivos celulares, esto se debe a que algunas cepas han perdido tropismo por células epiteliales y endoteliales *in vitro* (Sinzger et al., 2008).

Como se ha explicado previamente, en el caso de citomegalovirus, este tropismo por tipos celulares tan variados se debe al repertorio amplio de receptores celulares que son reconocidos por las proteínas de la envoltura viral.

Se ha propuesto el rol que cumplen cada uno de los tipos celulares infectados por citomegalovirus, por ejemplo:

- Células epiteliales: son el principal blanco de infección por citomegalovirus, lo más probable es que el HCMV ingrese a un hospedero infectando el epitelio de la mucosa. Por otro lado, estas células infectadas pueden contribuir en la transmisión del virus mediante descargas virales presentes en diferentes fluidos corporales (saliva, orina y heces) (Sinzger et al., 2008).

- Células dendríticas: desempeñan diversos papeles en la patogénesis de las infecciones por HCMV que pueden ser provirales o antivirales. Por un lado, estas células fagocíticas pueden permitir la replicación viral y la liberación de viriones infecciosos. Por otro lado, la absorción endocítica de estas células puede conducir al procesamiento de proteínas virales y presentación de epítopos virales por medio del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II, desencadenando una respuesta inmune del hospedero (Sinzger et al., 2008).

- Fibroblastos: son uno de los principales blancos de HCMV *in vivo*. Las células infectadas del tejido conectivo contribuyen a la diseminación eficiente de citomegalovirus en diferentes órganos como las glándulas suprarrenales, la médula ósea, corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas, placenta, intestino delgado y bazo. En cultivo celular los fibroblastos son células permisivas para la replicación viral, por lo que suelen emplearse líneas celulares fibroblásticas para su propagación (Sinzger et al., 2008).

- Células musculares lisas: son susceptibles a la infección lítica por HCMV; la replicación lítica en el tracto gastrointestinal puede provocar ulceración y perforación. La infección de las células vasculares del músculo liso puede contribuir al desarrollo de vasculopatías inflamatorias (Sinzger et al., 2008).

- Leucocitos: permiten la propagación hematógena del virus ya sea por ser blanco de infección permisiva o por transporte pasivo de partículas infecciosas, esto último se aplica a las células polimorfonucleares, que pueden ser infectadas por HCMV y expresan proteínas virales pero no admiten la replicación completa. En cuanto a los monocitos, estos permiten una infección lítica y latente (Sinzger et al., 2008).

- Células endoteliales: permiten la propagación del virus por vía hematógena ya que son susceptibles a infección lítica . También se establece infección latente por HCMV en los sitios de microvasculatura. Posteriormente se generan reactivaciones donde es detectable el ADN viral asociadas con la diseminación del virus (Reeves et al., 2004).

Latencia

La latencia representa la persistencia del genoma viral, sin replicación pero con síntesis de algunas proteínas virales. El hospedero humano no es infeccioso, pero el genoma del virus se mantiene durante toda la vida (Reddehase & Lemmermann, 2019).

Las células CD34+ de médula ósea son el principal reservorio de latencia de citomegalovirus; el genoma viral pasa a las células del linaje mieloide y se encuentra en los monocitos de sangre periférica. Plachter y colaboradores encontraron que la cepa AD169 establece latencia en células CD34+ y se mantiene por al menos 11 días, para después reactivarse completamente a una infección productiva (Klingel et al., 2015).

El mantenimiento a largo plazo de la latencia y la reactivación posterior parecen estar controlados en gran parte por funciones celulares inherentes para el control de la expresión génica. Uno de los eventos clave es la inhibición de la expresión génica viral a través de la represión del promotor principal temprano inmediato (MIEP). Se argumenta que el mecanismo de represión es un conjunto de efectos de un entorno celular que inhibe la actividad de MIEP junto con un fallo de la proteína pp71(Reeves & Sinclair, 2008; Griffiths et al., 2015).

La supresión de la expresión de las proteínas inmediatamente tempranas también es un evento importante para el establecimiento de latencia. La ausencia de IE1 /IE72 e IE2 /IE86 durante la latencia es común en todos los estudios de células infectadas de forma latente, tanto en modelos *ex vivo* como en modelos *in vitro* (Elder & Sinclair, 2019).

En modelos experimentales de latencia se han identificado transcritos asociados a latencia como, UL111.5A que codifica un homólogo viral de IL-10 (LavIL-10). Esta citoquina inhibe la respuesta inmune y se sugiere que la expresión de un homólogo de IL-10 puede ayudar a evitar inmunovigilancia del huésped durante la latencia (Sinclair & Sissons, 2006).

Además, se han identificado otros transcritos como UL81-UL82, el promotor de este se asocia con la acetilación de la histona H4, que es consistente con la transcripción de LUNA en células infectadas de forma latente. Otros transcritos son UL138 y US28, este último no solo se transcribe en latencia sino también en infección lítica (Sinclair & Sissons, 2006).

La proteína viral UL138 está implicada en el establecimiento y mantenimiento de latencia y solo se expresa cuando el virus se encuentra en estado de latencia; siendo un buen marcador para evaluar una infección latente (Sinclair & Sissons, 2006).

El gen US28 es esencial para mantener la latencia de HCMV en células progenitoras CD34+ y monocitos CD14+, ya que en estas células durante la replicación de HCMV US28 actúa como un receptor homólogo de quimiocinas uniéndose a CXXXC y CC. Si no hay expresión del receptor en la membrana se produce una infección lítica.

Infección por citomegalovirus en células endoteliales

Citomegalovirus tiene un tropismo marcado por células endoteliales *in vivo*; se ha atribuido el daño vascular como manifestación de la infección (Sinzger et al., 2008). Por esta razón, se ha involucrado en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como ateroesclerosis, estenosis coronaria, esclerosis vascular del trasplante, tromboembolismo venoso, entre otras (Bentz et al., 2008; Ceccarelli et al., 2018).

Diversos estudios han detectado células endoteliales microvasculares infectadas con HCMV en varios órganos, por ejemplo, cerebro, pulmón, hígado, riñón y el tracto gastrointestinal. Estas pueden promover la diseminación hematógena del HCMV desde la sangre circulante hacia diferentes tejidos, a menudo acompañados de una respuesta vascular alrededor de las paredes de los vasos infectados (Sinzger et al., 2008).

Por otro lado, se ha reportado que las células endoteliales macrovasculares también son susceptibles a la infección lítica por HCMV (Kahl et al. 2000). El daño combinado de la capa endotelial y el músculo liso subyacente puede iniciar la cascada de reacciones de defensa que finalmente resulta en lesión vascular (Sinzger et al., 2008).

Durante la infección lítica por citomegalovirus en las células endoteliales, se puede desencadenar una lesión vascular directa por la replicación viral, secundaria a cambios en la proliferación de las células endoteliales, o por aumento en la migración transendotelial de monocitos (Van De Berg et al., 2012).

De la misma forma, la respuesta del hospedero al HCMV promueve el desarrollo de aterosclerosis asociado con en el incremento en la liberación de mediadores inflamatorios,

citoquinas, quimiocinas, mayor expresión de moléculas de adhesión y aumento del estrés oxidativo. Sin embargo, todavía no es claro el mecanismo específico (Jia et al., 2017).

El tropismo por células endoteliales está mediado por más de un gen viral. La existencia de múltiples genes que dirigen el tropismo por células endoteliales está respaldada por la observación de coinfección de células endoteliales con dos cepas no endoteliotrópicas diferentes del virus, dando lugar a la creación de un virus recombinante endoteliotrópico. Este resultado podría explicarse por dos mutaciones presentes en el mismo gen que ha sido reparado por el evento de recombinación. Sin embargo, el escenario más probable es que durante este proceso se combinaron locus genéticos distintos requeridos para el tropismo por células endoteliales dentro del mismo genoma recombinante (Jarvis & Nelson, 2002). Por ejemplo, el locus UL128 – UL131 es requerido para la infección de leucocitos, células dendríticas, células epiteliales y células endoteliales (Nguyen & Kamil, 2018).

La formación del complejo pentamérico entre el dímero gH-gL con las proteínas virales UL128, UL130 y UL131 es requerido para la entrada eficiente del virus en células endoteliales y epiteliales (Lilleri et al., 2017; Campanini et al., 2004). El virus puede transmitirse de manera bidireccional entre las células endoteliales y los leucocitos en la infección primaria y también en las reactivaciones, este evento parece estar mediado por microfusión transitoria de las membranas plasmáticas causado por la infección viral (Gerna et al., 2002).

Finalmente, las células endoteliales son compatibles con una infección latente y persistente que puede provocar la eliminación de virus a bajos niveles durante meses o años dificultando su detección (Goodrum, 2016).

Células EA.hy926

Las células EA.hy926 son una línea celular permanente, resultante de un hibrido entre las células HUVEC (células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano) y las células A549 (carcinoma de pulmón) (Lotfi et al., 2016). Estas células mantienen las características fenotípicas de las HUVEC con un mayor número de pasajes, por lo cual son consideradas un buen modelo de estudio de células endoteliales (Ahn et al., 1995; Lotfi et al., 2016).

Lofti y colaboradores (2016) reportaron que las células EA.hy926 son susceptibles a infección por cepas endoteliotrópicas como TB40/E pero no para cepas poco endoteliotrópicas como TB40/F y Towne. Además, parece que no se genera el ciclo viral completo, sino que se detiene tempranamente al establecerse latencia.

Cepas citomegalovirus

El tropismo por células endoteliales y por leucocitos (polimorfonucleares y monocitos) son dos propiedades biológicas importantes compartidas por los aislados clínicos de citomegalovirus. Estas propiedades se pierden durante los pasajes en fibroblastos, como lo demuestran las cepas AD169 y Towne adaptadas al laboratorio (Gerna et al., 2003).

Las cepas de HCMV más empleadas para estudios *in vitro* son AD169 y Towne; estas han perdido su endoteliotropismo por mutaciones genéticas que se han presentado gracias a los múltiples pasajes en cultivos de fibroblastos (Gerna et al., 2019).

La cepa Towne ha sido utilizada en cultivos de fibroblastos de prepucio y piel y la línea celular de fibroblastos de pulmón embrionario (MRC-5). El hecho de que estas líneas celulares sean las que normalmente se emplean en la propagación viral in vitro, ha facilitado el desarrollo de las alteraciones genéticas que llevan a la pérdida del endoteliotropismo. Lofti y colaboradores (2016) no reportan que esta cepa produzca infección lítica en células endoteliales. Sin embargo, se ha reportado que, esta cepa que carece de endoteliotropismo y leucotropismo puede volver a adquirirlo después de múltiples pasajes en células endoteliales como HUVEC (Gerna et al., 2003).

Se ha demostrado que la cepa Toledo, a pesar de no ser altamente pasajeada en cultivo celular, carece de tropismo por células endoteliales y leucocitos (al igual que las cepas de HCMV adaptadas al laboratorio (Gerna et al., 2019). Por otro lado, la cepa Merlin ha tenido dos o tres pasajes manteniendo su tropismo por células endoteliales.

Sin embargo, se han descrito modificaciones genómicas respecto a cepas salvajes, por lo que se debe considerar que ninguna de estas cepas está genéticamente intacta y se sugiere el uso de cepas encontradas en aislamientos clínicos pero que no hayan sido pasajeadas en cultivos de fibroblastos.

3. Planteamiento del problema

La latencia es una de las características más importantes de los virus de la familia Herpesviridae y en cuanto a citomegalovirus, se ha evaluado en múltiples estudios cuáles células podrían estar implicadas en el establecimiento de esta. Entre estas destacan las células endoteliales, monocitos/macrófagos, células del músculo liso y células dendríticas (Jarvis & Nelson, 2002; Reeves et al., 2004; Goodrum, 2016).

La replicación *in vitro* de HCMV en células endoteliales está influenciada por la cepa, no todas son capaces de infectar células endoteliales y producir infección lítica; las cepas no endoteliotrópicas como Towne, AD169, TB40/F no producen una infección productiva en células endoteliales. Por otro lado, las cepas endoteliotrópicas si son capaces de infectar las células endoteliales y completar el ciclo de replicación viral. Esto sugiere que hay genes específicos requeridos para la infección y replicación en esta línea celular (Jarvis & Nelson, 2002; Kahl et al., 2000).

Las cepas normalmente utilizadas en laboratorio presentan mutaciones en su genoma asociadas con la perdida de tropismo por células endoteliales debido a los múltiples pasajes en cultivo. Por otra parte, no es claro si el desarrollo de latencia este determinado también por las cepas virales.

No existen estudios que evalúen la infección por citomegalovirus en células endoteliales utilizando aislados clínicos. Estas cepas salvajes podrían presentar diferencias en cuanto a la infección lítica y el establecimiento de latencia comparado con las cepas de laboratorio. Por lo cual, un estudio necesario, será aquel que evalúe el comportamiento de aislados clínicos.

El estudio del establecimiento de latencia de HCMV en las células endoteliales es importante ya que estas actúan como reservorios que al reactivarse la infección contribuyen a la diseminación del virus. Se requieren estudios que evalúen la infección y latencia de citomegalovirus en células endoteliales, utilizando aislados clínicos y en líneas celulares que permitan un mantenimiento fácil y de bajo costo.

4. Justificación

La infección por HCMV es altamente prevalente y es uno de los principales agentes causante de complicaciones en pacientes inmunosuprimidos a nivel mundial (Reeves et al., 2004; Griffiths et al., 2015;). La mayoría de los individuos adquiere la infección en los primeros años y citomegalovirus establece latencia de por vida (Delwart, 2007; Griffiths et al., 2015).

Las células endoteliales actúan como reservorios de citomegalovirus y parecen tener un rol importante en la diseminación por vía hematógena; en diversos estudios se ha encontrado que las células endoteliales con infección productiva pueden encontrarse circulando en el flujo sanguíneo (Fields et al., 2001; Lilleri et al., 2017).

Los estudios *in vitro* de infección por citomegalovirus en células endoteliales se realizan con cultivos primarios a pesar de que el mantenimiento de estas células es costoso y su manipulación requiere experticia. Usualmente se utilizan las cepas AD169, Towne y TB40/E para evaluar la infección en los cultivos primarios de células endoteliales. No se conocen hasta el momento estudios que evalúen la infección de células endoteliales utilizando aislamientos clínicos.

Los cultivos celulares primarios de células endoteliales son costosos y difíciles de mantener. Por esta razón, se requiere evaluar el establecimiento de latencia en líneas celulares endoteliales como EA.hy926 que mantengan las características de las células primarias pero que permitan un mayor número de pasajes y que su mantenimiento sea más económico. Se requiere estandarizar un protocolo de cultivo e infección para líneas celulares endoteliales que permita el estudio *in vitro* de la infección y del establecimiento de latencia, utilizando cepas de laboratorio y aislados clínicos.

5. Situación actual

Las líneas de células fibroblásticas han sido ampliamente utilizadas para el estudio *in vitro* de citomegalovirus. Estas células son el sistema de cultivo disponible más eficiente en la actualidad para propagar el virus a títulos que permitan llevar a cabo experimentos en cultivo celular (Sinzger et al., 1995). Sin embargo, debido el tropismo de citomegalovirus mencionado anteriormente, es importante estudiar la infección tanto lítica como la latencia en diversos tipos de células no solo en fibroblastos; y a su vez utilizar cultivos primarios y líneas celulares.

El tropismo de HCMV por células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales y células del músculo liso se ha determinado en diversos estudios (Kahl et al., 2000; Wang, 2006; Klingel et al., 2015). Como un paso inicial para identificar los determinantes genéticos del tropismo en células endoteliales se han comparado las características de crecimiento de las cepas de HCMV endoteliotrópicas y no endoteliotrópicas; ambos tipos de virus mostraron ser comparables en su capacidad para entrar en las células endoteliales. Sin embargo, las cepas no endoteliotrópicas se mostraron afectadas por su capacidad deficiente de translocar el genoma viral al núcleo. No se han definido los factores virales específicos responsables de esta diferencia en el transporte nuclear, así como otros determinantes genéticos necesarios para el tropismo de citomegalovirus en células endoteliales (Klingel et al., 2015).

Las infecciones líticas, persistentes y latentes de HCMV se estudian *in vitro* mediante el uso de dos clases diferentes de cepas virales. La primera de estas son las cepas de laboratorio, las más utilizadas AD169 y Towne. La segunda clase, llamadas cepas clínicas representan virus que se aislaron más recientemente de individuos infectados y que se han sometido a un pasaje limitado *in vitro*. Las cepas clínicas retienen el tropismo para las células endoteliales y epiteliales que se pierden en las cepas virales de laboratorio. Este tropismo extendido está mediado por proteínas virales que permiten que los viriones de cepas clínicas ingresen en una gama más amplia de tipos celulares que los viriones de cepas de laboratorio (Sinzger et al., 2008).

Se ha reportado que la progresión de la infección por HCMV esta dictada por el origen de las células endoteliales (Fish et al., 1998) la investigación en células endoteliales depende del

uso de cultivos primarios como: HAEC (células endoteliales de la aorta humana), HPAEC (Células endoteliales de la arteria pulmonar humana), células endoteliales microvasculares y HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana) empero estas presentan un limitado número de pasajes, por lo cual se ha propuesto utilizar una línea celular endotelial que semeje las características de las HUVEC pero con un mayor número de pasajes, por ejemplo, las células EA.hy926 (Lotfi et al., 2016).

Hace falta determinar si las células endoteliales EA.hy926 pueden establecer una infección latente *in vitro*; si existen diferencias en el establecimiento de latencia de las diferentes cepas de citomegalovirus; usando cepas altamente usadas y pasajeadas en cultivo celular, así como aislados clínicos.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Estandarizar un protocolo de cultivo e infección de células EA.hy926 con cepas de citomegalovirus humano y determinar el establecimiento de latencia.

6.2 Objetivos específicos

- Establecer el protocolo de cultivo de la línea endotelial EAhy926

- Definir condiciones metodológicas adecuadas para la infección y establecimiento de latencia de citomegalovirus en una línea celular endotelial.

7. Metodología del proyecto

7.1 Tipo de estudio

Experimental *in vitro*

7.2 *Población y muestra*

- Células EA.hy926: $1*10^6$ células/mL
- Cepas de HCMV:
  - Towne: con alto número de pasajes y adaptada a cultivo celular
  - Aislado clínico obtenido a partir de lavado broncoalveolar y con dos pasajes en cultivo celular en la línea MRC-5.

7.3 Materiales y métodos

Cultivo células EA.hy926

1. Descongelación de células EA.hy926

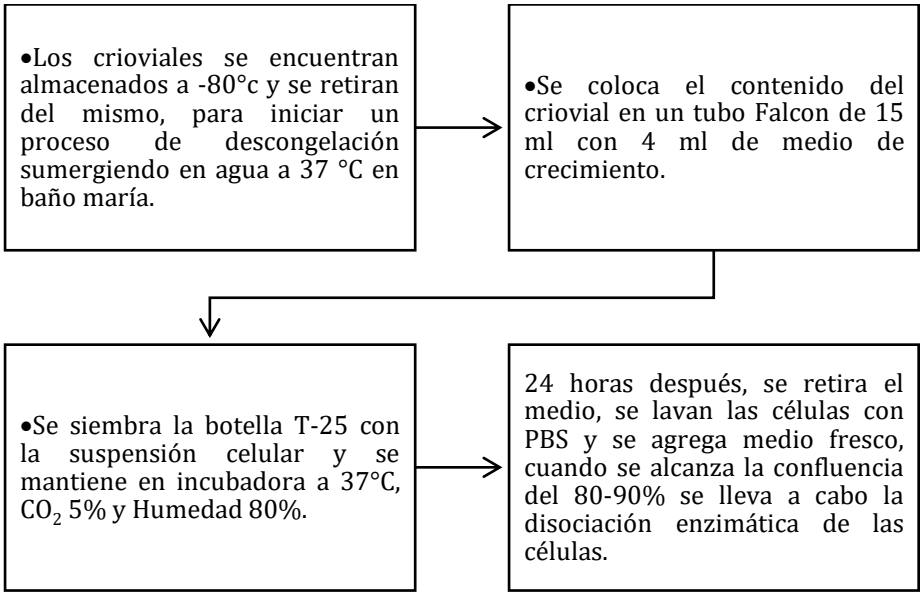

Figura 1. Procedimiento de descongelación de células EA.hy926. Diseñada por Maria Alejandra Florez.

2. Disociación enzimática de las células y siembra en botella T-75

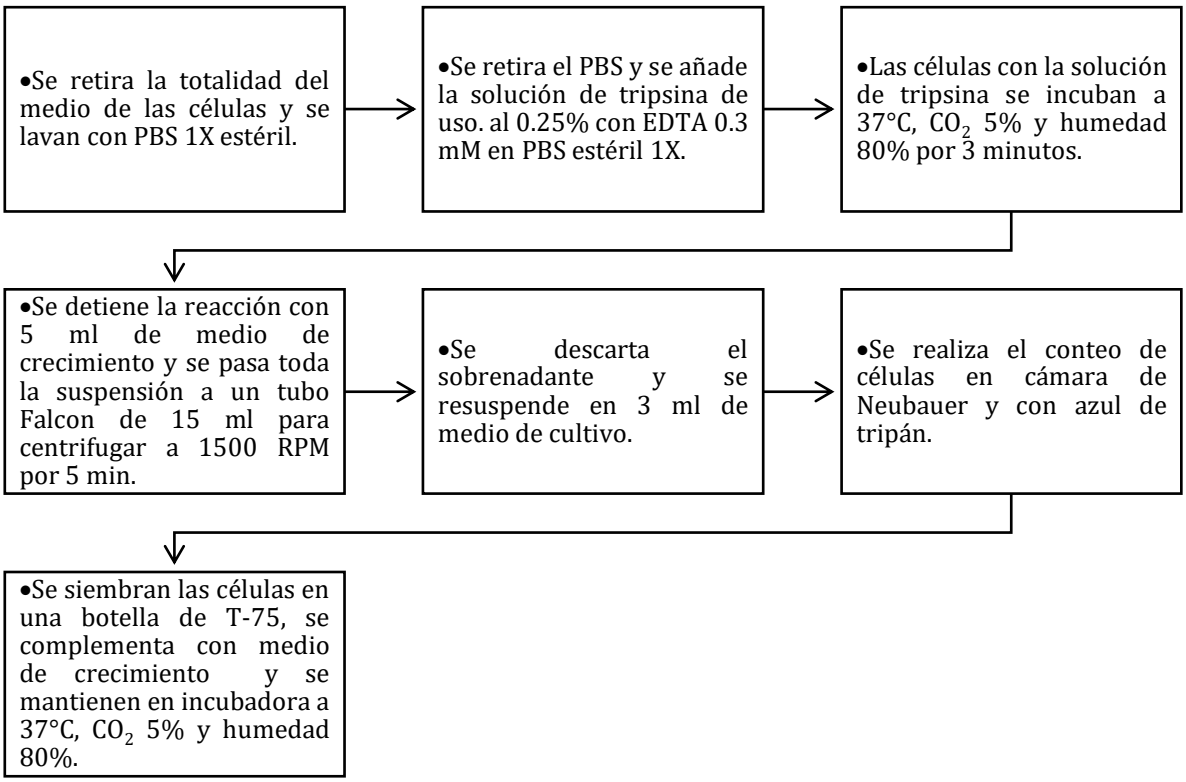

Figura 2. Procedimiento de disociación enzimática de las células y siembra en botella T-75. Diseñada por Maria Alejandra Florez.

3. Cuando se observe confluencia del 90% en una botella t-75 se desprenden las células, posteriormente se hace el conteo de las células en cámara de Neubauer para sembrar 60.000 células por pozo o 50.000 células por pozo, en caja de 12 pozos, con 1000uL de medio, por pozo. Las células utilizadas para el ensayo de infección se tomaron en el pasaje doce.

Infección a diferentes MOI de células EA.hy926

El título viral se determinó mediante TCID50 en cajas de 96 pozos y con observación cada 24 horas por 5 días

1. Infección células EA.hy926 con cepa Towne y con el aislamiento clínico a un MOI 0.1 y 0.5

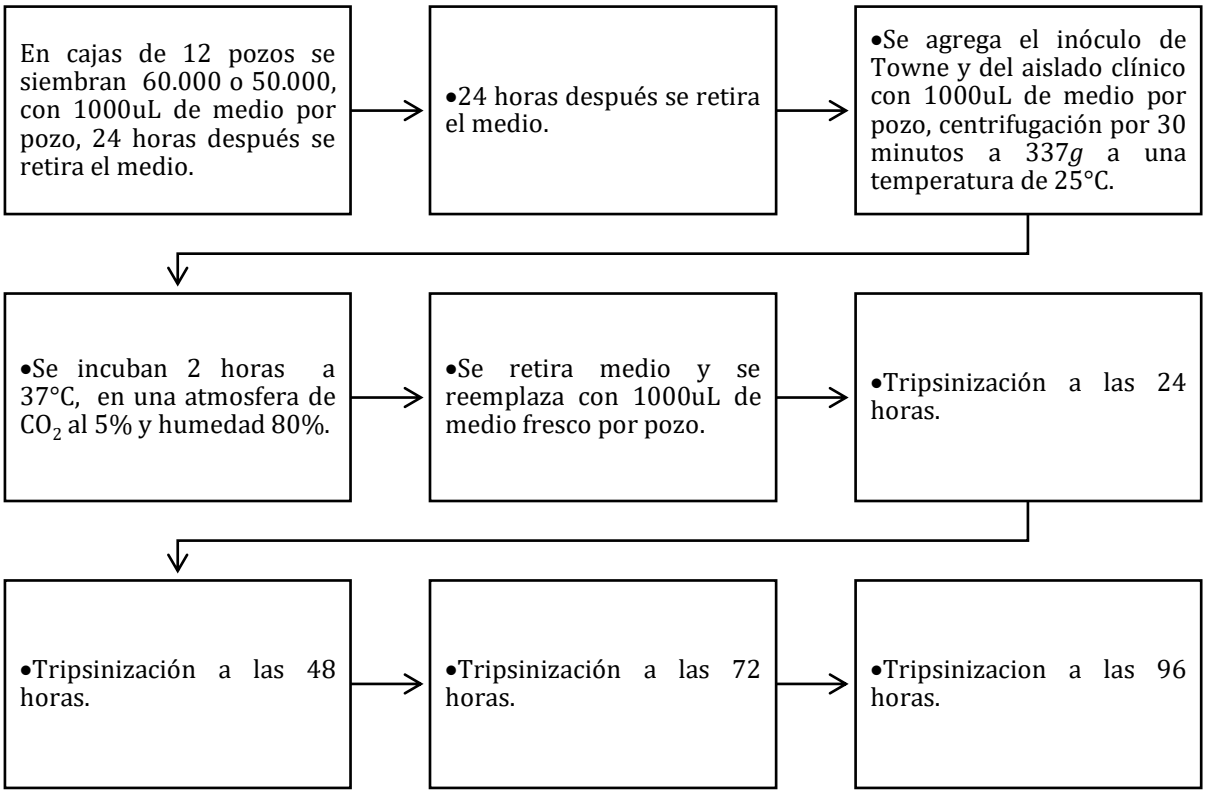

Figura 3. Procedimiento de infección de células EA.hy926. Diseñada por Maria Alejandra Florez.

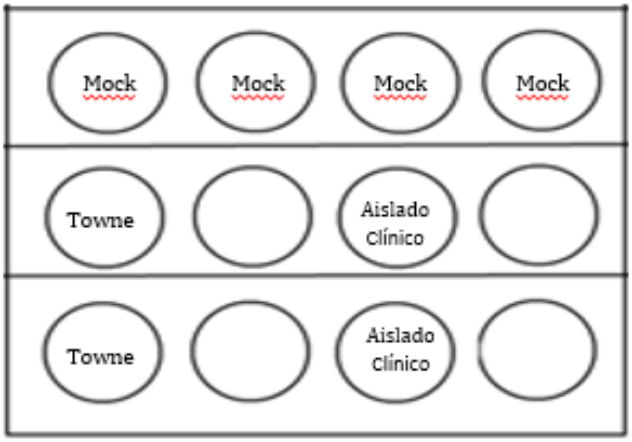

Figura 4. Experimento de infección en caja de 12 pozos. Diseñada por Maria Alejandra Florez.

Extracción ADN y ARN

PCR convencional para la detección de ADN de HCMV

Las secuencias de los primers que se utilizaran amplifican un fragmento que codifica para la proteína UL83.

Electroforesis en gel de agarosa

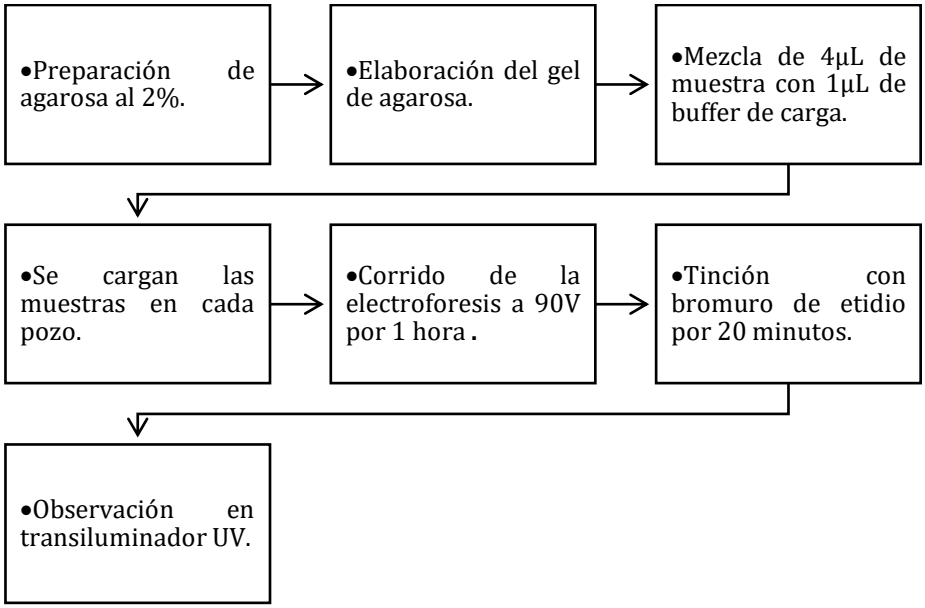

Figura 5. Procedimiento de electroforesis en gel de agarosa. Diseñada por Maria Alejandra Florez.

8. Consideraciones éticas

a. *Sustento legal* Investigación con riesgo mínimo según la resolución 8430 de 1993, ya que se utiliza una línea celular de laboratorio, cepas de citomegalovirus de laboratorio y un aislamiento clínico de citomegalovirus obtenido de un lavado broncoalveolar de un paciente de la Fundación Hospital Pediátrico La Misericordia. Este lavado se obtuvo en el marco de un proyecto de investigación que contó con aval ético de la institución hospitalaria.

9. Resultados

- El establecimiento de la infección de la cepa Towne se observó por PCR a un MOI de 0.1 a las 48 y 96 horas después de la infección.

- El efecto citopático se observó a un MOI de 0,5 a las 48, 72 y 96 horas después de la infección.

- No se observó ningún efecto citopático en las células infectadas con el aislado clínico en ninguno de los momentos evaluados.

- La latencia en las células EA.hy926 se puede determinar por RT-PCR para los genes UL138, UL111A, UL81-UL82, US28 o por inmunofluorescencia indirecta para la proteína UL138 o en ausencia de IE1 / 2

- Se estableció el protocolo de cultivo e infección de células EA.hy926 de la siguiente manera:

1. Descongelación de células EA.hy926
2. Disociación enzimática y siembra en botella T-75, hasta obtener una confluencia del 90%
3. Se siembran 60.000 células por pozo, en caja de 12 pozos, con 1000uL de medio, por pozo.
4. 24 horas después se retira el medio
5. Se agrega el inóculo de Towne y del aislado clínico con 1000uL de medio por pozo, centrifugación por 30 minutos a 337*g* a una temperatura de 25°C
6. Se incuban 2 horas a 37°C, en una atmosfera de CO_2 al 5% y humedad 80%
7. Se retira medio y se reemplaza con 1000uL de medio fresco por pozo
8. Tripsinización a las 24 horas
9. Tripsinización a las 48 horas
10. Tripsinización a las 72 horas
11. Tripsinización a las 96 horas

10. Discusión

La replicación de citomegalovirus en células endoteliales está influenciada por la cepa viral, lo que sugiere que se requieren genes virales específicos para una replicación eficiente en este tipo de células. Se ha reportado en la literatura las diferencias en la infección de células endoteliales con cepas endoteliotrópicas y no endoteliotrópicas; cepas como Towne y AD-169 que han sido altamente pasajeadas han perdido tropismo por células endoteliales y son incapaces de producir una infección lítica *in vitro* en cultivos primarios de células endoteliales y en la línea EA.hy926 (Lotfi et al., 2016). En este trabajo se observó que la cepa Towne fue capaz de producir infección en las células EA.hy926 con los dos MOI empleados y se encontró efecto citopático con un MOI de 0.5, corroborando que se completó el ciclo viral y ocurrió una infección lítica.

Gerna y colaboradores (2003) reportaron que se puede reestablecer el tropismo por células endoteliales en cepas como Towne después de múltiples pasajes en células HUVEC, es posible que esto también ocurra en células EA.hy926 ya que estas mantienen las características fenotípicas de las células HUVEC. Sin embargo, elevar el número de pasajes celulares en una línea dada, puede llevar a lo que se conoce como envejecimiento de las células. Estas disminuyen la velocidad de división celular y sus respuestas ante los estímulos

De la misma manera la cepa AD169, considerada incapaz de replicarse en HUVEC, se pudo adaptar para producir una infección lítica tanto en HUVEC como en células endoteliales de la arteria umbilical humana (HUAEC), recuperando así el tropismo que conservan los aislamientos clínicos (Gerna et al., 2003).

Las cepas altamente pasajeadas en cultivo han perdido su tropismo por células endoteliales debido a mutaciones en algunos genes importantes, por ejemplo, el complejo pentamérico gH/gL/UL128/UL130/UL131 (Liu et al., 2018) que se requiere para la entrada del virus en células endoteliales. De la misma manera, el gen US16 se ha asociado al tropismo en células endoteliales; Luganini et al (2017) reportaron que US16 se une a UL130 y contribuye a la formación del complejo pentamérico. Otra proteína del HCMV que regula el tropismo celular del virus al afectar el complejo pentamérico es UL148, participa en la maduración y ensamblaje del complejo gH/gL (Luganini et al., 2017).

También genes como UL135 y UL136 son requeridos en las etapas posteriores de la replicación viral en las células endoteliales (Bughio et al., 2015). El apagamiento de estos genes puede explicar que no se produzca infección en células endoteliales; puede que la cepa Towne utilizada en el experimento de infección no tenga modificaciones en estos genes y de esa manera mantenga su tropismo por una línea celular endotelial o que la cantidad de pasajes realizados en las células EA.hy626 reestablecieran el endoteliotropismo de la cepa.

Es importante tener en cuenta que las células EA.hy926, aunque conservan las características fenotípicas de células endoteliales, al ser un hibrido pueden tener un comportamiento diferente al ser infectadas con diferentes cepas. Lofti et al (2016) reportaron que cepas pobremente endoteliotrópicas no producían infección en estas células, por otro lado, la cepa TB40/E, una cepa endoteliotrópica era capaz de infectar estas células, pero genero poco efecto citopático y no se produjeron inclusiones virales nucleares después de cinco días posinfección. La cepa del aislado clínico posiblemente pueda tener características de una cepa endoteliotrópica, al no producir efecto citopático.

Por otro lado, es necesario evaluar si el aislamiento clínico está siendo capaz de infectar las células EA.hy926, ya que los aislamientos clínicos pueden perder tropismo por células endoteliales (como las cepas de laboratorio) al ser pasajeadas en cultivos de fibroblastos, ya sea en cultivos primarios o líneas celulares como MRC-5. No obstante, estas cepas pueden recuperar su endoteliotropismo al ser pasajeadas varias veces en células endoteliales (Gerna et al., 2003).

Es importante evaluar si estas cepas endoteliotrópicas que son capaces de infectar células EA.hy926, puedan estar estableciendo latencia y por esta razón, no se observe efecto citopático. También, se necesita evaluar si es aislado clínico es capaz de infectar estas células, y si este es el caso, determinar si se establece una infección latente.

En cuanto al establecimiento de latencia debe ser determinado mediante RT-PCR o RT-qPCR para confirmar la presencia de transcritos asociados a latencia como UL138, US28, LUNA (UL81-UL82) y UL111A.5 y a su vez no debe haber transcripción de los genes inmediatamente tempranos IE1/2 o la transcripción de estos últimos deber ser mínima.

La expresión del gen US28 no es definitiva para confirmar el establecimiento de latencia ya que este gen se expresa tanto en infección lítica como en infección latente (Frank et al., 2019, aunque este gen es necesario para mantener el estado de latencia (Krishna et al., 2017), para determinar si se estableció una infección latente debe haber expresión de otros genes asociados a latencia. Al igual que US28 los genes UL81-UL82 que codifican para la proteína LUNA, se transcriben en infección lítica y latente, por lo cual evaluar la expresión de la proteína LUNA no es suficiente para asumir que el virus está en latencia.

UL138 y UL111A.5 (LavIL-10) se expresan solo cuando citomegalovirus ha establecido una infección latente, por tal motivo son buenos marcadores para evaluar si se ha establecido latencia en las células EA.hy926.

El uso de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es de gran utilidad para confirmar el establecimiento de una infección latente; marcando proteínas asociadas a latencia como UL138, LUNA, LAcmv-IL10 se determina la ubicación de estas dentro de la célula endotelial. Además, se pueden marcar las proteínas inmediatamente tempranas 1/2; si se estableció una infección latente estas proteínas no se observarán en la célula. Por ejemplo, UL138 se ha detectado en el aparato de Golgi mediante el uso de IFI.

11. Conclusiones

- El modelo de infección de las células EA.hy926 es una buena alternativa para el estudio de la infección latente en células endoteliales y esto lo convierte en una opción eficiente y a menores costos.

- Según lo observado, las mejores condiciones para determinar el establecimiento de la latencia para la cepa Towne son: sembrar 60,000 células por pozo, utilizar un MOI de 0.1 y evaluar entre 48 y 96 horas después de la infección.

- Las condiciones adecuadas para determinar el establecimiento de la latencia para la cepa Towne son: sembrar 60,000 células por pozo, utilizar un MOI de 0.1 o 0.5 y evaluar entre 48 y 96 horas después de la infección.

- La infección de células EA.hy926 con el aislado clínico no produjo efecto citopático observable, con ninguno de los MOI empleados, ni en cualquiera de los periodos evaluados. Es posible que haya ocurrido la replicación viral sin que haya llegado a producir efecto citopático, pero no fue posible corroborarlo con la PCR.

12. Referencias bibliográficas

1. Ahn K, Pan S, Beningo K, Hupe D. A permanent human cell line (EA.hy926) preserves the characteristics of endothelin converting enzyme from primary human umbilical vein endothelial cells. Life Sci.1995;56(26):2331–41.
2. Arias-Murillo Y.R., Osorio-Arango K., Cortés J.A., Beltrán M. Seroprevalencia de citomegalovirus en donantes de órganos y receptores de trasplante renal, Colombia, 2010-2014. Biomédica. 2016;36(2):187-193.
3. Bentz GL, Yurochko AD. Human CMV infection of endothelial cells induces an angiogenic response through viral binding to EGF receptor and 1 and 3 integrins. Proc Natl Acad Sci. 2008;105(14):5531–6.
4. Bohórquez Sonia P., Díaz Juliana, Rincón Claudia M., Estupiñán Marcela, Chaparro Mauricio, Low-Calle Ana María et al . Descarga de HSV-1, HSV-2, CMV y EBV en la saliva de receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos de la Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia, Bogotá, D. C. Biomédica. 2016; 36(2): 201-210.
5. Boppana SB, Fowler KB. Persistence in the population: epidemiology and transmisson. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge University Press; 2007. Chapter 44.
6. Bughio, F., Umashankar, M., Wilson, J., Goodrum, F. Human Cytomegalovirus UL135 and UL136 Genes Are Required for Postentry Tropism in Endothelial Cells. J Virol. 2015; 89(13), 6536–6550.
7. Calderaro A, Rodighiero I, Vasile Simone R, Chezzi C, Medici M-C, Maccari C, et al. Human cytomegalovirus reactivation from latency: validation of a “switch” model in vitro. J Virol . 2016;13(1):1–15.
8. Campanini G, Wagner M, Gallina A, Revello MG, Milanesi G, Baldanti F, et al. Human Cytomegalovirus UL131-128 Genes Are Indispensable for Virus Growth in Endothelial Cells and Virus Transfer to Leukocytes. J Virol. 2004;78(18):10023–33.
9. Cannon, M. J., Schmid, D. S., & Hyde, T. B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. Rev Med Virol. 2010;20(4), 202–213.
10. Cannon MJ, Hyde TB, Schmid DS. Review of cytomegalovirus shedding in bodily

fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection. Rev Med Virol. 2011;21(4):240–55.

11. Ceccarelli M, Rullo E, Nunnari G. Risk factors of venous thrombo-embolism during cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. A systematic review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018;37(3):381–90.
12. Collins-McMillen D, Buehler J, Peppenelli M, Goodrum F. Molecular Determinants and the Regulation of Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation. Viruses. 2018;10(8):444.
13. Correa M.R., Correa M., Arbeláez M., Builes M., Ossa J.E. Prevalencia de infección por citomegalovirus en receptores y donantes de trasplante renal en Medellín para 1988-1989. Act Med Colomb. 1990;15(4):175-79.
14. Delwart EL. Review: Viral metagenomics. Rev Med Virol. 2007;17(1):115–31.
15. Elder E, Sinclair J. HCMV latency : what regulates the regulators ? Med Microbiol Immunol. 2019;208(3-4):431-438.
16. Fish KN, Soderberg-Naucler C, Mills LK, Stenglein S, Nelson JA. Human cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cells. J Virol. 1998;72(7):5661–5668.
17. Frank, T., Niemann, I., Reichel, A., & Stamminger, T. Emerging roles of cytomegalovirus-encoded G protein-coupled receptors during lytic and latent infection. Medical microbiology and immunology. 2019;208(3-4):447–456.
18. Gerna G, Baldanti F, Revello MG. Pathogenesis of human citomegalovirus infection and cellular targets. Hum Immunol 2004; 65:381–386.
19. Gerna G, Genini E, Lanzarini P, Sozzani S, Baldanti F, Percivalle E, et al. Human Cytomegalovirus Replicates Abortively in Polymorphonuclear Leukocytes after Transfer from Infected Endothelial Cells via Transient Microfusion Events. J Virol. 2000;74(12):5629–38.
20. Gerna G, Kabanova A, Lilleri D. Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Host Cell Receptors. Vaccines (Basel). 2019;7(3):70.
21. Gerna G., Percivalle E., Sarasini A., Baldanti F., Campanini G., Revello M.G. Rescue of human cytomegalovirus strain AD169 tropism for both leukocytes and human endothelial cells. J. Gen. Virol. 2003;84:1431–1436.

22. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. J Pathol. 2015;235(2):288-297.
23. Goodrum F. Human citomegalovirus latency: Aprroaching the Gordian Knot. Annu Rev Virol. 2017;3(1):333–57.
24. Jarvis MA, Nelson JA. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. Curr Opin Microbiol. 2002;5(4):403–7.
25. Jean Beltran PM, Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. Expert Rev Proteomics. 2014;11(6):697-711.
26. Ji YN, An L, Zhan P, Chen XH. Cytomegalovirus infection and coronary heart disease risk: A meta-analysis. Mol Biol Rep. 2012;39(6):6537–46.
27. Jia YJ, Liu J, Han FF, Wan ZR, Gong LL, Liu H, et al. Cytomegalovirus infection and atherosclerosis risk: A meta-analysis. J Med Virol. 2017;89(12):2196–206.
28. Kahl M, Siegel-Axel D, Stenglein S, Jahn G, Sinzger C. Efficient lytic infection of human arterial endothelial cells by human cytomegalovirus strains. J Virol. 2000; 74:7628-7635
29. Kim J.H., Goulston C., Sanders S., Lampas M., Zangari M., Tricot G., et al. Cytomegalovirus Reactivation Following Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation for Multiple Myeloma in the Era of Novel Chemotherapeutics and Tandem Transplantation. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2012; 18(11):1753-1758
30. Klingel K, Plachter B, Kahl M, Sinzger C, Jahn G, Laib K, et al. Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. J Gen Virol. 2000;81(12):3021–35.
31. Krishna, B. A., Poole, E. L., Jackson, S. E., Smit, M. J., Wills, M. R., & Sinclair, J. H. Latency-Associated Expression of Human Cytomegalovirus US28 Attenuates Cell Signaling Pathways To Maintain Latent Infection. mBio. 2017; 8(6):1754-17.
32. Lanzieri TM, Dollard SC, Bialek SR, Grosse SD. Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries. Int J Infect Dis. 2014;22:44-48.
33. Larsson S., Soderberg-Naucler C., Wang F.Z., Moller E. Cytomegalovirus DNA can be

detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time. Transfusion. 1998;38:271–278.

34. Lebedeva AM, Shpektor AV, Vasilieva EY, Margolis LB. Cytomegalovirus Infection in Cardiovascular Diseases. Biochemistry (Mosc). 2018;83(12):1437-1447.
35. Lilleri D, Gerna G, Revello MG, Baldanti F, Percivalle E. The pentameric complex of human Cytomegalovirus: cell tropism, virus dissemination, immune response and vaccine development. J Gen Virol. 2017;98(9):2215–34.
36. Liu, J., Jardetzky, T. S., Chin, A. L., Johnson, D. C., & Vanarsdall, A. L. The Human Cytomegalovirus Trimer and Pentamer Promote Sequential Steps in Entry into Epithelial and Endothelial Cells at Cell Surfaces and Endosomes. J Virol. 2018;92(21):1336-18.
37. Lotfi R, Stoehr D, Sinzger C, Wirth D, Lieber D, May T, et al. A permanently growing human endothelial cell line supports productive infection with human cytomegalovirus under conditional cell growth arrest. Biotechniques. 2015;59(3).
38. López Mora M.J. Incidencia, frecuencia, etiología y factores de riesgo para la infección en pacientes adultos con trasplante renal de un programa de trasplante de Bogotá. Trabajo de investigación para optar al título de Especialista en Infectología. Bogotá.
39. Luganini A, Cavaletto N, Raimondo S, Geuna S, Gribaudo G. Loss of the Human Cytomegalovirus US16 Protein Abrogates Virus Entry into Endothelial and Epithelial Cells by Reducing the Virion Content of the Pentamer. J Virol. 2017;91(11):e00205-17. Published 2017 May 12.
40. Murphy E, Rigoutsos I, Shibuya T, Shenk T. Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. PNAS. 2003; 100:13585–90
41. Nguyen CC, Kamil JP. Pathogen at the Gates: Human Cytomegalovirus Entry and Cell Tropism. Viruses. 2018;10(12):704.
42. Ossa J.E., Arango A.E., Builes M., Arbeláez M. Prevalencia de infección por citomegalovirus en candidatos a trasplante renal y en sus donadores. Act Med Colomb. 1988;13(3):125-28.
43. Reddehase, M. J., & Lemmermann, N. A. W. Cellular reservoirs of latent cytomegaloviruses. Medical Microbiology and Immunology. 2019

44. Reeves MB, Coleman H, Chadderton J, Goddard M, Sissons JGP, Sinclair JH. Vascular endothelial and smooth muscle cells are unlikely to be major sites of latency of human cytomegalovirus in vivo. J Gen Virol. 2004;85(11):3337–41.
45. Reeves M, Sinclair J. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;325:297–313.
46. Ricotta D, Alessandri G, Pollara C, et al. Adult human heart microvascular endothelial cells are permissive for non-lytic infection by human cytomegalovirus. Cardiovasc Res. 2001;49(2):440-448.
47. Salamanca-Rojas S, Barahona-López NM, Marín-Valcárcel A, et al. Seroprevalencia de anticuerpos IgG antirubéola y anticitomegalovirus en mujeres entre 16 y 40 años residentes en Tunja, Colombia. Rev Salud Publica. 2018;20(4):479-483
48. Sanbonmatsu Gámez S, Pérez Ruiz M, María J, Marí N. Infección por citomegalovirus humano. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014;32(1):15–22
49. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. J Gen Virol. 2006;87(7):1763-1779.
50. Sinzger C, Digel M, Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;325:63-83.
51. Slobedman, B., Cao, J. Z., Avdic, S., Webster, B., McAllery, S., Cheung, A. K., … Abendroth, A. Human cytomegalovirus latent infection and associated viral gene expression. Future Microbiology. 2010;5(6), 883–900.
52. Van De Berg PJEJ, Yong S La, Remmerswaal EBM, Van Lier RAW, Ten Berge IJM. Cytomegalovirus-induced effector T cells cause endothelial cell damage. Clin Vaccine Immunol. 2012;19(5):772–9.
53. Wang D, Shenk T. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. Proc Natl Acad Sci. 2006;81(3):876–80.