EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA *IN VITRO* DE UN AISLADO CLÍNICO DE CITOMEGALOVIRUS HUMANO.

I. ANTECEDENTES

1. LA VIROLOGÍA Y LA ENFERMEDAD POR EL CITOMEGALOVIRUS HUMANO (HCMV)

Las primeras reseñas en relación con este virus miembro de la familia *Herpesviridae* provienen del año 1881 cuando el patólogo alemán Ribbert describió células aumentadas de tamaño o citomegalia con inclusiones intranucleares, en cortes de riñón y de glándulas salivares de un mortinato con síntomas compatibles con sífilis congénita y nefritis intersticial. En ese momento no se conocía el agente etiológico de esta patología y durante mucho tiempo se consideró que se trataba de un parásito. (1,2)

Lipschuetz describió las células agrandadas, con un núcleo excéntrico y un cuerpo nuclear rodeado de un halo claro, en las lesiones de un paciente con herpes zoster y herpes genital. Hacia 1925 von Glahn y Pappenheimer fueron los primeros en proponer la etiología viral para las inclusiones intranucleares a partir de los hallazgos de Lipschuetz (1,2). En 1950 Wyatt acuñó el término Enfermedad por Inclusión Citomegálica (EIC), para los casos en los que este tipo de daño celular se había descrito junto con la afectación renal y de otros órganos y tejidos. (1,2)

La etiología viral fue confirmada en 1953 por Minder; mediante microscopía electrónica observaron partículas de 200 nanómetros en células pancreáticas con citomegalia. Entre 1954 y 1957 se logró el aislamiento viral y en este punto se debe mencionar a Margaret Gladys Smith quien en 1954 aisló el Citomegalovirus murino a partir de glándulas salivares de ratones y lo propagó en un cultivo de células murinas, dando origen a la cepa Smith. (3)

En 1955, ella misma consiguió aislar el Citomegalovirus humano a partir de glándula submandibular, logrando su crecimiento en cultivo de células humanas; sin embargo, en ese momento su trabajo fue invalidado con la presunción de una contaminación desde el cultivo del virus animal. (1) Al año siguiente repitió su aislamiento a partir de células renales de un niño de un mes de nacido, que murió por EIC. (4) Aunque en su momento no fueron reconocidas, se deben resaltar las contribuciones de la doctora Margaret Smith demostrando que se trataba de un virus de origen -y especifico de- humanos, al evidenciar en cultivo de fibroblastos la citomegalia y las inclusiones intranucleares reportadas previamente en biopsias de pacientes. Con estos trabajos la Doctora Smith logró el aislamiento de dos cepas del virus denominado hasta ese momento SGV (*Salivary Gland Virus*). (4) En ese mismo año, Rowe y colaboradores -mientras estudiaban los adenovirus- lograron el aislamiento del Citomegalovirus humano a partir de tejido de adenoides de

pacientes pediátricos. (5) Finalmente Thomas Weller, quien recibió en 1954 el premio Nobel de Fisiología o Medicina por el desarrollo de las técnicas de cultivo de células embrionarias humanas para aislar el virus de la poliomielitis, aisló el Citomegalovirus humano a partir de los tejidos de pacientes con enfermedad congénita inicialmente atribuida a parásitos. (2) En 1960 Weller acuño el término Citomegalovirus y en una publicación de 1970 reconoce que el virus fue aislado de manera independiente por otros dos grupos en cabeza de Smith y Rowe, aparte de su propio grupo. (6)

1.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR HCMV

Se define seropositividad como la presencia y detección de anticuerpos de tipo IgG -específicos contra el Citomegalovirus u otros virus-, en suero; y su presencia indica que un individuo ha tenido contacto -reciente o pasado- con el virus. Considerando que tanto en niños como en adultos la infección por HCMV es generalmente asintomática, los datos epidemiológicos provienen sobre todo de la evaluación de la seroprevalencia (prevalencia de la positividad para anticuerpos en una población dada). (7,8)

Actualmente, se considera que la seroprevalencia para HCMV es alta en todo el mundo. En países desarrollados, en la población general se ha reportado entre 50 a 70% y de hasta 100% en países subdesarrollados. (7,8,9,10) Las diferencias en la frecuencia pueden deberse a varios factores: i) Variaciones geográficas, la seroprevalencia reportada es más alta en América del Sur, África y Asia, regiones en las que puede llegar a ser hasta del 100%; mientras que en Europa Occidental y Estados Unidos se encuentra entre el 50 y el 70%. ii) Origen étnico, siendo mayor en afrodescendientes, hispanos y asiáticos al compararlos con individuos caucásicos. iii) Género, donde se observa que la prevalencia es levemente más alta en mujeres que en hombres. (7,8,9,10)
En particular se ha evaluado la población de mujeres en edad reproductiva, dado que, si son seronegativas y adquieren la infección primaria por HCMV durante el embarazo, el virus puede atravesar la placenta y causar hipoacusia neurosensorial y daño neurológico congénito, entre otros. (7,8,9) Cannon M.J. y cols. reportaron que la seroprevalencia en las gestantes oscila entre el 45 al 100% (8), y reportes de la seroprevalencia materna en países como Brasil, Chile, Suráfrica e India muestran prevalencias entre el 80 y el 100%; sin embargo, estos mismos valores se reportan en mujeres en embarazo de países como Italia y Suecia. En Estados Unidos y Canadá se encuentra entre 60 y 80% y un poco por debajo en Europa occidental y Australia. (8) En China se encontró una seroprevalencia del 96.4% cuando se evaluaron 112 mujeres gestantes. (11) El rango amplio de seroprevalencia en las mujeres embarazadas se explica por factores anteriormente mencionados.

Otro factor determinante en la seroprevalencia es el nivel socioeconómico ya que las personas de estratos económicos bajos, con pobres niveles educativos, sin acceso a servicios de salud y malas condiciones de higiene y salubridad tienen un mayor riesgo de infección. Todos estos aspectos confluyen en los países en vías de desarrollo con más pluralidad étnica, con un mayor número de embarazos y la

mayor seroprevalencia para HCMV. También influyen la duración de la lactancia luego del nacimiento, ya que si es por periodos cortos se disminuye la probabilidad de transferencia de inmunoglobulinas contra el virus, o si la lactancia es prolongada, aumenta el riesgo de infección por contacto estrecho con la madre infectada a través de la leche o saliva. Otro factor es el rápido ingreso de los menores a instituciones para su cuidado, que aumenta el riesgo de infección o transmisión por contacto próximo con otros menores y adultos. (7,8,10)

Por otro lado, la seroprevalencia de la infección congénita o adquirida al momento del nacimiento se comporta de igual forma como en la población general y se explica por los factores económicos y geográficos que ya se describieron; en estos casos - como en otros - se considera que la saliva o la orina pueden ser la principal fuente de transmisión del virus. (12,13) Se ha reportado que la prevalencia de infección congénita es cercana al 1% en países desarrollados (13) y entre el 0.6 al 6.1% para los países en desarrollo. (14) Las consecuencias de esta infección van desde la muerte fetal o luego del nacimiento, a defectos congénitos como la sordera neurosensorial y el retardo del neurodesarrollo, entre otras. (7) En los primeros meses de vida también hay un alto riesgo de adquirir la infección, hecho evidenciado por la detección de anticuerpos de tipo IgM en neonatos y lactantes. (11)

Los datos sobre seroprevalencia de HCMV en Colombia son escasos y la población principalmente estudiada ha sido la de receptores de trasplante renal y los donantes. Una evaluación llevada a cabo entre 1986 y 1989 en receptores, donantes e individuos sanos mostró que de 598 candidatos a trasplante el 92% tuvo una serología positiva para HCMV, para los 225 donantes intrafamiliares se determinó una seroprevalencia del 87%, entre los 63 donantes cadavéricos la seroprevalencia fue del 73% y de los 105 individuos sanos el 74% tenían anticuerpos IgG contra HCMV. (15,16) En otro reporte, se encontró una seroprevalencia semejante para un grupo de 208 receptores de trasplante renal evaluados entre 2007 y 2012, encontrando que 189 pacientes (91.3%) tenían infección previa con HCMV determinada por la serología positiva. (17) El estudio colombiano con el mayor número de pacientes reportó que de 1813 donantes, el 86.2% eran IgG positivos y de 3313 receptores el 91% eran seropositivos. (18)
En cuanto a la infección materna y congénita en Colombia, entre 2017 y 2018 se evaluaron 1501 mujeres con embarazo entre las semanas 8 y 12, viviendo en 7 ciudades colombianas; se obtuvieron muestras de suero para detectar anticuerpos IgG anti HCMV, encontrando una prevalencia del 98.1%. Se observó que, en comparación con las mujeres seronegativas, las mujeres con resultado positivo tenían uno o más hijos que aún permanecían en el hogar y el nivel educativo era inferior. En este mismo trabajo se evaluó la infección congénita por HCMV, obteniendo muestras de orina de 1023 niños, de los cuales en 711 las muestras se tomaron en los primeros 21 días de vida; el resultado fue positivo para ADN (Ácido Desoxirribonucleico) de Citomegalovirus en 6 (0.8%) niños. Se tuvo acceso a la información clínica de 5 de estos 6 niños, 2 de los cuales presentaron anormalidades neurológicas. (19) Luego de los 21 días y hasta los 6 meses, se consideró infección posnatal y en este caso de 472 niños con prueba de orina

negativa para HCMV antes de los 21 días de nacidos, 258 (54.7%) fueron diagnosticados con la infección posnatal. (19)
En un grupo de 154 mujeres en edad reproductiva (entre 16 y 40 años) se determinó seropositividad para HCMV en 140 (90.9%), lo que equivale a un riesgo de infección primaria durante el embarazo de 9.1%. Estos resultados sobre la seroprevalencia de HCMV en Colombia se corresponden con la prevalencia reportada a nivel mundial para los países subdesarrollados, en los que se encuentra por encima del 70% y se alcanzan porcentajes cercanos al 100%, siendo llamativa la prevalencia en mujeres embarazadas con el consiguiente riesgo de infección congénita. (20)

1.2. TRANSMISIÓN, PAPEL DE LA SALIVA EN LA PROPAGACIÓN Y DETECCIÓN VIRAL

El Citomegalovirus puede transmitirse por distintas vías: durante el embarazo por infección transplacentaria, por infección congénita, por descargas virales asintomáticas en saliva, orina, durante la lactancia y por transfusiones y trasplantes. La vía transplacentaria se da si la madre cursa con una primoinfección (Citomegalovirus se adquiere por primera vez) o reactivación (la infección ha ocurrido previamente y el virus inicia un ciclo replicativo), o si no tiene anticuerpos protectores lo que permite la transmisión del virus al feto. (11,21,22) Al respecto, se sugiere que aproximadamente el 35% de los embarazos de madres con infección primaria, pueden transmitir el virus al feto en cualquier trimestre del embarazo. (19) De igual forma, el neonato se puede infectar durante su paso por el canal de parto o por la alimentación con leche materna que contiene partículas virales. (21,23)

Actualmente se reconoce que la transmisión del virus ocurre principalmente por un mecanismo denominado descarga viral asintomática, hacia y a través de fluidos corporales como la saliva, orina, leche materna, lágrimas y semen. (24,25,26) Este mecanismo implica la presencia temporal de partículas virales en las secreciones de individuos infectados que no manifiestan signos ni síntomas de la infección o reactivación de HCMV. (24,25,26) Los niños en quienes se ha comprobado infección perinatal pueden presentar descargas en saliva y orina durante varios meses luego del nacimiento. (13) Algo similar ocurre en los niños en edad preescolar y escolar. En ambos casos, estas descargas en fluidos corporales aumentan la posibilidad de infección o reinfección (Un individuo previamente infectado adquiere nuevamente el virus) para otros niños, adultos o madres gestantes, lo que explica -parcialmente-, las altas tasas de infección en niños en condiciones socioeconómicas bajas ya que estos son llevados más temprano a guarderías, jardines o escuelas para su cuidado. (7,21) También hay reportes de transmisión por contacto sexual en jóvenes y adultos. (24) La trasmisión por transfusiones o por trasplante de órganos y de precursores hematopoyéticos se considera iatrogénica. En este último grupo de pacientes se viene utilizando la leucorreducción en las transfusiones (eliminación de los leucocitos de la sangre o de los productos sanguíneos) buscando disminuir la probabilidad de transmisión de HCMV. (25)

La presencia de partículas virales en saliva se puede explicar por la persistencia de HCMV en las células acinares de glándulas salivares, como lo evidenció Margaret

Smith en 1955, al aislar el virus a partir de glándula submandibular humana (1) y por la observación de inclusiones del virus en glándula parótida de 4 menores entre los 2 y los 6 meses de edad. (25) Estos trabajos aportan evidencia de la replicación viral en las glándulas salivares, como mecanismo para la transmisión a partir de la saliva. La detección de HCMV en saliva también se puede explicar por la replicación viral en las células epiteliales de la mucosa oral, que son permisivas a la infección y descargan partículas virales en este fluido. (28) Estos trabajos demuestran que la saliva es un vehículo crucial para la trasmisión horizontal del virus y que la cavidad oral tiene un papel importante en la transmisión puesto que, a partir de individuos asintomáticos, el virus puede dispersarse en gotículas de saliva al hablar, estornudar, toser o escupir (descarga viral asintomática). Además, la descarga viral a la saliva puede resultar también en reinfección de tejidos y órganos puesto que las partículas virales pasan al tracto gastrointestinal o pueden terminar siendo transportadas por las vías aéreas hasta el pulmón. (28)

La descarga de HCMV en saliva ha venido siendo estudiada en distintos grupos de individuos y de pacientes. Al respecto, do Canto y cols. (29) en el año 2000 evaluaron la transmisión y descarga viral asintomática en saliva y orina en 120 niños de 1 a 15 años, con síndrome de Down que asistían a guarderías. La seropositividad para IgG fue del 76% y en tres evaluaciones sucesivas se detectó HCMV en orina y/o saliva en 43, 46 y 39% de los niños seropositivos, respectivamente. Además, se determinó una seroconversión en 10 (38.5%) de 26 niños inicialmente seronegativos. (29) De esta forma se concluyó la alta y frecuente presencia del virus en saliva y orina, la alta seropositividad de los niños desde el inicio del estudio, y la alta frecuencia de descargas virales y el riesgo de infección por HCMV en individuos sanos. (29)

En grupos de interés como los Receptores de Trasplante de Precursores Hematopoyéticos (RTPH), también se ha evaluado la descarga asintomática en saliva y se comparó con la detección del virus en plasma, que es la muestra que usualmente se emplea para el diagnóstico. Correia-Silva y cols. (30) evaluaron la descarga oral en 30 individuos entre 11 y 54 años receptores de trasplante alogénico de los que se obtuvieron muestras de saliva y sangre semanalmente hasta el día 100 postrasplante, y fueron procesadas por pruebas moleculares Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (rt PCR). Al menos una muestra de saliva y sangre fue positiva para HCMV en todos los pacientes durante los 100 días evaluados. Se obtuvieron en total 331 muestras de saliva y 353 de sangre, de las cuales 140 y 192 fueron positivas para HCMV (43% y 54.4%), respectivamente. Al comparar los resultados de las muestras de saliva y sangre tomadas simultáneamente, se determinó una alta correlación de hallazgos positivos ($R = 0.858$; $p< 0.0001$), aunque se obtuvo una carga viral más baja en la saliva. De este modo, se sugiere que la saliva puede ser utilizada para el diagnóstico temprano de la infección o la reactivación del HCMV en este grupo de pacientes. (30)
En otro estudio, nuestro grupo evaluó la descarga asintomática en saliva de pacientes pediátricos receptores de Trasplante de Precursores Hematopoyéticos; se incluyeron 17 pacientes con edades entre 3 y 17 años, de quienes se obtuvo una muestra de saliva semanalmente durante el periodo de hospitalización. De este

modo, se recolectaron 105 muestras de saliva las cuales se procesaron por PCR cualitativa; se evaluó el comportamiento de la descarga viral de 4 miembros de la familia *Herpesviridae*: Virus Herpes Simplex 1 y 2 (VHS-1 y VHS-2), Virus Epstein Barr (VEB) y Citomegalovirus (HCMV). Se estableció la descarga viral en 10 (58.9%) de los 17 pacientes; en 4 casos se detectó VHS-2, en otros 4 pacientes se detectó HCMV, en 9 casos se detectó VEB y en ninguna de las muestras se estableció la presencia de VHS-1. Uno de los principales hallazgos fue la detección simultánea de HCMV junto con VEB en tres casos y en otros tres pacientes descarga simultánea de VHS-2 y VEB; además, se determinó una relación positiva entre la detección del virus en saliva y un recuento bajo de leucocitos. Estos resultados permiten concluir que las descargas virales asintomáticas en saliva tienen un comportamiento dinámico y que la detección de HCMV en este fluido es independiente de la detección en sangre periférica, sugiriendo que la reactivación ocurre en compartimientos anatómicos distintos. (31)

Algo similar se ha reportado en adultos; en un grupo de 53 pacientes RTPH se evaluó la descarga de HCMV en saliva, hasta el día 100 postrasplante. Se comparó la carga viral en plasma (ADNemia) y en saliva (sin estimular la secreción). Por rt PCR se encontró que 44 pacientes (83%) tenían ADN de HCMV cuantificable en saliva (n=1) o plasma (n=12), o en ambos tipos de muestra (n=31). Al evaluar cronológicamente, se encontró que en 8 pacientes la detección en saliva antecedió la detección de la ADNemia, pero en 21 casos se detectó primero la ADNemia que la descarga viral en saliva y la detección simultánea de ADN de HCMV ocurrió en 2 pacientes. La cuantificación de las cargas virales en saliva y plasma tuvieron baja correlación, pero sin mayores diferencias en la magnitud, lo que sugiere que la saliva no parece ser un buen predictor de la detección viral en sangre. (32) Se puede ver que las descargas virales en saliva tienen un comportamiento variable y dinámico y que es posible la detección en saliva con resultados negativos en plasma.
Aunque no hay uniformidad en los resultados, es evidente que la saliva puede facilitar el diagnóstico de la infección/reactivación de HCMV y permite hacer seguimiento en los pacientes trasplantados. La toma de muestras de saliva tiene ventajas sobre otros tipos de muestras por la facilidad para su obtención, tanto en pacientes ambulatorios como hospitalizados, la seguridad para el paciente y para el operador, así como un procesamiento de baja complejidad en el laboratorio; lo cual redunda en menor estrés para el paciente y en la disminución de los costos tanto para la toma como el procesamiento de la muestra.

1.3. BIOLOGÍA DEL VIRUS

Ya en 1970 Weller anotaba la pertenencia de Citomegalovirus a la familia *Herpesviridae*; actualmente se ha clasificado más exactamente en la subfamilia *Betaherpesvirinae*, género Citomegalovirus o Virus Herpes Humano 5 (VHH-5).(6, 33)
La inclusión de HCMV en la subfamilia *Betaherpesvirinae* se debe a sus características biológicas, teniendo en cuenta en primer lugar que *in vivo* el rango

de hospederos es estrecho y restringido a seres humanos, producto de una co-evolución de millones de años. (34) En cultivo celular, se replica mejor en fibroblastos (Fb), su ciclo replicativo es largo y el efecto citopático se observa como focos que progresan lentamente; la citomegalia puede observarse tanto *in vitro* como *in vivo* y las inclusiones de material genético viral aparecen en el núcleo y el citoplasma. (34)

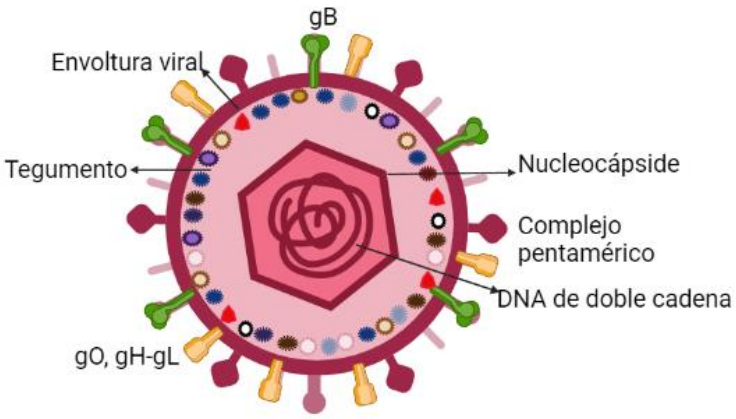
El HCMV posee un material genético ADN de doble cadena y tiene uno de los genomas más grandes y complejos descritos entre los virus que infectan seres humanos, constituido aproximadamente por 235 kpb. El genoma tiene aproximadamente 250 marcos abiertos de lectura (ORFs), de los cuales se han definido 41 como esenciales para la replicación del ADN y el ensamblaje de viriones, 88 como no esenciales y 27 con una función de potenciar la replicación en Fb. Debe anotarse que en algunos trabajos se han identificado hasta 751 ORFs, cuando se hace una evaluación temporal de la transcripción génica. Se ha observado que, a partir de un mismo locus genómico, con una transcripción regulada y alternando el sitio de inicio, se produce una gran variedad de ARNs y polipéptidos de diferentes tamaños y funciones. (35)

Algunos de los ORFs considerados no esenciales no se han identificado en otros miembros de la familia *Herpesviridae* por lo que se asume que participan en eventos únicos al HCMV como son la evasión y modulación de la respuesta inmune. (36) La función génica se ha establecido en cultivos de HCMV en líneas celulares fibroblásticas; es posible que estos genes denominados no esenciales cumplan un papel en la infección y replicación en otros tipos celulares. (36) El genoma de HCMV se ha definido utilizando cepas como la AD169, aislada de tejido adenoide de un niño de 7 años. Se ha establecido que está constituido por dos segmentos lineales de ADN, unidos covalentemente y denominados *Long* (L) y *Short* (S). Cada uno de estos segmentos tiene una región única *Unique Long* (U_L) y otra *Unique Short* (U_S) y a su vez se encuentran flanqueadas por segmentos invertidos - repetidos (TR_L, IR_L, TR_S, IR_S). Así, la secuencia completa sería TR_L–U_L–IR_L–IR_S–U_S–TR_S. (37)

El genoma viral está encerrado por una cápside icosaédrica con 162 capsómeros, 150 hexaméricos y 12 pentaméricos, y con un diámetro de entre 100 y 110 nm. (Figura 1.1.) Enseguida, se encuentra una capa proteica conocida como tegumento, sin estructura definida, de aspecto globular, con distribución asimétrica, en la que destaca la fosfoproteína pp65, cuya detección fue utilizada durante mucho tiempo para las pruebas de antigenemia, para confirmar infección activa. (Figura 1.1)
Algunas de las proteínas presentes en el tegumento son codificadas por 17 genes, por ejemplo, UL35 y UL24 que activan la expresión de genes virales, UL36 que inhibe la apoptosis, UL47 que libera el ADN viral de la cápside, UL69 que detiene el ciclo celular en G1 y UL97 que estimula la replicación del ADN, el ensamblaje de los viriones y su liberación, entre otros genes. (38) UL97 codifica para la quinasa que fosforila el ganciclovir, fármaco antiviral análogo sintético de nucleósido que inhibe la replicación del virus. (39) Las proteínas del tegumento se unen a la cápside e interactúan con el citoesqueleto de microtúbulos de la célula infectada para transportar la cápside hasta el núcleo. (38)

Citomegalovirus tiene una envoltura externa lipídica, derivada de las membranas de las células que infecta y en la que se insertan por lo menos 8 glicoproteínas virales (gB, gH, gL, gO, UL128, UL130 y UL131A). La partícula viral madura o virión tiene un diámetro aproximado de 150 a 200 nm.(33,34) Figura 1.1.

Figura 1.1. Estructura básica de Citomegalovirus Humano



En la Figura 1.1. se observan los componentes morfológicos de la partícula viral madura. gB: Glicoproteína B. gO: Glicoproteína O. gH: Glicoproteína H. gL: Glicoproteína L. Elaborada con Biorender.

1.4. EXPRESIÓN GÉNICA DE HCMV

Los *Herpesviridae* comparten un patrón temporal de expresión génica; luego de algunas horas de la infección de células que permiten la replicación viral, ocurre la expresión de los genes denominados Inmediatamente Tempranos (IE) de gran importancia en la infección lítica. Las proteínas codificadas por los genes IE, estimulan la expresión de los genes Tempranos (E) cuya función es la replicación del ADN viral y que a su vez son necesarios para la fase Tardía del ciclo replicativo (L), en la que se expresan los genes estructurales, seguida de ensamblaje y liberación de los viriones. (35,40)
Es de resaltar que, como en muchos procesos biológicos, no se puede establecer una clara delimitación temporal o de funciones entre los productos de los genes incluidos en cada fase; por el contrario, los resultados de los estudios *in vitro* muestran que la participación de un gen en una de las fases ya mencionadas puede depender de la cantidad de virus inoculado o multiplicidad de infección (MOI), la cepa viral y las células empleadas. (41)

Los genes IE1 y 2 son los más reconocidos y estudiados dentro del grupo de los genes inmediatamente tempranos, pero se pueden citar otros genes clasificados como IE: UL36, UL37, UL37.1, UL37.3, UL38, UL61, UL123, UL138, UL148, US1, US2, US3, TRS1 y IRS; que también cumplen funciones en la replicación del ADN. (42) Además, UL36 – UL38 ejercen actividad antiapoptótica. (43) Los genes IE

codifican para las fosfoproteínas IE1 e IE2; la proteína IE1 p72 es codificada en el ORF UL123 e IE2 p86 por el ORF UL122; estos marcos abiertos de lectura se localizan en la región MIE (*Major Immediate Early*). El mARN de IE1 se trascribe a partir de los exones 1-4 y para IE2 son los exones 1-3 y 5. (44,45) El *splicing* preferencial lleva a que inicialmente sea más abundante IE1 y luego IE2. (46)
La transcripción de los genes IE1 e IE2 es controlada por una proteína que no requiere síntesis *de novo* luego de la entrada del virus a la célula y que es codificada en la región MIEP (*Major Immediate Early Promoter*). (47,48)
Desde hace varios años se ha reconocido la importancia de las proteínas inmediatamente tempranas en el inicio del ciclo viral replicativo o lítico y cómo su deficiencia interrumpe o altera la continuidad de la infección lítica. Por ejemplo, se ha observado que en cultivos celulares de Fb infectados con bajos MOIs de la cepa Towne CR 208, mutante para el exón 4 de la región MIE, hay defectos en la formación de los compartimientos de replicación, a pesar de la detección de la proteína IE2. (48,49) Además, la infección de estos Fb con la cepa mutante produjo un defecto en la expresión de los genes UL44, UL57, UL69 y UL98, relacionados con las siguientes fases del ciclo viral. (50)
Inmediatamente luego de la infección y transporte de la cápside viral hasta el núcleo, los genes de HCMV se acumulan en los dominios nucleares 10 (ND10) conocidos también como cuerpos nucleares, alterando su estructura. En Fb infectados a MOI < 0.1 con la cepa Towne y utilizando Inmunofluorescencia, se ha demostrado que IE1 se encuentra en el núcleo desde las 2 horas post-infección (hpi.), con un patrón mixto, difuso y punteado, pero siempre en asociación con las principales proteínas que constituyen los cuerpos nucleares a saber, PML (Proteína de la Leucemia Promielocítica), fosfoproteína que actúa como factor de transcripción y supresor tumoral) y SP100 (con funciones similares a las de la proteína PML). A las 4 – 6 hpi. predomina un patrón difuso, debido a la relocalización en el núcleo, tanto de las proteínas celulares como de IE1, al parecer debido a disrupción de los cuerpos nucleares. En cuanto a IE2, a las 4 hpi. se observó la colocalización de esta proteína viral con PML y parte de IE2 permaneció así hasta las 12 hpi., aunque PML hubiese sido desplazada por IE1. A las 6 hpi. la detección de IE2 fue visible en pocas células, pero a las 24 hpi. se observó una marcación positiva con el patrón punteado en casi todas las células infectadas. (51) Al parecer la disrupción y reorganización de los cuerpos nucleares o ND pueden ser un evento indispensable en las etapas tempranas del ciclo lítico de HCMV. (51)

Se considera que la función de IE2 es activar la expresión de los genes tempranos, como fue demostrado al infectar fibroblastos con una cepa mutante para UL122 que luego de cuatro semanas de infección, no produjo lisis celular en los ensayos de formación de placas (un método que permite evaluar la capacidad infecciosa del virus y su cuantificación). Esta evidencia corrobora la importancia de esta proteína en la continuidad del ciclo replicativo. (52) Los genes tempranos (E) tienen como función la replicación del ADN viral, el clivaje y el empaquetamiento del genoma y ensamblaje de las partículas virales. Por definición requieren la síntesis *de novo* de proteínas IE, pero también de productos celulares para su transcripción. (53) Los genes E también ejercen funciones reguladoras dentro de las células infectadas, generando un ambiente propicio para la replicación viral al controlar la síntesis de

ADN celular e inhibir el reconocimiento de la célula infectada por el sistema inmunológico. (53) La transcripción de los genes E es previa a la replicación del ADN viral y dentro de estos genes se encuentra UL54 que codifica para la DNA polimerasa viral, también el gen UL97 y UL44. Este último codifica para una subunidad de la ADN polimerasa viral con función en la procesividad de la enzima al estabilizar la unión de la subunidad catalítica a la plantilla de ADN. (54) Otros genes tempranos son UL57 que codifica para una proteína de unión a ADN monocatenario; UL70, UL102 y UL105 que codifican para un complejo heterotrimérico con función de helicasa – primasa. (55) UL 70 tiene actividad primasa, UL105 es la helicasa y UL102 es la subunidad de unión, luego de la acción del complejo helicasa – primasa la proteína UL57 se une a la hebra de ADN y puede encontrarse hasta las 48 hpi. (55,56,57) UL84 se encuentra en los compartimientos de replicación en el núcleo de las células infectadas, muestra una distribución con un patrón punteado y colocaliza con UL34, IE4 y UL44; al parecer, participando en la formación de los centros de replicación, en la síntesis de ADN viral y en la regulación de la proteína IE2. (58,59)

Luego de la replicación del material genético viral, ocurre una intensa transcripción de los genes tardíos (L), que son básicamente los que codifican para las proteínas estructurales y proteínas que participan en el ensamblaje y salida de las partículas virales recién formadas; en esta expresión génica participan proteínas tanto celulares, por ejemplo, el Factor Nuclear Kappa B (NF-κB) como virales (IE2). (60) A continuación, se citan algunos de los genes tardíos y las respectivas proteínas: UL86 - MCP (*Major Capsid Protein*), UL48A – SCP (*Small Capsid Protein*), UL85 – MnCP (*Minor Capsid Protein*), UL80.5 - Proteína de ensamblaje, UL80a – Precursor de la proteína de ensamblaje. Estas proteínas son translocadas al núcleo para la formación de la cápside y el empaquetamiento del ADN viral, evento en el cual participan las proteínas codificadas por los genes UL89 y UL56 que forman un complejo con función de nucleasa - terminasa y UL104, esta última proteína actúa como un portal en la cápside para el ingreso del ADN. (61)

Las proteínas del tegumento también hacen parte de los productos de los genes L y pueden ser trasportadas al núcleo donde se incorporan a la partícula viral en formación, otras lo hacen en el citoplasma. Anteriormente se habían mencionado algunas proteínas tegumentarias; otros ejemplos de estos genes y las respectivas proteínas son: UL26 – ppUL26, UL48 – pp200, UL50 – pp35, UL53 – pp38, UL82 – pp71 y UL83 – pp65, que se localizan en el núcleo. UL25 – ppUL25, UL32 – pp150 y UL99 – pp28, que se han localizado en el citoplasma. Las funciones son variadas y no se limitan a la composición estructural del virión, pueden tener actividad de regulación del ciclo viral como pp71 o de interferencia con la respuesta inmune del hospedero como pp65. (60,62,63) Luego debe ocurrir el trasporte viral al citoplasma atravesando la membrana nuclear, evento en el que participan las proteínas UL150 y UL53. Fuera del núcleo y en estrecha proximidad aparece el complejo de ensamblaje en el que se pueden identificar proteínas tegumentarias y proteínas de la envoltura viral como UL55 – gB, por lo que se propone que en este compartimiento termina de ensamblarse el virión y adquiere la envoltura. (60,64)

Además de UL55, otros genes L codifican para las proteínas de envoltura como UL75 – gH, UL115 – gL, UL74 – gO, UL100 – gM, UL73 – gN, UL128, UL130 y UL131A. (60)

1.5. GLICOPROTEÍNAS DE ENVOLTURA Y VARIABILIDAD GENÉTICA

De particular interés para esta revisión resultan los genes asociados a las proteínas de envoltura o glicoproteínas. El HCMV codifica para una gran variedad de estas glicoproteínas de envoltura (g) mencionadas en el apartado previo y siete de ellas: gB, gH, gL, gO, UL128, UL130 y UL131A, participan en la entrada del virus a las células. (65)

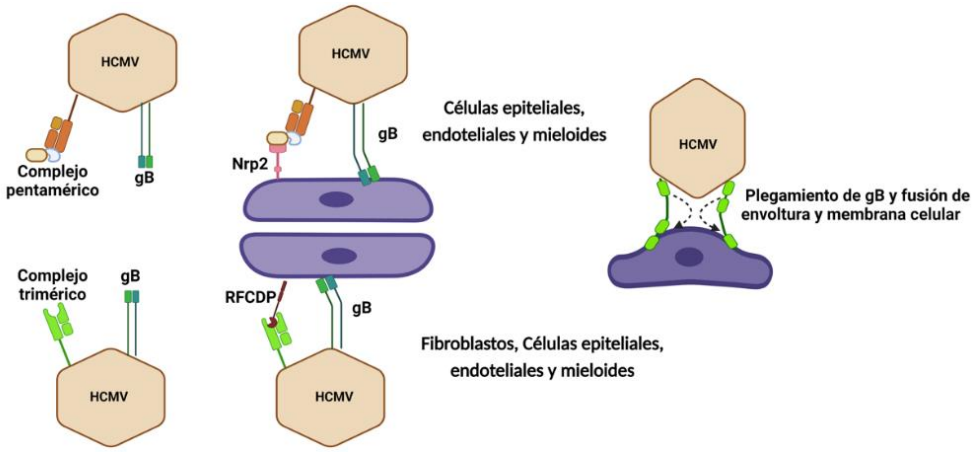
Las glicoproteínas virales de envoltura son cruciales para la infección; ya que se unen o entran en contacto con la membrana plasmática gracias al reconocimiento de receptores lo que inicia la entrada viral a la célula. Para el caso del HCMV dos complejos distintos intervienen en este proceso: Uno trimérico conformado por gO, gH-gL y/o el complejo pentamérico UL128L (UL128, UL130, UL131A) con gH-gL; (Figura 1.1.) Por medio de estudios de cristalografía se ha establecido que el complejo pentamérico tiene una estructura flexible y que puede ocurrir un reposicionamiento dinámico de sus componentes ULs, sugiriendo un mecanismo de cambios conformacionales inducidos por unión al ligando, durante la entrada a las células, seguidos de la interacción con gB para activar la fusión a la membrana celular. (66,67) Como lo muestra la Figura 1.2., se requiere la participación de gH-gL haciendo parte del complejo pentamérico o del complejo trimérico y se ha establecido que el primero participa en el tropismo por células epiteliales, endoteliales y mieloides por medio del receptor celular Neurofilina 2 (Nrp2); el complejo trimérico se une al Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas para infectar células epiteliales, endoteliales y mieloides. (67,68,69)

HCMV también utiliza proteoglicanos de heparán sulfato presentes en las membranas celulares para iniciar la unión a las células por medio de gB (70), y otras moléculas como el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (RFCE) y se ha reportado que varias de las vías de señalización activadas por HCMV son similares a las activadas por el Factor de Crecimiento Epidérmico (FCE). (71) Es de anotar que este mecanismo de entrada en el que participan gH-gL y gB es compartido por los principales miembros de la familia *Herpesviridae* como VHS-1. VHS-2 y VEB. (67)

Luego del reconocimiento, la envoltura viral se fusiona con las membranas celulares (plasmática o endosomal) para favorecer su entrada; en el caso de HCMV, la glicoproteína gB codificada por el gen UL55 participa en la unión inicial a las membranas de todos los tipos celulares y tiene actividad fusogénica, (68) comportándose como un fusógeno de membrana de Clase III, compartiendo características con las proteínas de Clase I y de Clase II ya que tiene el núcleo helicoidal del primer tipo y las horquillas internas de fusión de la Clase II. (72)

Luego de la activación de los complejos pentamérico o trimérico por unión al receptor y/o exposición a un pH ácido, ocurre el cambio conformacional de gB (Figura 1.2.), lo que permite la inserción de residuos hidrofóbicos en la membrana, seguido de un plegamiento de la molécula sobre sí misma, (Figura 1.2., flechas discontinuas) que permite la fusión de la envoltura del virus y la membrana plasmática; esta secuencia de eventos también participa en la diseminación del virus célula a célula. (67,70)

Figura 1.2. Localización y participación de los complejos pentamérico (UL128, UL130, UL131A, gH-gL), trimérico (gO, gH-gL) y de la glicoproteína gB en la unión de Citomegalovirus a las células.



En la Figura 1.2. se puede observar la localización y cambios conformacionales de los complejos pentamérico (UL128, UL130, UL131A, gH-gL), trimérico (gO, gH-gL) y de la glicoproteína gB para permitir la entrada de HCMV a las células, mediada por los receptores membranales Neurofilina 2 (Nrp2) y Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (RFCDP). (67,68) Elaborada con Biorender.

Hasta el momento se sabe que la entrada de HCMV a los fibroblastos depende de la presencia del complejo trimérico gH-gL-gO, pero este proceso en las células epiteliales y endoteliales depende principalmente del complejo pentamérico UL128L (UL128, UL130, UL131A)-gH-gL, aunque también puede participar el complejo trimérico; por lo tanto, el pasaje repetido en cultivo en fibroblastos podría llevar a disminuir o afectar el tropismo por otros tipos celulares. (65,72)

La diversidad de receptores celulares que utiliza HCMV se refleja en el amplio tropismo del virus, ya que es capaz de infectar células tanto epiteliales como mesenquimales. *In vitro* el virus infecta una gran variedad de líneas celulares como: fibroblastos -*Human Foreskin Fibroblast* (HFF)-; epitelio -*Kidney epithelial cells of African green monkey* (VERO) y *Human Epidermoid cancer cells* (HEp-2)-; Endotelio -*Human Umbilical Vein Endotelial Cells* (HUVEC)-; y monocitos/macrófagos como las *Human histiocytic cell line* (U937) y *Human monocytic cell line* (THP-1), entre otras. (73) *In vivo*, HCMV infecta células epiteliales de revestimiento de la mucosa oral y las células de glándulas salivares. Igualmente, células mesenquimales como los fibroblastos, musculares lisas y endoteliales; además de células especializadas como los hepatocitos, neumocitos, neuronas de la retina y leucocitos. (69,74) Una de las principales consecuencias de ese amplio tropismo es la posibilidad de generar enfermedad en órganos y tejidos muy distintos.
La gran variabilidad genética de HCMV se debe y afecta principalmente los genes que codifican para proteínas que regulan la unión a las células, entrada, fusión de células infectadas, replicación y diseminación del virus de célula a célula. En lo referente al comportamiento viral en cultivos celulares, deben distinguirse las cepas de HCMV que se han obtenido a partir de muestras de pacientes y han sido

pasajeadas en cultivo celular muchas veces y que se denominan cepas de laboratorio o cepas de referencia. Otras cepas han sido poco pasajeadas (5 o menos pasajes en cultivo) por lo que se denominan cepas con bajo número de pasajes.

En la Tabla 1.1. se presenta una sinopsis de las principales cepas de laboratorio, su origen, el número de pasajes en cultivo celular y algunos de los cambios genéticos descritos. Al parecer ninguna cepa de laboratorio mantiene su genoma intacto, incluyendo las denominadas de bajo número de pasajes en cultivo celular como Toledo. (35) Por ejemplo, la cepa Merlín que fue obtenida de la orina de un niño con infección congénita y que se describe como de bajo número de pasajes en cultivo celular, refleja en gran medida el genoma salvaje de Citomegalovirus; sin embargo, se ha descrito una sustitución en un único nucleótido que trunca el gen UL128. (75,76)

El cultivo de HCMV a partir de cepas o aislados clínicos se lleva a cabo usualmente en Fb, para luego infectar otros tipos celulares; de esta forma se ha evaluado la dinámica mutacional de HCMV obtenido de muestras clínicas. Los Fb son altamente permisivos al virus y permiten su crecimiento; uno de los trabajos en los que se evaluaron las alteraciones genéticas se basó en la infección inicial de Fb, con posterior recolección de los sobrenadantes con los que se infectaron endoteliocitos y células epiteliales, empleando el método de pasajeo colateral (infecciones simultáneas en distintos tipos celulares utilizando un virus ampliado pocas veces). De esta forma y luego de un análisis de secuencias de ADN se reportaron mutaciones inicialmente en el gen R_L13 (entre los pasajes 8 a 16) tanto en Fb como en células endoteliales y epiteliales; más tarde aparecieron mutaciones en el locus UL128L (genes UL128, UL130 y UL131A) (pasajes 15 a 20) que se limitaron a los Fb y en el gen UL/*b′* en los pasajes 32 a 63. Fue evidente la inestabilidad del genoma de HCMV durante la adaptación al cultivo, sin importar el tipo celular o la cepa viral. (77)
En otras regiones genómicas se detectaron mutaciones esporádicas y también se identificó la pérdida del tropismo por células endoteliales y leucocitos, lo que se ha explicado por el hecho de cultivar el virus en Fb, seleccionando genes que favorecen el tropismo por estas células.(77)
Esto mismo sucede en las cepas de laboratorio como AD169 y Towne, que han sido ampliadas numerosas veces en un tipo particular de células (Fb), en las que se reportan diferencias en las secuencias respecto a los aislamientos clínicos o cepas poco pasajeadas.

Por ejemplo, se describe una gran variabilidad en la región UL/*b`* (IR_L), entre aislados clínicos y las cepas Toledo, Towne, y AD169 (78).

Tabla 1.1. Relación de cepas de Citomegalovirus humano más comúnmente empleadas en laboratorio.

Nombre	Origen	Año	N° Pasajes en cultivo celular	Modificaciones genéticas
AD169	Tejido adenoide de un niño	1956	Alto	UL/*b`* (IR_L)
Towne	Orina de un niño con infección congénita	1975	Alto	UL/*b`* (IR_L)
TB40/E	Hisopado de garganta de un receptor de trasplante de médula ósea	1999	Alto	UL26, UL69, US28, UL122
Merlín	Orina de un niño con infección congénita	2000	Bajo (5 pasajes en cultivo celular)	UL128
Toledo	Orina de un niño con infección congénita	1984	Bajo (3 pasajes en cultivo celular)	UL/*b`* (IR_L)
Fix (VR1814)	Secreciones de cuello uterino de gestante con infección primaria	2001	Bajo	No reportados

La cepa Toledo se considera de bajo número de pasajes en cultivo celular y en análisis de su genoma se han encontrado segmentos de ADN de entre 13 a 15 kpb, que no han sido encontrados en las cepas Towne y AD169; también se ha observado que la cepa Towne contiene un segmento de ADN de 4.7 kpb que no se detectó en la cepa AD169. El estudio de aislados clínicos muestra que el virus salvaje tiene aproximadamente 220 genes que podrían perderse o sufrir re-arreglos en la región UL/*b`* durante el pasaje en cultivo celular, posiblemente afectando funciones en la replicación, latencia y patogenicidad en el hospedero humano. (78) Se sabe que la propagación de Citomegalovirus en fibroblastos lleva a la pérdida de tropismo por células endoteliales en las cepas con alto número de pasajes; por lo tanto, la recomendación en los laboratorios es usar un aislamiento con pocos pasajes en fibroblastos y luego cocultivar estas células infectadas, con células endoteliales. Esta modificación técnica demuestra que se puede mantener el tropismo no sólo por las células endoteliales sino también por los fibroblastos y otros tipos celulares. Así aparece la cepa TB40/E, adaptada al cultivo en células endoteliales desde los pasajes iniciales; sin embargo, la subsecuente propagación en otros tipos celulares ha generado variabilidad genética en derivados de la cepa original. (79,80,81)

1.6. GENOTIPOS DE HCMV Y RELACIÓN CON EL CURSO CLÍNICO

La variabilidad genética que involucra los genes que codifican para las glicoproteínas de envoltura, ha llevado al reconocimiento de genotipos de HCMV. La genotipificación se basa en el estudio de genes con alta variabilidad entre los aislados (polimorfismos), pero que entre sí se pueden agrupar permitiendo la identificación de cepas o genotipos. Para el HCMV un método común de genotipificación es el estudio del gen UL55 que codifica la glicoproteína B (gB) de la envoltura viral.(82)

Chow y Dennison (83) evaluaron 12 cepas distintas aisladas de casos clínicos y las cepas de laboratorio Towne y AD169; la región examinada mediante PCR, digestión con enzimas de restricción y secuenciación correspondió a las bases 1150-2151, codones 384-717 dentro de los que se encuentra el codón 460 que es una de las regiones más variables y es donde ocurre el clivaje proteolítico de gB. (83)

La comparación entre las cepas reveló homología en la secuencia de nucleótidos entre el 87.9% y 99.8%, pero la variabilidad genética no se distribuyó al azar y se concentró en algunas regiones por lo que estableció que las cepas clínicas y de laboratorio podrían dividirse en 4 grupos de secuencias con una similitud de 98.6% a 99.9% de nucleótidos entre las cepas clínicas dentro de cada grupo; pero al hacer comparaciones entre cepas de diferentes grupos la homología fue de 88% a 95%. También encontraron que la región amino terminal de la proteína codificada por gB se encuentra como una de 4 variantes discretas, con secuencias peptídicas características. A partir de ese trabajo se reconoció la existencia de 4 genotipos de HCMV, gB1, gB2, gB3 y gB4. (83)

Posteriormente fue descrito el genotipo gB5; la secuenciación del ADN de ocho aislados provenientes de 5 pacientes mostró sustituciones en 7 aminoácidos dentro de la región de la proteína gB. Las regiones variables estudiadas fueron el extremo 5´ de gB y la región que flanquea el sitio de clivaje de gB, la divergencia de este nuevo genotipo respecto a sus homólogos más cercanos fue mucho mayor que la divergencia encontrada entre cepas de los otros 4 genotipos. (84)

En relación con el curso clínico, HCMV es el principal patógeno viral en individuos con supresión inmunológica, como los pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), oncológicos en quimioterapia y los receptores de trasplante de órgano sólido y de precursores hematopoyéticos, entre otros. (7,85)

Se hace relevante estudiar la infección y reactivación del HCMV y su asociación con las complicaciones y en algunos casos el fracaso de los trasplantes, que se presentan en estos pacientes.

Aunque la genotipificación no es un procedimiento de rutina al evaluar la infección/reactivación de HCMV, es posible pensar que el(los) genotipo(s) que infecta(n) o se reactiva(n) en los pacientes receptores de trasplante de órgano sólido o de precursores hematopoyéticos puede(n) ser un factor clave en las manifestaciones de la enfermedad por HCMV y se asocia(n) con las complicaciones o el desenlace, por lo que se debe considerar la posibilidad de diferencias en la patogenicidad entre los genotipos reconocidos. Esta relación podría explicarse por el tropismo amplio conferido por la diversidad genética, la evasión de la respuesta inmune humoral, puesto que gB es un blanco principal de los anticuerpos neutralizantes y evasión de la respuesta inmune celular.

En la tabla 1.2. - se resumen algunos estudios en los que se ha evaluado esta posible relación, teniendo en cuenta variables como tipo de trasplante, edad de los pacientes, año y país donde se llevó a cabo la evaluación, tipo de muestra a partir de la que se hizo la genotipificación, técnica empleada, genotipo(s) encontrado(s), complicaciones, desenlace y respuesta a la terapia antiviral.
Según estos reportes, el genotipo más frecuente es gB1, representando desde el 26 hasta el 53% de los genotipos identificados en los pacientes incluidos en los diferentes estudios. (86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96) Le siguen en frecuencia gB2 y gB3; en algunos reportes el genotipo gB2 fue el más frecuente, (97,98,99) y en otro grupo de pacientes el genotipo más frecuente fue gB3. (100) El genotipo gB4 se detectó en general con la frecuencia más baja y gB5 no fue identificado en ningún estudio.

Se ha sugerido que la variabilidad genética de HCMV está asociada con el resultado clínico de la infección y se muestra una relación entre los genotipos, principalmente gB3, con el desarrollo de complicaciones como mielosupresión, enfermedad gastrointestinal, Enfermedad Injerto contra Hospedero (EICH) o con el fallecimiento del paciente. (91,93,94,95) En relación con las manifestaciones de la infección por HCMV en los receptores de trasplante se tienen en cuenta dos grupos principales: los asintomáticos (viremia sin síntomas) y los sintomáticos con síndrome asociado a HCMV, enfermedad de órgano específico o enfermedad invasiva; aunque algunos trabajos encuentran relación con algún genotipo o con las infecciones mixtas, en otros no se encuentra esa relación entre algún genotipo, las coinfecciones y el curso de la infección por HCMV en el paciente trasplantado. (86,87,88,89,92,97,100)
Excepto en el trabajo de Carraro y Granato (97) que no reportó coinfecciones o infecciones mixtas, las infecciones simultáneas con más de un genotipo o coinfecciones se identificaron con frecuencias variables; en estos casos es posible encontrar cargas virales significativamente más altas que en pacientes en los que se detecta un solo genotipo y se encuentra el retraso en el control de la viremia, asociado a una disminución de la efectividad en el tratamiento antiviral. (7,89,90,94,99,100,101)
Parece claro que HCMV sufre variaciones genéticas intra e inter-hospedero; luego de la infección primaria el virus se compartimentaliza y las condiciones propias de cada localización pueden ejercer presión llevando a la ocurrencia de modificaciones en la composición genómica. Esas condiciones dependen del tipo de célula(s) que debe infectar y en la(s) que debe replicarse en cada compartimiento y de la posibilidad de pasar a distintos compartimientos como el plasma, la saliva, la orina; la respuesta inmune también puede incidir en la ocurrencia de estos cambios. (102)
Se ha reconocido una gran variabilidad en los genes que codifican para las glicoproteínas de envoltura pero no son las únicas regiones afectadas, se ha identificado diversidad hasta en 34 marcos abiertos de lectura en muestras recolectadas en neonatos y luego de dos semanas del nacimiento, con niveles similares a los observados en virus ARN como el VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana), Dengue y West Nile y una tasa de mutaciones nuevas de $2.0x10^{-7}$ por par de bases por generación, que es 10 veces más alta que la estimada para VHS-1. (103)

También hay evidencia suficiente que demuestra la producción de cuasiespecies para HCMV (poblaciones víricas fenotípica y genotípicamente diferentes) que surgen en un individuo durante el transcurso de la infección de por vida y como ya se dijo en compartimientos anatómicos o histológicos diferentes. (102,104) La aparición de las cuasiespecies de HCMV puede responder a presiones positivas de selección cuando la población viral está bien estructurada, tiene un tamaño suficiente y pasa por los ciclos de reactivación; contribuye igualmente el hecho de que un individuo puede reinfectarse, por ejemplo, un recién nacido que se infectó *in utero* y luego vuelve a infectarse a través de la leche materna o la saliva. (102,104)
Las presiones negativas ocurren por los denominados cuellos de botella, por ejemplo, el representado por el paso del virus desde una madre infectada a través de la placenta, luego el paso a la circulación sanguínea del feto y el que puede representar el nacimiento; estos cuellos de botella son eventos en los que puede disminuir considerablemente la población viral. (102,104)
Las variaciones inter-hospedero se reflejan en la detección de los genotipos en los distintos grupos de pacientes y poblaciones evaluadas. Al parecer en todo el mundo el genotipo más común es gB1, pero en Latinoamérica, Asia y Europa, gB2 se encuentra en una proporción semejante a gB1; esto permite proponer una distribución de los genotipos determinada por factores demográficos además de las presiones debidas a las condiciones propias de cada grupo de pacientes evaluado, como la inmunosupresión o la infección congénita. (102,105)

1.7. CONCLUSIÓN

Citomegalovirus es un virus altamente prevalente en la población en general, se reconoce el papel de la saliva como una importante vía de transmisión horizontal; además, la saliva también puede ser empleada para hacer diagnóstico y seguimiento de la infección o reactivación viral.

Citomegalovirus tiene uno de los genomas virales más complejos y a pesar de tener una enzima ADN polimerasa con capacidad de corrección de errores, se reconoce una alta variabilidad genética intra e inter-hospedero y también en las cepas de laboratorio comúnmente empleadas. La diversidad genética contribuye con la patogenicidad en relación con el amplio tropismo celular y con la evasión de la respuesta inmune.
La variabilidad genética afecta principalmente las glicoproteínas de envoltura como gB; esta glicoproteína está codificada por el gen UL55 y participa en la fusión de la envoltura viral a la membrana celular posterior al reconocimiento y unión a receptores celulares. Se ha determinado la existencia de 5 variantes de gB o genotipos, siendo gB1 el que más frecuentemente se identifica. Es posible que los genotipos tengan relación con la patogenicidad viral sobre todo en pacientes inmunosuprimidos y hay evidencia que favorece esta hipótesis como también estudios donde no se ha podido demostrar esa relación. El desarrollo de técnicas de biología molecular ha facilitado la detección, cuantificación y genotipificación de Citomegalovirus a partir de distintos tipos de muestras entre esos la saliva y a pesar de la facilidad y seguridad en la obtención y procesamiento de este fluido, la saliva no se ha empleado consistentemente con este fin.

Tabla 1.2. – Relación de genotipos con el curso clínico, desenlace y respuesta a la terapia antiviral

Tipo de trasplante	Grupo etario (Años)	Año(s) y país del estudio	(n)	Tipo de muestra	Técnica para la genotipificación	Genotipos identificados (n)	Complicaciones asociadas, desenlace, respuesta a la terapia antiviral	Ref.
Renal	≥18	1996-1997 Brasil	34	Leucocitos de sangre periférica y orina, 169 muestras	PCR y ARF	gB1 (52) gB2 (26) gB3 (44) gB4 (5) Coinfección (42)	No se encontró correlación entre los genotipos y la presentación clínica de la infección por HCMV, ni entre las coinfecciones, con los casos de infección sintomática o asintomática.	(86)
Órgano sólido	≥18	1997–2001 Canadá	50	Leucocitos recuperados en sangre total	PCR anidada, ARF	gB1 (19) gB2 (9) gB3 (12) gB4 (2) Coinfección (8)	Pacientes con enfermedad sintomática por HCMV. No encontraron diferencias significativas en las complicaciones, la tasa de enfermedad recurrente o de enfermedad invasiva, la carga viral y la respuesta al tratamiento, entre los genotipos.	(87)
Renal	≥18	2000-2001 Brasil	20	Leucocitos de sangre periférica, saliva y orina	PCR anidada, ARF	gB1 (6) gB2 (8) gB3 (5) gB4 (1) Coinfección (0)	Encontraron la misma distribución de genotipos en sangre, saliva y orina. No encontraron relación de los genotipos con el curso clínico de los pacientes.	(97)
Renal	9-7	1998-2001 Brasil	71	Leucocitos de sangre periférica	PCR anidada y secuenciación	gB1 (33) gB2 (27) gB3 (1) gB4 (7) Coinfección (3)	Se diagnosticó síndrome asociado a HCMV en 51 pacientes (71.8%) pero no se encontró relación estadísticamente significativa entre los genotipos y la presentación clínica de la infección por HCMV.	(88)
Órgano sólido	≥18	2004 – 2006 Noruega, E.U., Escocia, Suiza, Italia, Turquía, Canadá, Brasil	239	Sangre total	PCR en tiempo real	gB1 (61) gB2 (23) gB3 (24) gB4 (13) Coinfección (49)	Los pacientes con D+/R+ tuvieron mayor probabilidad de presentar coinfecciones. Se determinaron cargas virales más altas y mayor dificultad en la eliminación viral en pacientes con coinfecciones, pero estos pacientes tuvieron menor riesgo de desarrollar enfermedad invasiva.	(89)

Órgano sólido	25 – 66	2003 – 2004 España	62	Plasma y células mononucleares de sangre periférica. 162 muestras	PCR múltiplex en tiempo real	gB1 (40) gB2 (34) gB3 (44) gB4 (4) Coinfección (40)	No se encontró asociación de ningún genotipo con enfermedad invasiva por HCMV. La probabilidad de enfermedad invasiva o sintomática fue mayor en los pacientes con coinfecciones. Los pacientes con coinfección desarrollaron cargas virales más altas.	(90)
Precursores hematopoyéticos	≥18	1984 – 1991 Estados Unidos	281	Cultivo positivo de sangre, orina, garganta u otro tejido.	PCR anidada, ARF	gB1 (136) gB2 (46) gB3 (69) gB4 (23) Coinfección (7)	Fallecieron 46 individuos por enfermedad asociada a HCMV, 21 con gB1, 11 con gB2, 11 con gB3, 2 con gB4 y uno con coinfección. Fallecieron 24 pacientes por mielosupresión, 4 con gB1, 15 con gB3, 4 con gB4 y uno con coinfección.	(91)
	5 - 56	2006 - 2008 Brasil	63	Saliva (36 positivos para HCMV) y sangre (52 positivos para HCMV)	PCR anidada múltiplex	SALIVA gB1 (2) gB2 (11) gB3 (6) gB4 (1) Coinfección (16) SANGRE gB1 (1) gB2 (14) gB3 (5) gB4 (3) Coinfección (29)	No se encontró relación estadística entre los genotipos y la sobrevivencia de los pacientes. Los pacientes con el genotipo gB2 en saliva tenían niveles más bajos de IL-10 y los pacientes con gB4 presentaron niveles más bajos de IFNγ e IL-1β. Los niveles reducidos de IL-1β, asociados con disminución de la sobrevivencia.	(98)
	1 – 17	2000 – 2005 México	30	Leucocitos de sangre periférica	PCR semianidada	gB1 (9) gB2 (8) gB3 (4) gB4 (1) Coinfección (8)	No fue posible establecer asociación entre los genotipos e infección sintomática, por el tamaño de la muestra.	(92)
	≥18	2007 – 2010 Brasil	49	Leucocitos recuperados de sangre total	PCR anidada, ARF y secuenciación.	gB1 (19) gB2 (17) gB3 (3) gB4 (7) Coinfección (3)	Tres pacientes con enfermedad gastrointestinal tenían gB3 (2 casos) y uno era gB1 + gB3. Se concluyó que el genotipo gB3 estaba asociado a una infección más severa y difícil de controlar.	(93)

Precursores hematopoyéticos	≥18	2004 – 2009 Polonia	30	Leucocitos recuperados de sangre total	PCR múltiplex en tiempo real	gB1 (13) gB2 (3) gB3 (5) gB4 (5) Coinfección (4) Superinfección (9)	Los genotipos gB3 y gB4 siempre fueron detectados en las coinfecciones. En esos pacientes se observó con mayor frecuencia enfermedad crónica por HCMV y EICH, cargas virales más altas y menor efectividad del tratamiento antiviral. La detección de nuevos genotipos durante el seguimiento determinó la superinfección.	(94)
	≥18	2008 – 2009 China	102	Plasma	PCR semianidada. ARF	gB1 (54) gB2 (0) gB3 (21) gB4 (0) Coinfección (27)	El genotipo gB3 se asoció con mayor dificultad para el control viral y mayor probabilidad de sufrir reactivación / reinfección que gB1. De los 66 pacientes con EICH aguda, 36 eran gB1; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos infectados con un único genotipo, comparados con los individuos que presentaron infecciones mixtas.	(95)
	2 – 21	2017 – 2018 Serbia	24	Plasma	PCR anidada múltiplex	gB1 (5) gB2 (4) gB3 (2) gB4 (7) gB5 (0) Coinfección (6)	En los pacientes con EICH el curso clínico estuvo relacionado con la reactivación de HCMV, pero no se determinó una relación estadísticamente significativa con un genotipo en particular o con las infecciones mixtas. No se observó elevación de la carga viral o empeoramiento del cuadro clínico en los pacientes con coinfecciones.	(96)
Órgano sólido y de precursores hematopoyéticos	19 – 77	1998 – 2001 Francia	64	Orina, plasma, sangre total o LBA.	PCR y DEIA	gB1 (8) gB2 (11) gB3 (14) gB4 (1) Coinfección (30)	Se observó que los pacientes con infecciones mixtas tuvieron mayor probabilidad de desarrollar enfermedad por HCMV, aumento de la tasa de rechazo del trasplante y cargas virales más altas.	(100)
Órgano sólido y precursores hematopoyéticos	≥18	2017 Italia	47	Sangre total	Análisis filogenético de máxima verosimilitud	gB1 (6) gB2 (11) gB3 (2) gB4 (7) Coinfección (28)	Los pacientes con infecciones mixtas tuvieron cargas virales más elevadas y viremia de mayor duración, pero no encontraron relación entre los genotipos y las características clínicas de los pacientes. gB4 solo se detectó en coinfecciones	(99)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa, ARF: Digestión y Análisis de Restricción de Fragmentos, D+/R+: Donante con serología positiva para HCMV/Receptor con serología positiva para HCMV, LBA: Lavado Broncoalveolar, DEIA: DNA *enzyme immunoassay*.

1.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reddehase M.J. Margaret Gladys Smith, mother of cytomegalovirus: 60th anniversary of cytomegalovirus isolation. Med Microbiol Immunol. 2015; 204(3):239-41. doi: 10.1007/s00430-015-0416-z.
2. Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. Med Microbiol Immunol. 2008; 197(2):65-73. doi: 10.1007/s00430-007-0066-x.
3. Smith M.G. Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. Proc Soc Exp Biol Med. 1954; 86(3):435-40. doi: 10.3181/00379727-86-21123.
4. Smith M.G. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. Proc Soc Exp Biol Med. 1956; 92(2):424-30. doi: 10.3181/00379727-92-22498.
5. Rowe W.P., Hartley J.W., Waterman S., Turner H.C., Huebner R.J. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. Proc Soc Exp Biol Med. 1956; 92(2):418-24.
6. Weller T.H. Review. Cytomegaloviruses: the difficult years. J Infect Dis. 1970; 122(6):532-9. doi: 10.1093/infdis/122.6.532.
7. Griffiths P., Baraniak I., Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. J Pathol. 2015; 235(2):288-97. doi: 10.1002/path.4437.
8. 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):202-13. doi: 10.1002/rmv.655.
9. Zuhair M., Smit G.S.A., Wallis G., Jabbar F., Smith C., Devleesschauwer B., Griffiths P. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. Rev Med Virol. 2019; 29(3):e2034. doi: 10.1002/rmv.2034.
10. Lachmann R., Loenenbach A., Waterboer T., Brenner N., et al. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany. PLoS One. 2018; 13(7):e0200267. doi: 10.1371/journal.pone.0200267.
11. Chen J., Hu L., Wu M., Zhong T., Zhou Y.H., Hu Y. Kinetics of IgG antibody to cytomegalovirus (CMV) after birth and seroprevalence of anti-CMV IgG in Chinese children. Virol J. 2012;9:304. doi: 10.1186/1743-422X-9-304.
12. Rawlinson W.D., Boppana S.B., Fowler K.B., Kimberlin D.W., et al. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. Lancet Infect Dis. 2017; 17(6):e177-e188. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30143-3.
13. Mussi-Pinhata M.M., Yamamoto A.Y., Moura Brito R.M., de Lima Isaac M., et al. Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. Clin Infect Dis. 2009; 49(4):522-8. doi: 10.1086/600882.
14. Lanzieri T.M., Dollard S.C., Bialek S.R., Grosse S.D. Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries. Int J Infect Dis. 2014; 22:44-8. doi: 10.1016/j.ijid.2013.12.010.

15. Ossa J.A. Arango A.E., Arango A.M., Biles 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.
16. Correa M.R., 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.
17. Lopez Mora M, Yomayusa González, N, Montero Cetina, C, Torres Serrano, R, Ibañez Pinilla, M. 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: Universidad Nacional de Colombia; 2015.
18. Arias-Murillo Y.R., Osorio-Arango K., Cortés J.A., Beltrán M. Cytomegalovirus seroprevalence in organ donors and kidney transplant recipients, Colombia, 2010-2014. Biomedica. 2016; 36(0):187-93. doi: 10.7705/biomedica.v36i0.2938.
19. Rico A, Dollard S.C., Valencia D., Corchuelo S., et al. Epidemiology of cytomegalovirus Infection among mothers and infants in Colombia. J Med Virol. 2021; 93(11):6393-6397. doi: 10.1002/jmv.26815.
20. Salamanca-Rojas S., Barahona-López N.M., Marín-Valcárcel A., Vidal-Camargo P.A., et al. Seroprevalencia de anticuerpos IgG antirubéola y anticitomegalovirus en mujeres entre 16 y 40 años residentes en Tunja, Colombia [Seroprevalence of anti-rubella and anti-cytomegalovirus IgG antibodies in women aged between 16 and 40 years, living in Tunja, Colombia]. Rev Salud Publica (Bogota). 2018; 20(4):479-483. Spanish. doi: 10.15446/rsap.V20n4.53677.
21. Pass R.F., Anderson B. Mother-to-Child Transmission of Cytomegalovirus and Prevention of Congenital Infection. J Pediatric Infect Dis Soc. 2014; 3 Suppl 1(Suppl 1):S2-6. doi: 10.1093/jpids/piu069.
22. Stagno S., Pass R.F., Dworsky M.E., Alford C.A. Jr. Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. Clin Obstet Gynecol. 1982; 25(3):563-76. doi: 10.1097/00003081-198209000-00014.
23. Reynolds D.W., Stagno S., Hosty T.S., Tiller M., Alford C.A. Jr. Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. N Engl J Med.1973; 289(1):1-5. doi: 10.1056/NEJM197307052890101.
24. Cannon M.J., Hyde T.B., Schmid D.S. Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection. Rev Med Virol. 2011; 21(4):240-55. doi: 10.1002/rmv.695.
25. Nichols W.G., Price T.H., Gooley T., Corey L., Boeckh M. Transfusion-transmitted cytomegalovirus infection after receipt of leukoreduced blood products. Blood. 2003; 101(10):4195-200. doi: 10.1182/blood-2002-10-3143.
26. Jaskula E., Dlubek D., Sedzimirska M., Duda D., et al. Reactivations of cytomegalovirus, human herpes virus 6, and Epstein-Barr virus differ with respect to risk factors and clinical outcome after hematopoietic stem cell transplantation. Transplant Proc. 2010; 42(8):3273-6. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.07.027.

27. Variend S., Pearse R.G. Sudden infant death and cytomegalovirus inclusion disease. J Clin Pathol. 1986; 39(4):383-6. doi: 10.1136/jcp.39.4.383.
28. Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. J Oral Microbiol. 2013; 5. doi: 10.3402/jom.v5i0.22766.
29. do Canto C.L, Granato C.F., Garcez E., Villas Boas L.S., et al. Cytomegalovirus infection in children with Down syndrome in a day-care center in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2000; 42(4):179-83. doi: 10.1590/s0036-46652000000400001.
30. Correia-Silva JF, Bruna-Romero O, Resende RG, Miranda LP, et al. Saliva as a source of HCMV DNA in allogeneic stem cell transplantation patients. Oral Dis. 2010; 16(2):210-6. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01637.x.
31. Bohórquez S.P., Díaz J., Rincón C.M., Estupiñán M., et al. Shedding of HSV-1, HSV-2, CMV, and EBV in the saliva of hematopoietic stem cell transplant recipients at Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia, Bogotá, D.C. Biomedica. 2016; 36(0):201-10. doi: 10.7705/biomedica.v36i0.2985.
32. Pascual T., Solano C., Torres I., Talaya A., et al. Monitoring of oral cytomegalovirus DNA shedding for the prediction of viral DNAemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. J Med Virol. 2018; 90(8):1375-1382. doi: 10.1002/jmv.25185.
33. Schottstedt V., Blümel J., Burger R., Drosten C., et al. Human Cytomegalovirus (HCMV) - Revised. Transfus Med Hemother. 2010;37(6):365-375. doi: 10.1159/000322141.
34. Roizman B., Carmichael L.E., Deinhardt F., de-The G., et al. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. Intervirology. 1981;16(4):201-17. doi: 10.1159/000149269.
35. Stern-Ginossar N., Weisburd B., Michalski A., Le V.T., Hein MY, et al. Decoding human cytomegalovirus. Science. 2012; 338(6110):1088-93. doi: 10.1126/science.1227919.
36. Yu D., Silva M.C., Shenk T. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(21):12396-401. doi: 10.1073/pnas.1635160100.
37. Mocarski E., Courcelle Ch. (2001). Cytomegaloviruses and Their Replication. In Fields Vir ology, 4th ed, vol. 2, pp. 2629–2673. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
38. Kalejta R.F. Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;325:101-15. doi: 10.1007/978-3-540-77349-8_6.
39. Al-Badr A.A., Ajarim T.D.S. Ganciclovir. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol. 2018;43:1-208. doi: 10.1016/bs.podrm.2017.12.001.
40. Rozman B., Nachshon A., Levi Samia R., Lavi M., et al. Temporal dynamics of HCMV gene expression in lytic and latent infections. Cell Rep. 2022; 39(2):110653. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110653.
41. Spector D.H. Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. Intervirology. 1996;39(5-6):361-77. doi: 10.1159/000150507.

42. Ye L., Qian Y., Yu W., Guo G., et al. Functional Profile of Human Cytomegalovirus Genes and Their Associated Diseases: A Review. Front Microbiol. 2020; 11:2104. doi: 10.3389/fmicb.2020.02104.
43. McCormick A.L., Smith V.L.., Chow D., Mocarski E.S. Disruption of mitochondrial networks by the human cytomegalovirus UL37 gene product viral mitochondrion-localized inhibitor of apoptosis. J Virol. 2003; 77(1):631-41. doi: 10.1128/jvi.77.1.631-641.2003.
44. Stenberg R.M., Witte P.R., Stinski M.F. Multiple spliced and unspliced transcripts from human cytomegalovirus immediate-early region 2 and evidence for a common initiation site within immediate-early region 1. J Virol. 1985; 56(3):665-75. doi: 10.1128/JVI.56.3.665-675.1985.
45. Stenberg R.M., Depto A.S., Fortney J., Nelson J.A. Regulated expression of early and late RNAs and proteins from the human cytomegalovirus immediate-early gene region. J Virol. 1989; 63(6):2699-708. doi: 10.1128/JVI.63.6.2699-2708.1989.
46. Collins-McMillen D., Kamil J., Moorman N., Goodrum F. Control of Immediate Early Gene Expression for Human Cytomegalovirus Reactivation. Front Cell Infect Microbiol. 2020; 10:476. doi: 10.3389/fcimb.2020.00476.
47. Boshart M., Weber F., Jahn G., Dorsch-Häsler K., et al. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. Cell. 1985; 41(2):521-30. doi: 10.1016/s0092-8674(85)80025-8.
48. Scherer M., Klingl S., Sevvana M., Otto V., et al. Crystal structure of cytomegalovirus IE1 protein reveals targeting of TRIM family member PML via coiled-coil interactions. PLoS Pathog. 2014; 10(11):e1004512. doi: 10.1371/journal.ppat.1004512.
49. Greaves R.F., Mocarski E.S. Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant. J Virol. 1998; 72(1):366-79. doi: 10.1128/JVI.72.1.366-379.1998.
50. Gawn J.M., Greaves R.F. Absence of IE1 p72 protein function during low-multiplicity infection by human cytomegalovirus results in a broad block to viral delayed-early gene expression. J Virol. 2002; 76(9):4441-55. doi: 10.1128/jvi.76.9.4441-4455.2002.
51. Ahn J.H., Hayward G.S. The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. J Virol. 1997; 71(6):4599-613. doi: 10.1128/JVI.71.6.4599-4613.1997.
52. Marchini A, Liu H, Zhu H. Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes. J Virol. 2001; 75(4):1870-8. doi: 10.1128/JVI.75.4.1870-1878.2001.
53. White EA, Spector DH. Early viral gene expression and function. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, et al., editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. Chapter 18. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47437/

54. Weiland K.L, Oien N.L., Homa F., Wathen M.W. Functional analysis of human cytomegalovirus polymerase accessory protein. Virus Res. 1994; 34(3):191-206. doi: 10.1016/0168-1702(94)90124-4.
55. McMahon T.P., Anders D.G. Interactions between human cytomegalovirus helicase-primase proteins. Virus Res. 2002; 86(1-2):39-52. doi: 10.1016/s0168-1702(02)00054-0.
56. Chambers J., Angulo A., Amaratunga D., Guo H., Jiang Y., et al. DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. J Virol. 1999; 73(7):5757-66. doi: 10.1128/JVI.73.7.5757-5766.1999.
57. Anders D.G., Irmiere A., Gibson W. Identification and characterization of a major early cytomegalovirus DNA-binding protein. J Virol. 1986; 58(2):253-62. doi: 10.1128/JVI.58.2.253-262.1986.
58. Spector D.J., Tevethia M.J. Protein-protein interactions between human cytomegalovirus IE2-580aa and pUL84 in lytically infected cells. J Virol. 1994; 68(11):7549-53. doi: 10.1128/JVI.68.11.7549-7553.1994.
59. Xu Y., Colletti K.S., Pari G.S. Human cytomegalovirus UL84 localizes to the cell nucleus via a nuclear localization signal and is a component of viral replication compartments. J Virol. 2002; 76(17):8931-8. doi: 10.1128/jvi.76.17.8931-8938.2002.
60. Anders DG, Kerry JA, Pari GS. DNA synthesis and late viral gene expression. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, et al., editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. Chapter 19. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47419/
61. Gibson W. Structure and assembly of the virion. Intervirology. 1996;39(5-6):389-400. doi: 10.1159/000150509.
62. Baldick C.J. Jr, Marchini A., Patterson C.E., Shenk T. Human cytomegalovirus tegument protein pp71 (ppUL82) enhances the infectivity of viral DNA and accelerates the infectious cycle. J Virol. 1997; 71(6):4400-8. doi: 10.1128/JVI.71.6.4400-4408.1997.
63. Browne E.P., Shenk T. Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(20):11439-44. doi: 10.1073/pnas.1534570100.
64. Sanchez V., Greis K.D., Sztul E., Britt W.J. Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. J Virol. 2000; 74(2):975-86. doi: 10.1128/jvi.74.2.975-986.2000.
65. Vanarsdall A.L., Johnson D.C. Human cytomegalovirus entry into cells. Curr Opin Virol. 2012; 2(1):37-42. doi: 10.1016/j.coviro.2012.01.
66. Chandramouli S., Malito E., Nguyen T., Luisi K., et al. Structural basis for potent antibody-mediated neutralization of human cytomegalovirus. Sci Immunol. 2017; 2(12):eaan1457. doi: 10.1126/sciimmunol.aan1457.
67. Connolly S.A., Jardetzky T.S., Longnecker R. The structural basis of herpesvirus entry. Nat Rev Microbiol. 2021; 19(2):110-121. doi: 10.1038/s41579-020-00448-w.

68. Sathiyamoorthy K., Chen J., Longnecker R., Jardetzky T.S. The COMPLEXity in herpesvirus entry. Curr Opin Virol. 2017; 24:97-104. doi: 10.1016/j.coviro.2017.04.006.
69. Gerna G., Kabanova A., Lilleri D. Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Host Cell Receptors. Vaccines (Basel). 2019; 7(3):70. doi: 10.3390/vaccines7030070.
70. Boyle K.A., Compton T. Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. J Virol. 1998; 72(3):1826-33. doi: 10.1128/JVI.72.3.1826-1833.1998.
71. Wang X., Huong S.M., Chiu M.L., Raab-Traub N., Huang E.S. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. Nature. 2003; 424(6947):456-61. doi: 10.1038/nature01818.
72. Cooper R.S., Heldwein E.E. Herpesvirus gB: A Finely Tuned Fusion Machine. Viruses. 2015; 7(12):6552-69. doi: 10.3390/v7122957.
73. Nowlin D.M., Cooper N.R., Compton T. Expression of a human cytomegalovirus receptor correlates with infectibility of cells. J Virol. 1991; 65(6):3114-21. doi: 10.1128/JVI.65.6.3114-3121.1991.
74. Sinzger C., Digel M., Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;325:63-83. doi: 10.1007/978-3-540-77349-8_4.
75. Dolan A., Cunningham C., Hector R.D., Hassan-Walker A.F., et al. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. J Gen Virol. 2004; 85(Pt 5):1301-1312. doi: 10.1099/vir.0.79888-0.
76. Wilkinson G.W., Davison A.J., Tomasec P., Fielding C.A., et al. Human cytomegalovirus: taking the strain. Med Microbiol Immunol. 2015; 204(3):273-84. doi: 10.1007/s00430-015-0411-4.
77. Dargan D.J., Douglas E., Cunningham C., Jamieson F., et al. Sequential mutations associated with adaptation of human cytomegalovirus to growth in cell culture. J Gen Virol. 2010; 91(Pt 6):1535-46. doi: 10.1099/vir.0.018994-0.
78. Cha T.A., Tom E., Kemble G.W., Duke G.M., et al. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. J Virol. 1996; 70(1):78-83. doi: 10.1128/JVI.70.1.78-83.1996.
79. MacCormac LP, Grundy JE. Two clinical isolates and the Toledo strain of cytomegalovirus contain endothelial cell tropic variants that are not present in the AD169, Towne, or Davis strains. J Med Virol. 1999; 57(3):298-307. doi: 10.1002/(sici)1096-9071(199903)57:3<298::aid-jmv14>3.0.co;2-p.
80. Sinzger C, Schmidt K, Knapp J, Kahl M, Beck R, Waldman J, Hebart H, Einsele H, Jahn G. Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. J Gen Virol. 1999; 80 (Pt 11):2867-2877. doi: 10.1099/0022-1317-80-11-2867.
81. Al Qaffas A., Camiolo S., Vo M., Aguiar A., et al. Genome sequences of human cytomegalovirus strain TB40/E variants propagated in fibroblasts and epithelial cells. Virol J. 2021; 18(1):112. doi: 10.1186/s12985-021-01583-3.
82. Wille P.T., Wisner T.W., Ryckman B., Johnson D.C. Human cytomegalovirus (HCMV) glycoprotein gB promotes virus entry in trans acting as the viral fusion protein rather than as a receptor-binding protein. mBio. 2013; 4(3):e00332-13. doi: 10.1128/mBio.00332-13.

83. Chou S.W., Dennison K.M. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. J Infect Dis. 1991; 163(6):1229-34. doi: 10.1093/infdis/163.6.1229.
84. Shepp DH, Match ME, Lipson SM, Pergolizzi RG. A fifth human cytomegalovirus glycoprotein B genotype. Res Virol. 1998; 149(2):109-14. doi: 10.1016/s0923-2516(98)80086-1.
85. Ariza-Heredia E.J., Nesher L., Chemaly R.F. Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: a mini-review. Cancer Lett. 2014; 342(1):1-8. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.004.
86. Aquino V.H., Figueiredo L.T. High prevalence of renal transplant recipients infected with more than one cytomegalovirus glycoprotein B genotype. J Med Virol. 2000; 61(1):138-42.
87. Humar A., Kumar D., Gilbert C., Boivin G. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotypes and response to antiviral therapy, in solid-organ-transplant recipients with CMV disease. J Infect Dis. 2003; 188(4):581-4. doi: 10.1086/377002.
88. Nogueira E., Ozaki K.S., Tomiyama H., Câmara N.O., Granato C.F. Clinical correlations of human cytomegalovirus strains and viral load in kidney transplant recipients. Int Immunopharmacol. 2009; 9(1):26-31. doi: 10.1016/j.intimp.2008.08.020.
89. Manuel O., Asberg A., Pang X., Rollag H., et al. Impact of genetic polymorphisms in cytomegalovirus glycoprotein B on outcomes in solid-organ transplant recipients with cytomegalovirus disease. Clin Infect Dis. 2009; 49(8):1160-6. doi: 10.1086/605633.
90. Barrado L., Prieto C., Hernando S., Folgueira L. Detection of glycoproteins B and H genotypes to predict the development of Cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. J Clin Virol. 2018; 109:50-56. doi: 10.1016/j.jcv.2018.11.001.
91. Torok-Storb B., Boeckh M., Hoy C., Leisenring W., Myerson D, Gooley T. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation. Blood. 1997; 90(5):2097-102.
92. González-Ramírez J., Uribe-Gutiérrez G., Jiménez-Hernandez E., Velázquez-Guadarrama N., et al. Cytomegalovirus gB genotype distribution in Mexican children undergoing allogeneic bone marrow transplantation. Intervirology. 2012;55(4):318-20. doi: 10.1159/000328665.
93. Dieamant D.C., Bonon S.H., Peres R.M., Costa C.R., et al. Cytomegalovirus (CMV) genotype in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. BMC Infect Dis. 2013; 13:310. doi: 10.1186/1471-2334-13-310.
94. Zawilinska B., Szostek S., Kopec J., Piatkowska-Jakubas B., Kosz-Vnenchak M. Multiplex real-time PCR to identify a possible reinfection with different strains of human cytomegalovirus in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. Acta Biochim Pol. 2016;63(1):161-166. doi: 10.18388/abp.2015_1162.
95. Xia C.S., Zhao X.T., Sun Y.Y., Zhang Z. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Chinese hematopoietic stem cell transplant recipients. Intervirology. 2012;55(5):342-8. doi: 10.1159/000330303.

96. Janković M., Ćupić M., Knežević A., Vujić D., et al. Cytomegalovirus glycoprotein B and N genotypes in pediatric recipients of the hematopoietic stem cell transplant. Virology. 2020; 548:168-173. doi: 10.1016/j.virol.2020.07.010.
97. Carraro E., Granato C.F. Single human cytomegalovirus gB genotype shed in multiple sites at the time of diagnosis in renal transplant recipients. J Med Virol. 2003; 70(2):240-3. doi: 10.1002/jmv.10383.
98. Correia-Silva J.F., Resende R.G., Arão T.C., Abreu M.H., et al. HCMV gB genotype and its association with cytokine levels in hematopoietic stem cell transplantation. Oral Dis. 2011; 17(5):530-7. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01801.x.
99. Ciotti M., Cella E., Rittà M., Ciccozzi M., Cavallo R., et al.. Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotype Distribution in Italian Transplant Patients. Intervirology. 2017;60(4):165-170. doi: 10.1159/000486593.
100. Coaquette A., Bourgeois A., Dirand C., Varin A., Chen W., Herbein G.. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. Clin Infect Dis. 2004; 39(2):155-61. doi: 10.1086/421496.
101. Pang X., Humar A., Preiksaitis J.K. Concurrent genotyping and quantitation of cytomegalovirus gB genotypes in solid-organ-transplant recipients by use of a real-time PCR assay. J Clin Microbiol. 2008; 46(12):4004-10. doi: 10.1128/JCM.01341-08.
102. Sackman A.M., Pfeifer S.P., Kowalik T.F., Jensen J.D. On the Demographic and Selective Forces Shaping Patterns of Human Cytomegalovirus Variation within Hosts. Pathogens. 2018; 7(1):16. doi: 10.3390/pathogens7010016.
103. Renzette N., Gibson L., Bhattacharjee B., Fisher D., et al. Rapid intrahost evolution of human cytomegalovirus is shaped by demography and positive selection. PLoS Genet. 2013;9(9):e1003735. doi: 10.1371/journal.pgen.1003735.
104. Lauring A.S. Within-Host Viral Diversity: A Window into Viral Evolution. Annu Rev Virol. 2020; 7(1):63-81. doi: 10.1146/annurev-virology-010320-061642.
105. Wang H.Y, Valencia S.M., Pfeifer S.P., Jensen J.D., et al. Common Polymorphisms in the Glycoproteins of Human Cytomegalovirus and Associated Strain-Specific Immunity. Viruses. 2021; 13(6):1106. doi: 10.3390/v13061106.

2. ESTABLECIMIENTO DE LATENCIA DE CITOMEGALOVIRUS EN CÉLULAS DE LA LINEA MIELOIDE: INTERACCIONES VIRALES Y CELULARES

Desde que se comenzó el estudio de las infecciones por virus de la familia *Herpesviridae* se ha reconocido un atributo relevante y es el establecimiento de latencia; esta situación implica que luego de la infección inicial estos virus van a persistir de por vida en el individuo infectado y van a producirse reactivaciones que pueden facilitar la transmisión a otros hospederos y la diseminación intra-hospedero. El establecimiento de latencia y la reactivación dependen de la interacción entre factores virales y celulares que determinan el curso de la infección.

La infección primaria con HCMV en células epiteliales y fibroblastos, entre otras, sucede luego de la interacción de la glicoproteína B con los receptores celulares. Posteriormente, durante la replicación viral se afecta la arquitectura y fisiología celulares, lo cual, junto con la respuesta inmune innata desencadena la muerte de las células infectadas. Sin embargo, en algunos tipos celulares en nichos específicos, como la médula ósea hematopoyética, el ciclo replicativo no llega a completarse y ocurre apagamiento de la transcripción de los genes virales relacionados con el ciclo replicativo, en su orden Inmediatamente tempranos (IE), Tempranos (E) y Tardíos (L). El genoma persiste en el núcleo celular como un episoma (elemento genético replicante extracromosómico), estableciendo de esta forma una infección latente de por vida. (1,2)

El estado de latencia se puede definir como la persistencia del material genético viral con expresión de algunos genes, pero sin que ocurra la replicación, es decir que no hay ciclo lítico y no se producen nuevas partículas virales infecciosas. (1,2) Las células que soportan la infección latente de Citomegalovirus son principalmente las células madre, progenitoras hematopoyéticas, pluripotenciales, CD34+ residentes en la médula ósea, que dan origen al linaje mieloide culminando con la diferenciación de monocitos CD14+ de sangre periférica a macrófagos o células dendríticas. (3,4)

Las células madre y precursoras hematopoyéticas (CMPH) expresan en su membrana el marcador de superficie celular *Cluster Differentiation* 34 (CD34); este marcador es una fosfoglicoproteína transmembrana, identificada inicialmente en CMPH, que también se encuentra en células progenitoras fuera de la médula ósea y en células endoteliales maduras. En la clínica de los trasplantes de precursores hematopoyéticos, el marcador CD34 tiene gran importancia porque se ha utilizado para identificar y aislar CMPH del donante, previo al trasplante. (5,6)

Se ha evidenciado experimentalmente y en el trasplante de precursores hematopoyéticos que la proteína CD34 participa en la proliferación de CMPH para mantener la población y funciona en la diferenciación y proliferación de las líneas mieloide y eritroide; además, puede inhibir o promover la migración de CMPH por interacciones directas con selectinas endoteliales. (5,7)

Para que se pueda establecer la infección latente luego de la infección de las células CD34+ por HCMV, estos precursores hematopoyéticos deben ser infectados en las

etapas más tempranas cuando se expresa mayoritariamente el marcador CD34, antes de que se inicie la diferenciación celular. (8) En estudios *in vitro* se ha establecido que la entrada de HCMV a las células CD34+ y a las células de la línea THP-1 ocurre por macropinocitosis, aunque el mecanismo de ingreso a las células no determina por sí mismo el establecimiento de latencia. Luego del ingreso de HCMV, proteínas del tegumento como pp150 salen de los endosomas y el genoma viral asociado a pp150 debe transportarse hasta el núcleo para iniciar el programa de latencia en esas células. (9,10)

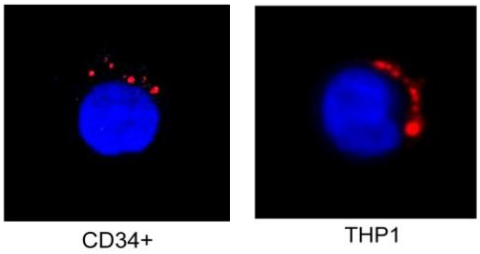
Otras proteínas tegumentarias como pp28, pp65 y pp71 persisten en el citoplasma asociadas a los endosomas, pero en células como los fibroblastos en los que ocurre el ciclo lítico, la proteína pp71 se localiza en el núcleo aproximadamente a las 4 horas de la infección. (9)

Ya en el núcleo, el establecimiento de latencia en las células CD34+ depende en gran medida del silenciamiento de MIEP (*Major Immediate Early Promoter*), el promotor que inicia el ciclo replicativo activando la transcripción de los genes inmediatamente tempranos IE 1/2. Hay varios factores tanto virales como celulares que pueden regular el silenciamiento de MIEP; dentro de los más estudiados está la interacción entre la proteína pp71 del tegumento viral y la proteína Daxx, un correpresor transcripcional celular que hace parte del cuerpo nuclear junto con PML (Proteína de la Leucemia Promielocítca), y considerado como componente de la respuesta inmune intracelular. La proteína pp71 es uno de los transactivadores conocidos de MIEP y debe llegar hasta el núcleo para que pueda iniciar la activación del promotor de IE1/2. Se sabe que si pp71 ingresa al núcleo se asocia con Daxx, induciendo su degradación por proteasoma y desencadenando la transcripción de IE1; en células con infección latente los niveles intranucleares de Daxx se mantienen elevados y se reprime la transcripción de IE1. (11) Las células diferenciadas como los fibroblastos expresan uno o más factores que facilitan la importación de pp71 al núcleo, activando el ciclo lítico de HCMV, contrario a lo que sucede con CMPH en las que pp71 permanece en el citoplasma y en las que no se detectan los factores asociados con la importación de esta proteína tegumentaria. (12)

La infección *in vitro* de células CD34+ primarias y células THP-1 no diferenciadas, con la cepa AD169 de Citomegalovirus, permite observar la proteína pp71 en el citoplasma asociada a los endosomas, compatible con el establecimiento de latencia (Figura 2.1.); la detección citoplasmática de pp71 se observó en el 99% de las células CD34+ y en el 96% de las células THP-1. (10) Al mismo tiempo, factores celulares reprimen la transcripción de MIEP al mantener un fenotipo represivo de la cromatina; el resultado es el silenciamiento del principal promotor del ciclo lítico de Citomegalovirus. (13) Las modificaciones postraduccionales de las histonas son cruciales en el control de la transcripción génica y en particular en lo referente a la infección por HCMV. En CMPH las proteínas histonas son reclutadas a la región del genoma donde se encuentra MIEP y son metiladas para reprimir su transcripción, al tiempo que las enzimas deacetilasas de histonas (HDAC) también se encargan

de mantener el estado deacetilado, contribuyendo a la ausencia de transcripción de MIEP y con evidencia de heterocromatinización del ADN viral. (14,15)

Figura 2.1. Localización de la proteína pp71 en células CD34+ y células THP-1



Células CD34+ y células THP-1 no diferenciadas, infectadas con la cepa AD169 de Citomegalovirus humano con una MOI de 3. Las células fueron procesadas para inmunofluorescencia; la proteína pp71 aparece en rojo y el núcleo en azul. (10)

Se ha demostrado que esta región del genoma de HCMV tiene sitios de unión para activadores celulares de la transcripción como el Factor Nuclear kappa B (NF-ƙB) y también para represores de la transcripción como Ying-Yang 1 (YY1) y el Factor de crecimiento independiente 1 (Gfi-1); estos hallazgos pueden explicar el control de la transcripción de MIEP dependiente del fenotipo celular, seguramente en las células no permisivas para el ciclo replicativo predomina el efecto de factores represores. (14)

Otro mecanismo por el cual se controla la replicación viral y se mantiene el estado de infección latente en las células CD34+ es a través de la secreción de Factor de Crecimiento Transformador Beta (FCTβ); en las células infectadas la secreción de FCTβ inhibe de manera autocrina la acción del mismo por inhibir la diferenciación celular, mientras que en las células no infectadas el efecto paracrino de FCTβ reprime la mielopoyesis, contribuyendo con la mielosupresión asociada a las infecciones por HCMV *in vivo*. (16)

En cuanto al perfil de expresión génica viral durante la latencia, no hay una región específica del genoma viral dedicada a mantener ese estado; por el contrario, ocurre transcripción de genes a partir de regiones independientes probablemente regulada por promotores diferentes. (17) Es claro que los genes expresados durante la latencia difieren en su mayor parte de los que se expresan durante las fases del ciclo lítico; aparte del establecimiento de latencia, este hecho puede influir en la supresión de la respuesta inmune hacia las células que soportan la infección latente, porque las proteínas del ciclo replicativo son las que más se asocian con la inducción de respuesta inmune. (17)

Se define como una marca del estado de infección latente la ausencia de la transcripción de los genes IE1/2 y, por otro lado, la transcripción de los genes UL138, UL111A (gen que codifica para la Interleucina 10 viral, (vIL-10) LUNA (*Latency Unique Natural Antigen*) codificada en el gen UL81-82ast (Transcrito antisentido), US28, UL144 y ARNs no codificantes 2.7 y 4.9. Sin embargo, en distintos trabajos se ha podido evidenciar que por ejemplo en fibroblastos (Fb)

ocurre la expresión de algunos de los genes relacionados con la latencia durante el ciclo lítico y que en monocitos puede ocurrir transcripción de genes Inmediatamente tempranos (IE), Tempranos (E) y Tardíos (L) lo que sugiere que el establecimiento y mantenimiento de latencia requiere la interacción de los factores celulares y virales y depende del tipo celular, para determinar si en las células infectadas persiste ese estado o, por el contrario, ocurre la reactivación viral. (3,4,18,19,20)

Respecto a los genes de HCMV asociados a latencia destaca el gen UL138, este gen se encuentra en la región UL/*b´* que codifica desde UL133 hasta UL151, región que se ha asociado específicamente con la latencia. El locus UL133 – UL138 (UL133, UL135, UL136 y UL138), se describe como policistrónico y se reconocen al menos 8 trascritos diferentes. (21) Cabe recordar que gran parte de la región UL/*b´* en las cepas AD169 y Towne se ha perdido, durante el alto número de pasajes en cultivo de Fb, lo que explica, al menos parcialmente, la permisividad de estas células para la replicación viral y la ausencia de infección latente. (22)
Algunas proteínas codificadas en este locus parecen relacionarse con la reactivación y la evidencia sugiere una función antagónica entre UL135 y UL138, ya que el primer gen promueve la replicación viral y el segundo se asocia con el establecimiento de latencia. (21) Debe notarse que la función ejercida por estos genes puede depender o ser regulada por el tipo específico de célula, con claras diferencias entre los precursores hematopoyéticos CD34+, Fb y las células endoteliales (CE), principalmente en la regulación de la expresión de genes virales. (21) Así, análisis *in vitro* han mostrado que en Fb el locus UL133 – UL138 no se requiere para que ocurra el ciclo replicativo, pero tampoco lleva al establecimiento de latencia; por el contrario, en células precursoras hematopoyéticas CD34+ inhibe la replicación viral y favorece el establecimiento de latencia y en CE también parece promover la replicación viral; sugiriendo que este locus modula la progresión de la infección por HCMV según el tipo celular, grado de diferenciación y el contexto biológico. (21,23)

Retomando el silenciamiento de MIEP, se ha atribuido a UL138 un papel principal, actuando como un freno de la replicación viral; la proteína UL138 (pUL138) promueve la metilación H3K9 de la Histona 3, que lleva a la formación y mantenimiento de la heterocromatina asociada a MIEP. Otro efecto de pUL138 en las células mieloides indiferenciadas tiene que ver con las enzimas demetilasas, ya que impide la asociación de estas a MIEP; las enzimas demetilasas específicas de lisina eliminan las modificaciones epigenéticas represivas de las histonas, favoreciendo la transcripción de los genes IE. (24) Las proteínas de la fase lítica viral inducen inmunidad innata y adquirida, por consiguiente, el apagamiento de la expresión de las proteínas del ciclo replicativo es una vía para inhibir el reconocimiento de las células con infección latente por el sistema inmunológico, preservando las células que portan el genoma viral. (24)
El gen US28 de HCMV codifica una proteína que actúa como receptor acoplado a proteína G, e interactúa con quimiocinas como RANTES, MCP-1, MCP-3, MIP-1α y MIP-1β. (25,26) En las células THP-1 infectadas con la cepa Toledo se ha demostrado la transcripción de US28, al 8 dpi., sin producción de partículas virales infecciosas y sin transcripción de genes asociados al ciclo replicativo como UL54.

Al parecer, este perfil de expresión génica tiene relación con el grado de diferenciación celular, ya que en líneas celulares como la K562 (células precursoras hematopoyéticas, pluripotentes), la KG1a (células semejantes a las CD34+ de médula ósea), HL-60 (células progenitoras de granulocitos y monocitos) y la U937 (línea promonocítica) no se detecta la transcripción de US28. (27) Se propone entonces que la función de US28 es promover la adhesión de los monocitos CD14+ circulantes al endotelio, facilitando el paso de las células infectadas a compartimientos anatómicos o celulares en los que puede ocurrir la diferenciación celular a macrófagos o células dendríticas, la reactivación del ciclo lítico y la replicación viral. (27)

En el mismo sentido, se ha podido determinar que las mutaciones en los genes UL138 y US28 no afectan la expresión génica de HCMV o la replicación viral en Fb, pero en células progenitoras hematopoyéticas la expresión de genes y la replicación viral se incrementan, dando a entender que UL138 y US28 tienen un papel de regulación negativa sobre la replicación en CMPH, el principal sitio de latencia de HCMV. (2)

Similarmente, se han observado diferencias al comparar el efecto producido por cepas con bajo número de pasajes en cultivo como Toledo y Fix que conservan la región UL/*b´*, donde se encuentra UL138, respecto a cepas como Towne y AD169, altamente pasajeadas. Al infectar células CD34+, se encontró que en las células infectadas con las cepas Toledo y Fix se estableció un estado consistente con la latencia, con apagamiento de la expresión de los genes característicos del ciclo replicativo - IE1/2 - hacia el 8 dpi., que se mantuvo hasta el día 20. Por el contrario, en las células infectadas con cepas de laboratorio altamente pasajeadas se evidenció expresión génica al 20 dpi., compatible con el ciclo lítico y asociada con la carga viral detectada. (28) Mientras que los monocitos CD14+ de donantes sanos, infectados con la cepa FIX, mostraron un comportamiento similar con detección de trascritos asociados a latencia hasta por 25 dpi. (29)

La IL-10 celular (cIL-10) es reconocida por su función en el control de las respuestas inflamatorias e inmunológicas a través de la supresión de citocinas secretadas por los linfocitos T helper 1 (Th1) como Interferón gamma (IFNγ) e interleucina 2 (IL-2) y la inhibición de la presentación de antígenos por macrófagos y células dendríticas. Las principales fuentes celulares de cIL-10 son los linfocitos T helper 2 (Th2), células T reguladoras Th17, monocitos, macrófagos y linfocitos B. (30)

El gen UL111A de HCMV codifica dos homólogos virales de la citocina IL-10, el primero es una proteína de 175 aminoácidos la IL-10 viral (vIL-10), que se sabe aparece durante el ciclo lítico. (31) La proteína vIL-10 ha sido identificada en el plasma de donantes sanos seropositivos para HCMV, en concentraciones más altas que la cIL-10, lo mismo que anticuerpos anti vIL-10, con capacidad neutralizante. (32)

Durante los estados de latencia viral en progenitores de granulocitos y macrófagos, aparece el segundo homólogo por *splicing* alternativo a partir de la región denominada UL111.5A, la proteína de 139 aminoácidos IL-10 viral asociada a la latencia (LAvIL-10); el trascrito ha sido detectado no sólo *in vitro* en precursores

hematopoyéticos infectados con cepas virales de bajo y alto número de pasajes, sino también en células precursoras hematopoyéticas y mononucleares de sangre periférica de donantes sanos y durante el ciclo lítico. (32,33) La proteína LAvIL-10 puede contribuir en la inhibición del reconocimiento y subsecuente eliminación de las células que soportan la infección latente por el sistema inmunológico, moldeando el microambiente para favorecer la latencia, persistencia y/o reactivación viral, según el contexto celular y tisular; por ejemplo, aunque los antígenos virales producidos durante la infección lítica y en latencia pueden estimular a los linfocitos TCD4+, las subpoblaciones estimuladas durante la latencia ejercen un efecto inmunosupresor porque secretan la cIL-10. (33,33,34)

LUNA (*Latency Unique Natural Antigen*), es una proteína de 133 aminoácidos producida por una transcripción antisentido (ast) del segmento génico UL81-82. El trascrito fue identificado a partir de monocitos de sangre periférica de un donante sano y de 5 donantes de médula ósea, seropositivos para HCMV. En las células de estos individuos se pudo comprobar que no había transcripción de genes estructurales o inmediatamente tempranos, asociados a la infección productiva. (18) También se han detectado anticuerpos anti-LUNA en donantes sanos, seropositivos, dando a entender que hay síntesis de esta proteína *in vivo*. (35) Es de resaltar que el gen UL82 codifica para la proteína pp71 que, como ya se mencionó, es un transactivador de la expresión de MIEP. Es posible que LUNA esté involucrada en el control postrascripcional de UL82, afectando la estabilidad del mARN o su traducción, por lo tanto, ejerciendo regulación sobre la reactivación desde la latencia y la ocurrencia del ciclo lítico. (18) El trascrito antisentido de UL81-82 y la proteína también han sido detectados *in vitro* en Fb, durante las primeras horas posinfección, pero al parecer sin un efecto sobre la continuidad del ciclo lítico. (18)

La evaluación *in vitro* de las células CD34+ infectadas con HCMV mostró positividad para el trascrito de UL81-82ast a las 24 hpi.; estas células fueron estimuladas para diferenciarse a células dendríticas, que aún inmaduras, seguían siendo positivas para LUNA. Luego, al estimular las células dendríticas con LPS (Lipopolisacárido, componente de la pared de bacterias Gram negativas) y lograr su diferenciación final, el trascrito UL81-82ast disminuyó y al día 9 posinfección ya no se detectó. (19)

En células CD34+ y células mononucleares CD14+ de sangre periférica de donantes sanos seropositivos se ha detectado el ARN del gen UL138, sin detectar ARN de IE1, corroborando el estado de infección latente y apagamiento de la expresión de genes asociados a la replicación viral. (28)

Desde hace varios años se sabe que los monocitos CD14+ constituyen un nicho celular de latencia o persistencia para HCMV; la infección *in vitro* de monocitos CD14+ obtenidos de donantes sanos muestra que en estas células el virus entra en el estado de latencia a las 24 hpi. con rápida expresión de los genes asociados como UL138, US28, LUNA, vIL-10 y RNA 2.7 entre otros, y ausencia de la

transcripción de genes asociados al ciclo replicativo como IE1, IE2 y pp65, entre el día 1 y el día 3 pi. (20,29)

En estas mismas células, se ha logrado la reactivación del ciclo lítico luego de estimulación en cultivo, por ejemplo, con células de otros donantes (estimulación alogénica); este tipo de estudios hizo evidente que la reactivación ocurre luego de la diferenciación de los monocitos a macrófagos. Por tanto, los monocitos CD14+ que circulan en sangre periférica portan el genoma viral, no permiten el ciclo lítico, pero al ser estimulados ocurre la diferenciación a macrófagos, siendo estas células permisivas para la replicación viral. (36,37) Según los estímulos a los que son sometidas las células CD14+ infectadas, también es posible la diferenciación a células dendríticas y al igual de lo que ocurre con los macrófagos, estas células muestran los cambios fenotípicos característicos y permiten la replicación de HCMV. (29)

De lo que se ha descrito hasta aquí sobre la latencia de HCMV en células del linaje mieloide, es claro que el destino de la infección depende de varios factores, que pueden mantener el estado de infección latente o promover la reactivación del ciclo lítico. Factores celulares y virales como el estado de diferenciación, mecanismos intracelulares de defensa, control de la actividad represora de la cromatina, proteínas tegumentarias de HCMV, entre otros, que regulan la transcripción de genes virales como UL138, US28, vIL-10, UL82ast y apagan la expresión de los genes relacionados con el ciclo lítico. Evolutivamente, HCMV ha “seleccionado” las células CD34+ de la médula ósea, capaces de autorenovarse y diferenciarse, lo que para este virus facilita la persistencia en el individuo infectado y cuando ocurre la diferenciación la posibilidad de reactivarse, diseminarse y transmitirse. Además, el estado de infección latente parece ir de la mano con la disminución de la respuesta inmunológica contra estas células.

2.1. REACTIVACIÓN DE LA INFECCIÓN LATENTE DE HCMV EN CÉLULAS DEL LINAJE MIELOIDE

El balance que se había establecido en las células con infección latente entre los factores celulares y virales para silenciar el promotor principal de los genes relacionados con la replicación de Citomegalovirus debe alterarse a favor del inicio de la transcripción de los genes inmediatamente tempranos. Esta reactivación de la infección latente usualmente pasa desapercibida en los individuos inmunocompetentes, como un proceso asintomático que puede acompañarse de descargas virales en fluidos corporales. Sin embargo, la reactivación tiene importantes implicaciones para los individuos con supresión inmunológica, principalmente los receptores de trasplantes, por lo que ha sido objeto de estudio en los últimos años.

La reactivación desde la latencia implica iniciar la replicación génica para llegar a la producción de partículas virales. MIEP dirige la expresión de transactivadores del ciclo lítico, pero es silenciado durante la latencia en células precursoras hematopoyéticas de la médula ósea. No es claro cómo se pueden llegar a producir

los transactivadores virales en la reactivación y presumiblemente debe ocurrir una desrepresión de MIEP o puede tratarse de transactivadores alternativos de los genes UL122 - UL123, denominados iP1 e iP2 y que son distintos a MIEP, pero igualmente localizados en el locus MIE. (38)

Los distintos modelos con los que se ha evaluado la reactivación desde la latencia en células CD34+ o monocitos CD14+, muestran que este proceso puede comenzar cuando las células son expuestas a estímulos inflamatorios, ocurre daño celular, estrés oxidativo o incluso isquemia y reperfusión. (2)

Los estímulos que producen inflamación llevan a la activación de vías de señalización, por ejemplo, del NF-ƙB; este factor puede unirse a MIEP y activar su transcripción. Cuando las células CD14+ son expuestas a LPS, se activa la vía del NF-ƙB, luego viene la síntesis de citocinas proinflamatorias como IL-6, que a su vez activa la vía ERK/MSK/CREB y modifica la unión de las histonas a MIEP. (2)

El proceso de reactivación desde la latencia ha sido descrito en un modelo de las células de la línea monocítica THP-1 infectadas con la cepa TB40/E y posteriormente tratadas con PMA para estimular la diferenciación celular: A las 24 hpi. se detectan los trascritos y las proteínas IE1 y 2 llegando a ser indetectables entre los días 2 y 5 p.i.; puede resultar paradójico que, aunque se encuentran los trascritos y las proteínas de los genes inmediatamente tempranos, el ciclo replicativo no se completa, no hay producción de partículas virales y el virus entra en latencia, reforzando la idea que la infección viral sigue distintas vías según el tipo celular. Luego del tratamiento de las células THP-1 con PMA, de nuevo hay detección de IE1 y 2, compatible con la reactivación del ciclo lítico. En este modelo, la proteína UL135 tiene un comportamiento similar a IE, indicando su participación en la activación del ciclo replicativo, pero sin producción de partículas virales. Además, la proteína UL138 se detecta en todos los periodos de tiempo. (38)

La diferenciación celular en el linaje mieloide activa la acetilación de histonas unidas a MIEP, seguida por la expresión de los genes IE y entrada de la célula en el ciclo lítico. (14)

2.2. ESTUDIOS *IN VITRO* CON HCMV Y OBTENCIÓN DE AISLADOS CLÍNICOS

El cultivo para estudiar las diferentes fases del ciclo viral, así como el establecimiento de latencia y la reactivación de HCMV se realiza en su mayor parte con cepas de laboratorio que han sido propagadas regularmente *in vitro* en Fb. Las cepas más empleadas son Towne, AD169 y TB40/E (Tabla 1.1.), que se caracterizan por el alto número de pasajes en cultivo celular y las cepas Toledo, Merlin y Fix, (Tabla 1.1.), que se consideran de bajo número de pasajes. (39,40)
Es posible utilizar aislados clínicos de HCMV con un número muy bajo de pasajes en cultivo celular. Se considera aislado clínico cuando se ha podido recuperar virus de una muestra o espécimen de un paciente, ha sido pasajeado en cultivo y se logra la producción de partículas virales libres en el sobrenadante, lo que implica que se ha producido una modificación fenotípica y este es un virus adaptado al cultivo. (41)

Estas cepas de HCMV retienen el tropismo por células endoteliales y epiteliales, que se reduce en las cepas de laboratorio. (22)

El estudio de la interacción hospedero humano - HCMV no ha sido fácil dada la alta especificidad viral para infectar únicamente células humanas y la dificultad para contar con modelos animales, y aunque ya se dispone de modelos de ratones humanizados para el estudio de la latencia/reactivación, se sigue recurriendo al cultivo celular. Los estudios *in vitro* se han llevado a cabo usualmente en cultivos de células diploides en líneas ya establecidas, las células más empleadas son los fibroblastos por su alta permisividad a la infección y por facilitar la obtención de cosechas virales con títulos altos, a pesar de que no se trata del tipo de célula involucrada en los principales procesos patogénicos en el ser humano. (42)

Hacia los años 80's se comenzó a usar la línea de fibroblastos MRC-5 (Cepa celular 5 del Consejo de Investigación Médica de Reino Unido) derivada de pulmón embrionario humano, en la que se logra hacer aislamiento viral más eficiente a partir de diferentes especímenes clínicos como la orina, secreciones orofaríngeas, lavado broncoalveolar, entre otros, aproximadamente en dos semanas. (43) En décadas pasadas, cuando comenzó el estudio *in vitro* de la infección por HCMV, se encontraron varias dificultades además de la especificidad por células humanas, como la progresión lenta de la infección que implicaba un tiempo de espera de 14 a 21 días para observar el efecto citopático, cuando se hacían aislamientos primarios. (43)

En 1984 se reportó una detección rápida de HCMV con la técnica de Shell-vial (técnica de cultivo celular en la que luego de la inoculación se hace una centrifugación a baja velocidad para mejorar la adsorción viral); en este trabajo utilizaron fibroblastos MRC-5 y se centrifugó a 700 gravedades por una hora, llevando a la detección de antígenos virales por inmunofluorescencia a las 36 hpi., en comparación con el tiempo que tomaba la aparición de efecto citopático que requería en promedio 9 días. (44) La técnica de Shell-vial ha demostrado desde ese entonces una sensibilidad mayor que el cultivo convencional para la infección por HCMV en el cultivo celular a partir de fluidos corporales. (45)

Las cepas virales más reconocidas han sufrido numerosos pasajes y se han adaptado al cultivo celular en Fb, sobre todo en la línea MRC-5 y los fibroblastos primarios de prepucio humano (HFF-*Human Foreskin Fibroblast*), aunque se han empleado exitosamente fibroblastos primarios de distintas localizaciones como labio, riñón y pulmón. (42,46) No se conoce un acuerdo o norma sobre el número de pasajes en cultivo que determinen que una cepa de HCMV es de alto número de pasajes, se ha propuesto que, por encima de 5 o 10, la cepa pasa a ser considerada como de alto número de pasajes. Dos de las cepas de HCMV más empleadas en todo el mundo son AD169 y Towne; la primera está circulando en laboratorios desde el año 1956, la cepa Towne fue aislada en 1975 (Tabla 1.1., numeral 1.3. Biología del virus) y son consideradas como cepas de alto número de pasajes en cultivo. (22)

Durante los pasajes en Fb se producen modificaciones genéticas como la pérdida del segmento UL/*b´* (UL133 - UL151); al parecer este segmento no es necesario para la infección y replicación en los Fb, pero como ya se ha revisado, si tiene gran importancia en el establecimiento de latencia. (21,22,47) También es posible que los genes necesarios para la interacción con el sistema inmunológico, tropismo – UL128, UL130, UL131A - y capacidad de replicarse - RL13 – sobre todo en tipos

celulares especializados se pierdan cuando HCMV es propagado en Fb. Una vez que el aislado clínico se ha adaptado completamente al cultivo, desaparece la presión selectiva sobre los genes virales y el genoma permanecerá relativamente estable en los subsecuentes pasajes celulares. (22,41)
La infección de Fb con cepas de alto número de pasajes se caracteriza por ser productiva y se denomina "*cell free*", que significa que hay replicación viral intensa llevando a la producción de partículas virales libres, extracelulares; esto obviamente facilita la obtención de adecuados títulos virales en una cosecha. (42)
Ha quedado claro que el HCMV sufre modificaciones en su genoma durante el cultivo celular, aún con un bajo número de pasajes (10), sobre todo si este cultivo se ha hecho en Fb. (42) Para superar este problema actualmente se están utilizando Cromosomas Bacterianos Artificiales (BACs); para esto se dispone de los genomas de cepas de laboratorio de HCMV clonadas en vectores de plásmidos que permiten la manipulación genética del DNA viral como BACs en las células bacterianas, para luego transfectarlos en células eucariotas, usualmente fibroblastos, a partir de los cuales se reconstituye el virus clonado en BACs. (39,41)
La obtención de aislados clínicos no siempre se logra a pesar de que las muestras clínicas sean positivas para el virus, puede depender de la concentración viral en la muestra, de la composición de esta y la alta probabilidad de encontrar otros virus que podrían catalogarse como contaminantes o adventicios. Sobre la composición de la muestra, la presencia de proteínas, carbohidratos, células, bacterias y otros microorganismos, pueden dificultar la obtención del aislado. Por ejemplo, en la saliva hay células epiteliales en descamación, proteínas de alto peso molecular como la mucina en la que pueden quedar atrapadas partículas virales, proteínas ricas en prolina, Inmunoglobulina A que puede neutralizar las partículas virales y amilasa salivar, entre otras y normalmente se encuentran bacterias y levaduras (*Streptococcus* spp, *Actynomices* spp, *Fusobacterium* spp, *Prevotella* spp, *Candida* spp, entre otros). (48,49) También es muy probable que se encuentren partículas virales de Virus Herpes Simplex 1 y 2, por las descargas virales asintomáticas, lo que ha dificultado la posibilidad de aislar un solo virus. (50)

Otra dificultad importante es el comportamiento viral durante el aislamiento, porque las partículas virales producidas pueden permanecer dentro o asociadas a las células, comportamiento que se observa sobre todo en las infecciones con muestras clínicas o virus poco pasajeados, en los que la relación entre células infectadas y virus liberados en el sobrenadante es inferior a 1, lo que hace que la concentración viral en el sobrenadante del cultivo sea baja en los pasajes más tempranos, hasta 10 inclusive; como ya se dijo previamente, la adaptación al cultivo implica que se pueden obtener partículas virales libres a partir del sobrenadante. (41,51)

Estos problemas pueden ser superados con técnicas en las que se diluye el inóculo 1/1 con medio de cultivo DMEM (*Dubelccos´s Modified Ealgle Medium*) y/o con PBS (*Phosphate-Buffered Saline*), obteniendo una baja Multiplicidad de Infección (MOI); esto permite que el virus se replique y extienda de célula a célula y la infección transcurra lentamente al mismo tiempo que se mantiene una monocapa saludable y sin sobrecrecimiento celular disminuyendo la concentración del Suero Feral Bovino al 2%. El proceso de infección debe seguirse de cerca por observación

microscópica del efecto citopático y de su extensión; al encontrar este efecto en un 80 a 100%, las células deben desprenderse mecánicamente y se recolectan junto con el sobrenadante. Luego, las células deben romperse por sonicación o congelamiento – descongelamiento, para liberar partículas virales, garantizando la integridad de esas partículas. Con estas modificaciones técnicas se pueden mejorar los títulos en pasajes muy tempranos de cultivo celular en fibroblastos, sin perder la integridad genética. (52)

De esta forma, se podrá trabajar con virus que mantienen un genotipo y un fenotipo homologables al de los virus que están infectando al individuo del que se obtuvo la muestra; en el aislado se mantiene el tropismo celular de la cepa salvaje, los aislados clínicos son útiles para el estudio de la relación entre los polimorfismos genéticos virales y cuadro clínico, se pueden hacer comparaciones para determinar los cambios genéticos que se han producido en las cepas de laboratorio con alto número de pasajes en cultivo y establecer la variabilidad genética natural de HCMV, pero esto tiene una desventaja inherente y es que el aislado no es genéticamente puro.(41)

2.3. MODELO DE LÍNEA CELULAR MONOCÍTICA PARA EL ESTUDIO *IN VITRO* DE LA INFECCIÓN / REACTIVACIÓN DE HCMV

Como se dijo previamente, la infección de las células progenitoras hematopoyéticas con Citomegalovirus lleva al establecimiento de latencia y el genoma viral pasa a las células que se diferencian en la línea mieloide; en los monocitos CD14+ de sangre periférica la infección se ha definido como un estado quiescente o persistente porque no hay replicación viral pero la diferenciación a macrófagos o células dendríticas puede activar el ciclo replicativo. Dada la importancia de la diferenciación *in vivo* de los monocitos a macrófagos, para la replicación de Citomegalovirus y la diseminación a distintos órganos y tejidos, ha sido primordial poder reproducir *in vitro* este proceso. (21,36,37,53,54)
No siempre puede contarse con células CD34+ para infecciones *in vitro*, por lo que se ha aceptado que la infección de los monocitos CD14+ puede tomarse como el estado de latencia, con la posibilidad de inducir diferenciación y permisividad para la replicación viral. (21)

Para emplear células CD14+ de sangre periférica en estudios *in vitro* de la infección por HCMV se requieren donantes sanos, seronegativos; aun así, es posible que las células porten el ADN de Citomegalovirus, lo que debería descartarse mediante PCR. Usualmente se requieren lotes de células de distintos donantes por lo que las respuestas celulares pueden estar sujetas a factores adicionales, como la variabilidad genética o la posible exposición previa de estas células a otros agentes infecciosos.

También deberían descartarse otras infecciones virales en el donante que pueden alterar la respuesta de los monocitos CD14 a la infección *in vitro* por HCMV, por ejemplo, Arbovirus. La diseminación amplia de la infección por HCMV en países subdesarrollados como Colombia, hace difícil encontrar los donantes apropiados, incrementando también los costos para la obtención de las células CD14, negativas para HCMV.
Por otra parte, el uso de líneas celulares monocíticas ha demostrado suficientemente la reproducibilidad y facilidad para el estudio de HCMV. (20,55)
Se han empleado, entre otras, las líneas: HL-60 (*Human myeloid cell line*), U-937 (*Human histiocytic cell line*) y THP-1 (*Human monocytic cell line*); se trata de líneas derivadas de neoplasias mieloides o linfoides que lograron ser mantenidas en cultivo celular y que retienen el potencial para diferenciarse en varios tipos celulares mieloides. La línea HL-60 se deriva de una paciente con leucemia promielocítica aguda, y se caracterizó desde el comienzo por un tipo celular predominante neutrofílico/promielocítico con prominente asincronía nuclear/citoplasmática. Estas células expresan receptores de superficie para la porción Fc de los Anticuerpos y para C3 (Componente 3 activado del sistema complemento) pero no se identifican marcadores específicos linfoides. Tienen capacidad para diferenciarse en células de la línea granulocítica, monocítica y células semejantes a macrófagos y eosinófilos, según el estímulo empleado. (56,57)

La línea celular HL-60 se ha utilizado en el estudio de las vías de transducción de señales involucradas en la diferenciación celular de granulocitos y en las respuestas celulares a patógenos y a fármacos; en cuanto a estudios *in vitro* con HCMV, aunque se ha utilizado, en algunos trabajos no se ha evidenciado la replicación viral luego de inducir diferenciación, lo que se ha atribuido a que es una línea menos diferenciada que otras como la THP-1. (58) La línea U-937, se obtuvo a partir de células de un linfoma histiocítico, demostrando positividad para receptores Fc y de C3 en aproximadamente 30% de las células, sin marcación para Inmunoglobulinas en la superficie; se detectó producción de lisozima y actividad de esterasa. (59)

U-937 se describe como una línea monocítica y se ha utilizado en experimentos para inducir diferenciación a macrófagos. No obstante, también hay limitaciones en cuanto al empleo de esta línea para evaluar la infección por HCMV dado que no se detecta la expresión de MIEP (*Major Immediate Early Promoter*) aún luego del tratamiento con PMA (forbol 12-miristato 13-acetato), con un resultado semejante para las células de la línea HL-60; este resultado se atribuye a que se trata de células menos diferenciadas que las THP-1, en las que luego del estímulo con PMA se detectaron las proteínas IE1 y 2 con niveles similares a los observados en fibroblastos, por lo que se concluyó que el grado relativo de diferenciación de las células monocíticas puede ser un factor importante en la regulación génica de HCMV. (60)

La línea THP-1 fue establecida en 1980, a partir de células de un paciente con Leucemia Monocítica Aguda. La naturaleza monocítica se definió por la detección de la actividad de la alfa naftil butirato esterasa, la producción de lisozima y la fagocitosis de partículas de látex y de eritrocitos de carnero sensibilizados; estas

características se mantuvieron durante 14 meses de cultivo en suspensión. (61) Más adelante, en 1982, se describió que el tratamiento de las células THP-1 con PMA, indujo la diferenciación hacia un fenotipo de macrófago. Se observaron los siguientes cambios: Las células aumentaron de diámetro, formaron agregados y tenían aspecto ameboide, la membrana plasmática se tornó lisa, disminuyeron las microvellosidades de la superficie, el núcleo se observó lobulado y con nucléolos evidentes, aparato de Golgi bien desarrollado y abundantes ribosomas libres. Igualmente se detectó la persistencia del marcador CD16 y aumento de la actividad de fagocitosis. (62)

El PMA es un éster de forbol con actividades biológicas reconocidas en la transcripción génica y a nivel celular en la diferenciación, crecimiento y muerte programada; también en la activación de vías de respuesta inmunológica y desensibilización de receptores y se le atribuye actividad como promotor tumoral. Ejerce su efecto a través de la Proteína Quinasa C (PKC) y sus respectivas vías de señalización.
Una de las características importantes de estas células THP-1, como modelo para el estudio de los monocitos – macrófagos en la interacción del patógeno con el hospedero es su semejanza con las células CD14+ de donantes. Se ha comparado la respuesta de los macrófagos inducidos por diferenciación a partir de la línea THP-1 con los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica, demostrando que las células THP-1, luego del tratamiento con PMA presentan un fenotipo que se asemeja estrechamente al de los macrófagos derivados de monocitos, con incremento del volumen citoplasmático, se observa adherencia al sustrato, y aumenta la granularidad.

En cuanto a los marcadores de superficie, se han observado los cambios en la expresión de CD14, CD11b y TLR-2 entre otros, dependiendo del estímulo, tanto en los macrófagos derivados de monocitos como en los diferenciados a partir de células THP-1. (63,64) Dada la similitud en el comportamiento de las células THP-1 respecto a las células CD14+, se ha propuesto la utilización de la línea THP-1 como modelo experimental de la infección, latencia y reactivación del HCMV. El tratamiento con PMA se ha empleado para inducir la diferenciación celular, observando que luego de tratar las células con PMA se desarrolla el ciclo lítico del virus. (58,64,65)
Las condiciones del cultivo de las células THP-1 también determinan el resultado de los experimentos, con distintos tiempos, concentraciones de PMA y también el tiempo postratamiento. Las concentraciones de PMA que han sido utilizadas van de 10 a 400 ng/mL, el tiempo de tratamiento ente 1 y 5 días y el periodo postratamiento también entre 1 y 5 días. (55,63,64) Las concentraciones más altas de PMA, de 200 ng/mL, pueden inducir muerte, con más células positivas para marcadores de muerte celular entre las que recibieron tratamiento por 4 días y luego fueron expuestas a un patógeno. (64)
En el estudio de la infección por HCMV empleando las células THP-1 existen dos modelos con los que se intenta reproducir *in vitro* la infección, latencia y reactivación; en el primero la inoculación viral se hace después de inducir la diferenciación con PMA. (66) Con este modelo se puede evaluar el efecto de la

infección en células que ya han adquirido el fenotipo de macrófago. El segundo modelo se denomina latencia/reactivación; las células son infectadas en suspensión y luego son sembradas, lo que permite el establecimiento de latencia viral sin que ocurra el ciclo lítico en la mayor parte de las células; el tratamiento posterior con PMA induce la diferenciación de las células monocíticas a macrófagos que llegan a ser permisivos al ciclo viral replicativo. (55,65) De esta forma es posible observar el efecto de la infección en células no diferenciadas, la capacidad de HCMV para establecer latencia y el efecto de doble vía de la diferenciación celular y la reactivación viral.

2.4. CONCLUSIÓN

Luego de la infección primaria el HCMV establece latencia en las células progenitoras hematopoyéticas, persistiendo en las células del linaje mieloide y por esta vía los monocitos CD14+ mantienen el genoma viral, que, aunque no se replica está ejerciendo influencia, promoviendo la activación, migración y diferenciación a macrófagos, células permisivas para la replicación viral. De esta forma, HCMV logra diseminarse, replicarse e infectar nuevos nichos tisulares o celulares al tiempo que modula la respuesta inmunológica antiviral. Claramente, la persistencia de HCMV en los monocitos de sangre periférica es un evento importante en la patogenia de la infección viral por lo que el estudio de la infección en este tipo celular es fundamental para comprender la actividad inmunomoduladora de HCMV.

Los modelos que emplean líneas celulares monocíticas son ampliamente aceptados, en particular con células THP-1, derivadas de un paciente con Leucemia monocítica y que son tratadas con un inductor de activación y diferenciación como el PMA. El modelo latencia – reactivación ofrece una alternativa para trabajo *in vitro* con HCMV muy aproximada a los eventos *in vivo* en los monocitos de sangre periférica, por lo que se considera apropiado para evaluar la actividad inmunomoduladora de HCMV.

2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sinclair J., Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. J Gen Virol. 2006; 87(Pt 7):1763-1779. doi: 10.1099/vir.0.81891-0.
2. Forte E., Zhang Z., Thorp E.B., Hummel M. Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. Front Cell Infect Microbiol. 2020; 10:130. doi: 10.3389/fcimb.2020.00130.
3. Kondo K., Kaneshima H., Mocarski E.S. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(25):11879-83. doi: 10.1073/pnas.91.25.11879.
4. Mendelson M., Monard S., Sissons P., Sinclair J. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. J Gen Virol. 1996; 77 (Pt 12):3099-102. doi: 10.1099/0022-1317-77-12-3099.
5. Lanza F., Healy L., Sutherland D.R. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. J Biol Regul Homeost Agents. 2001; 15(1):1-13.

6. Hughes M.R., Canals Hernaez D., Cait J., Refaeli I., et al. A sticky wicket: Defining molecular functions for CD34 in hematopoietic cells. Exp Hematol. 2020; 86:1-14. doi: 10.1016/j.exphem.2020.05.004.
7. AbuSamra D.B., Aleisa F.A., Al-Amoodi A.S., Jalal Ahmed H.M., et al. Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along with CD44. Blood Adv. 2017;1(27):2799-2816. doi: 10.1182/bloodadvances.2017004317.
8. Goodrum F., Jordan C.T., Terhune S.S., High K., Shenk T. Differential outcomes of human cytomegalovirus infection in primitive hematopoietic cell subpopulations. Blood. 2004; 104(3):687-95. doi: 10.1182/blood-2003-12-4344.
9. Lee J.H., Kalejta R.F. Human Cytomegalovirus Enters the Primary $CD34^{+}$ Hematopoietic Progenitor Cells Where It Establishes Latency by Macropinocytosis. J Virol. 2019; 93(15):e00452-19. doi: 10.1128/JVI.00452-19.
10. Lee J.H., Pasquarella J.R., Kalejta R.F. Cell Line Models for Human Cytomegalovirus Latency Faithfully Mimic Viral Entry by Macropinocytosis and Endocytosis. J Virol. 2019; 93(21):e01021-19. doi: 10.1128/JVI.01021-19.
11. Hwang J., Kalejta R.F. Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells. Virology. 2007; 367(2):334-8. doi: 10.1016/j.virol.2007.05.037.
12. Penkert R.R., Kalejta R.F. Nuclear localization of tegument-delivered pp71 in human cytomegalovirus-infected cells is facilitated by one or more factors present in terminally differentiated fibroblasts. J Virol. 2010; 84(19):9853-63. doi: 10.1128/JVI.00500-10.
13. Griffiths P., Reeves M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. Nat Rev Microbiol. 2021; 19(12):759-773. doi: 10.1038/s41579-021-00582-z.
14. Reeves M.B. Chromatin-mediated regulation of cytomegalovirus gene expression. Virus Res. 2011; 157(2):134-43. doi: 10.1016/j.virusres.2010.09.019.
15. Rauwel B., Jang S.M., Cassano M., Kapopoulou A., et al. Release of human cytomegalovirus from latency by a KAP1/TRIM28 phosphorylation switch. Elife. 2015; 4:e06068. doi: 10.7554/eLife.06068.
16. Hancock M.H., Crawford L.B., Pham A.H., Mitchell J., et al. Human Cytomegalovirus miRNAs Regulate TGF-β to Mediate Myelosuppression while Maintaining Viral Latency in $CD34^{+}$ Hematopoietic Progenitor Cells. Cell Host Microbe. 2020; 27(1):104-114.e4. doi: 10.1016/j.chom.2019.11.013.
17. Reeves M., Sinclair J. Regulation of human cytomegalovirus transcription in latency: beyond the major immediate-early promoter. Viruses. 2013; 5(6):1395-413. doi: 10.3390/v5061395.
18. Bego M., Maciejewski J., Khaiboullina S., Pari G., St Jeor S. Characterization of an antisense transcript spanning the UL81-82 locus of human cytomegalovirus. J Virol. 2005; 79(17):11022-34. doi: 10.1128/JVI.79.17.11022-11034.2005.
19. Reeves M.B., Sinclair J.H. Analysis of latent viral gene expression in natural and experimental latency models of human cytomegalovirus and its correlation with histone modifications at a latent promoter. J Gen Virol. 2010; 91(Pt 3):599-604. doi: 10.1099/vir.0.015602-0.

20. Noriega V.M., Haye K.K., Kraus T.A., Kowalsky S.R., et al. Human cytomegalovirus modulates monocyte-mediated innate immune responses during short-term experimental latency in vitro. J Virol. 2014;88(16):9391-405. doi: 10.1128/JVI.00934-14.
21. Mlera L., Moy M., Maness K., Tran L.N., Goodrum F.D. The Role of the Human Cytomegalovirus *UL133-UL138* Gene Locus in Latency and Reactivation. Viruses. 2020; 12(7):714. doi: 10.3390/v12070714.
22. Dargan D.J., Douglas E., Cunningham C., Jamieson F., et al. Sequential mutations associated with adaptation of human cytomegalovirus to growth in cell culture. J Gen Virol. 2010; 91(Pt 6):1535-46. doi: 10.1099/vir.0.018994-0.
23. Umashankar M., Petrucelli A., Cicchini L., Caposio P., et al. A novel human cytomegalovirus locus modulates cell type-specific outcomes of infection. PLoS Pathog. 2011; 7(12):e1002444. doi: 10.1371/journal.ppat.1002444.
24. Lee S.H., Albright E.R., Lee J.H., Jacobs D, Kalejta R.F. Cellular defense against latent colonization foiled by human cytomegalovirus UL138 protein. Sci Adv. 2015; 1(10):e1501164. doi: 10.1126/sciadv.1501164.
25. Gao J.L, Murphy P.M. Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional beta chemokine receptor. J Biol Chem. 1994; 269(46):28539-42.
26. Kuhn D.E., Beall C.J., Kolattukudy P.E. The cytomegalovirus US28 protein binds multiple CC chemokines with high affinity. Biochem Biophys Res Commun. 1995; 211(1):325-30. doi: 10.1006/bbrc.1995.1814.
27. Beisser P.S., Laurent L., Virelizier J.L., Michelson S. Human cytomegalovirus chemokine receptor gene US28 is transcribed in latently infected THP-1 monocytes. J Virol. 2001; 75(13):5949-57. doi: 10.1128/JVI.75.13.5949-5957.2001.
28. Goodrum F., Reeves M., Sinclair J., High K., Shenk T. Human cytomegalovirus sequences expressed in latently infected individuals promote a latent infection in vitro. Blood. 2007; 110(3):937-45. doi: 10.1182/blood-2007-01-070078.
29. Hargett D., Shenk T.E. Experimental human cytomegalovirus latency in CD14+ monocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107(46):20039-44. doi: 10.1073/pnas.1014509107.
30. Mosser D.M., Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. Immunol Rev. 2008; 226:205-18. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x.
31. Jenkins C., Garcia W., Abendroth A., Slobedman B.. Expression of a human cytomegalovirus latency-associated homolog of interleukin-10 during the productive phase of infection. Virology. 2008; 370(2):285-94. doi: 10.1016/j.virol.2007.09.002.
32. Young V.P., Mariano M.C., Tu C.C., Allaire K.M., et al. Modulation of the Host Environment by Human Cytomegalovirus with Viral Interleukin 10 in Peripheral Blood. J Infect Dis. 2017; 215(6):874-882. doi: 10.1093/infdis/jix043.
33. Jenkins C., Abendroth A., Slobedman B. A novel viral transcript with homology to human interleukin-10 is expressed during latent human cytomegalovirus infection. J Virol. 2004; 78(3):1440-7. doi: 10.1128/jvi.78.3.1440-1447.2004.
34. Mason G.M., Jackson S., Okecha G., Poole E., et al. Human cytomegalovirus latency-associated proteins elicit immune-suppressive IL-10 producing $CD4^+$ T cells. PLoS Pathog. 2013; 9(10):e1003635. doi: 10.1371/journal.ppat.1003635.

35. Bego M.G., Keyes L.R., Maciejewski J., St Jeor S.C. Human cytomegalovirus latency-associated protein LUNA is expressed during HCMV infections in vivo. Arch Virol. 2011; 156(10):1847-51. doi: 10.1007/s00705-011-1027-7.
36. Taylor-Wiedeman J., Sissons J.G., Borysiewicz L.K., Sinclair J.H. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. J Gen Virol. 1991; 72 (Pt 9):2059-64. doi: 10.1099/0022-1317-72-9-2059.
37. Söderberg-Nauclér C., Fish K.N., Nelson J.A. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. Cell. 1997; 91(1):119-26. doi: 10.1016/s0092-8674(01)80014-3.
38. Collins-McMillen D., Rak M., Buehler J.C., Igarashi-Hayes S., et al. Alternative promoters drive human cytomegalovirus reactivation from latency. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019; 116(35):17492-17497. doi: 10.1073/pnas.1900783116.
39. Murphy E., Yu D., Grimwood J., Schmutz J., et al. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(25):14976-81. doi: 10.1073/pnas.2136652100.
40. Dolan A., Cunningham C., Hector R.D., Hassan-Walker A.F., et al. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. J Gen Virol. 2004; 85(Pt 5):1301-1312. doi: 10.1099/vir.0.79888-0.
41. Frascaroli G., Sinzger C. Distinct Properties of Human Cytomegalovirus Strains and the Appropriate Choice of Strains for Particular Studies. Methods Mol Biol. 2021;2244:19-38. doi: 10.1007/978-1-0716-1111-1_2.
42. Fortunato E.A. Using Diploid Human Fibroblasts as a Model System to Culture, Grow, and Study Human Cytomegalovirus Infection. Methods Mol Biol. 2021;2244:39-50. doi: 10.1007/978-1-0716-1111-1_3.
43. Gregory W.W., Menegus M.A. Practical protocol for cytomegalovirus isolation: use of MRC-5 cell monolayers incubated for 2 weeks. J Clin Microbiol. 1983; 17(4):605-9. doi: 10.1128/jcm.17.4.605-609.1983.
44. Gleaves C.A., Smith T.F., Shuster E.A., Pearson G.R. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. J Clin Microbiol. 1984; 19(6):917-9. doi: 10.1128/jcm.19.6.917-919.1984.
45. Leland D.S., Hansing R.L., French M.L. Clinical experience with cytomegalovirus isolation using conventional cell cultures and early antigen detection in centrifugation-enhanced shell vial cultures. J Clin Microbiol. 1989; 27(6):1159-62. doi: 10.1128/jcm.27.6.1159-1162.1989.
46. Aguiar A., Galinato M., Bradley Silva M., Toth B, et al. Human Cytomegalovirus Replication and Infection-Induced Syncytia Formation in Labial, Foreskin, and Fetal Lung Fibroblasts. Viruses. 2021; 13(12):2355. doi: 10.3390/v13122355.
47. Cha T.A., Tom E., Kemble G.W., Duke G.M., et al. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. J Virol. 1996; 70(1):78-83. doi: 10.1128/JVI.70.1.78-83.1996.
48. Llena-Puy C. The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006; 11(5):E449-55.
49. Arweiler N.B., Netuschil L. The Oral Microbiota. Adv Exp Med Biol. 2016;902:45-60. doi: 10.1007/978-3-319-31248-4_4.

50. Camacho-Ortega S., Bohórquez-Ávila S.P., Velandia-Romero M.L., Castellanos J. ISOLATION OF THE HUMAN CYTOMEGALOVIRUS FROM BODILY FLUIDS. Act Bio Colomb. 2019; 24(3):520-527. doi: 10.15446/abc.v24n3.79406.
51. Yamane Y., Furukawa T., Plotkin S.A. Supernatant virus release as a differentiating marker between low passage and vaccine strains of human cytomegalovirus. Vaccine. 1983; 1(1):23-5. doi: 10.1016/0264-410x(83)90008-7.
52. Britt W.J. Human cytomegalovirus: propagation, quantification, and storage. Curr Protoc Microbiol. 2010; Chapter 14:Unit 14E.3. doi: 10.1002/9780471729259.mc14e03s18.
53. Min C.K., Shakya A.K., Lee B.J., Streblow D.N., et al. The Differentiation of Human Cytomegalovirus Infected-Monocytes Is Required for Viral Replication. Front Cell Infect Microbiol. 2020; 10:368. doi: 10.3389/fcimb.2020.00368.
54. Waldman W.J., Knight D.A., Huang E.H., Sedmak D.D. Bidirectional transmission of infectious cytomegalovirus between monocytes and vascular endothelial cells: an in vitro model. J Infect Dis. 1995; 171(2):263-72. doi: 10.1093/infdis/171.2.263.
55. Arcangeletti M.C., Vasile Simone R., Rodighiero I., De Conto F., et al. Human cytomegalovirus reactivation from latency: validation of a "switch" model in vitro. Virol J. 2016; 13(1):179. doi: 10.1186/s12985-016-0634-z.
56. Gallagher R., Collins S., Trujillo J., McCredie K., et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. Blood. 1979; 54(3):713-33.
57. Collins S.J. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. Blood. 1987;70(5):1233-44.
58. Moon M.S., Lee G.C., Kim J.H., Yi H.A., et al. Human cytomegalovirus induces apoptosis in promonocyte THP-1 cells but not in promyeloid HL-60 cells. Virus Res. 2003; 94(2):67-77. doi: 10.1016/s0168-1702(03)00134-5.
59. Sundström C., Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). Int J Cancer. 1976; 17(5):565-77. doi: 10.1002/ijc.2910170504.
60. Lee C.H., Lee G.C., Chan Y.J., Chiou C.J., et al. Factors affecting human cytomegalovirus gene expression in human monocyte cell lines. Mol Cells. 1999; 9(1):37-44.
61. Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). Int J Cancer. 1980; 26(2):171-6. doi: 10.1002/ijc.2910260208.
62. Tsuchiya S., Kobayashi Y., Goto Y., Okumura H., et al. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. Cancer Res. 1982; 42(4):1530-6.
63. Daigneault M., Preston J.A., Marriott H.M., Whyte M.K., Dockrell D.H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. PLoS One. 2010; 5(1):e8668. doi: 10.1371/journal.pone.0008668.

64. Starr T., Bauler T.J., Malik-Kale P., Steele-Mortimer O. The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with Salmonella Typhimurium. PLoS One. 2018; 13(3):e0193601. doi: 10.1371/journal.pone.0193601.
65. Ioudinkova E., Arcangeletti M.C., Rynditch A., De Conto F. et al. Control of human cytomegalovirus gene expression by differential histone modifications during lytic and latent infection of a monocytic cell line. Gene. 2006; 384:120-8. doi: 10.1016/j.gene.2006.07.021.
66. Arcangeletti M.C., Germini D., Rodighiero I., Mirandola P., et al. Toll-like receptor 4 is involved in the cell cycle modulation and required for effective human cytomegalovirus infection in THP-1 macrophages. Virology. 2013; 440(1):19-30. doi: 10.1016/j.virol.2013.01.021.

3. ESTRATEGIAS DE REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDAS POR EL CITOMEGALOVIRUS HUMANO

El Citomegalovirus humano (HCMV) infecta entre el 50 y 100% de la población en todo el mundo, con diferencias claras entre los países desarrollados y subdesarrollados en los que se encuentra la prevalencia más alta. La mayoría de los individuos adquiere la infección desde el nacimiento o en los primeros años y se establece latencia de por vida. (1,2)

Es bien conocido que en los individuos inmunocompetentes o con un sistema inmunológico sano la infección es por lo general asintomática, pero en los que padecen alguna forma de inmunosupresión, se observa la mayor morbilidad y mortalidad asociada con este virus. Una respuesta inmunológica robusta mantiene el control sobre la replicación viral y por lo tanto sobre la carga viral, controlando así la posibilidad de que HCMV produzca la enfermedad de órganos terminales. (3)

La respuesta inmune antiviral comprende mecanismos de la respuesta innata como la inhibición de la infección por los Interferones de tipo I y la actividad de las células citocidas naturales o *natural killer* (NK) para eliminar las células infectadas, también se implican mecanismos de la respuesta adaptativa con los anticuerpos que bloquean la unión y entrada de los virus a las células y los linfocitos T citotóxicos que eliminan las células infectadas. (4)

La coevolución del ser humano y los patógenos virales ha llevado a que estos últimos desarrollen mecanismos de evasión de la respuesta inmune y de inmunomodulación; como es el caso del HCMV, que ha desarrollado una notable capacidad de modular la actividad del sistema inmunológico a su favor, con el fin de lograr un ambiente celular propicio para el establecimiento de la infección, la replicación viral, la latencia, reactivación, diseminación dentro del individuo infectado y transmisión a otros hospederos.

Esta capacidad se hace patente entre otros aspectos, en el genoma del HCMV que es de los más grandes conocidos entre los virus y buena parte de sus genes se relacionan con la capacidad de evasión que interfiere con la función de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa de las células y del hospedero. (5)

Por citar algunos efectos de la infección viral en la respuesta inmune se puede mencionar la alteración en la producción de Interferones (IFN), especialmente del IFNβ, además, HCMV inhibe la activación de los linfocitos NK y afecta la presentación de antígenos a los linfocitos T. Adicionalmente, el virus puede interferir con las funciones efectoras del sistema inmunológico por expresión de una citocina inmunomoduladora conocida como la interleucina viral 10 (vIL-10). (6)

A continuación, se revisan algunas de las evidencias sobre las vías por las que HCMV logra modular y/o evadir la respuesta inmune.

3.1. RESPUESTA INMUNE INNATA ANTI HCMV: INTERFERONES

La infección por HCMV inicia rápidamente la respuesta inmune innata por la activación de los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) que pueden localizarse en las membranas plasmáticas y endosomales, como es el caso de los Receptores de Tipo Toll (TLRs) que son fundamentales en la función de las células

presentadoras de antígenos como los macrófagos y células dendríticas. Otros PPRs tienen ubicación intracitoplasmática y están en casi todos los tipos celulares; entre los cuales se encuentran los Receptores de tipo NOD (NLRs), el Gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I), la sintasa de GMP/AMP cíclico (cGAS) y el Activador dependiente de ADN de factores reguladores de Interferón (DAI), entre otros. (7,8) En particular, el TLR2 junto con CD14, puede activarse por el reconocimiento de las glicoproteínas de envoltura del HCMV gB y gH, seguido de la activación de la respuesta inmune innata por la vía del NF-κB en las células infectadas – como las epiteliales en la mucosa oral – generando el estado antiviral, con secreción de citocinas que ejercen un efecto paracrino en células no inmunitarias y activando a las células del sistema inmunológico (Tabla 3.1. y Figura 3.1.) (9,10,11)

Luego del ingreso del virus, durante la replicación, se generan ARNs o ADNs virales de doble cadena que desencadenan la producción de IFN, que son las principales citocinas con capacidad antiviral, y se clasifican en IFN tipo I, tipo II y tipo III según sus receptores, vías de señalización y efectos. En el tipo I se ubican el IFNα (13 isoformas), IFNβ, IFNκ, IFNε, IFNω, el IFN de tipo II es el IFNγ y de tipo III es el IFNλ. (11) Los Interferones tipo I ejercen sus efectos al unirse a los receptores IFNAR 1 y 2, presentes en muchos tipos celulares, provocando la activación de tirosinaquinasas TYK2 y JAK1, la fosforilación y activación de STAT1 y 2, que junto con IRF3 forman el complejo ISGF3 el cual migra al núcleo para promover la transcripción de los genes estimulados por IFN (ISGs). El IFNγ interactúa en la membrana celular con su receptor IFNGR 1 y 2, seguido de la activación de JAK 1 y 2, que se encuentran unidos al receptor y que a su vez fosforilan a STAT 1, proteína que se transloca al citoplasma para formar el homodímero GAF, que luego se desplaza al núcleo y promueve la transcripción de ISGs. (12)

Los IFN inhiben la traducción del genoma viral por activación de la proteína quinasa R (PKR), inducen la enzima 2´5´Oligoadenilato sintasa (2´5´OAS) para catalizar la síntesis de oligómeros de adenosina a partir de ATP, que se unen y activan la enzima RNAasa-L llevando a la degradación de transcritos celulares y virales. También inducen producción de óxido nítrico por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la sobreregulación de la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (CMH-II). El efecto antiviral también es indirecto, a través de la activación y maduración de células dendríticas, activación de células NK, activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T y B. (Figura 3.1.) (11,13)

3.2. ACTIVIDAD ANTI-INTERFERÓN DE CITOMEGALOVIRUS

Por diversos mecanismos, HCMV puede contrarrestar la activación de la respuesta inmune innata; por ejemplo, se ha demostrado que pp65 inhibe la fosforilación y localización nuclear de IRF-3, un factor de transcripción activado por IFNβ. En detalle, el cGAS es un sensor citosólico de ADN de doble cadena y sintetiza un segundo mensajero - cGAMP - luego de la infección viral; la proteína pp65 se une a cGAS inhibiendo su actividad enzimática, afectando el eje cGAS-STING y llevando a regulación a la baja de la producción de IFNβ. (14,15) Sin embargo, esta inhibición no es suficiente para apagar completamente la respuesta de IFNs porque la vía del

NF-κB continúa activa. Los resultados en diferentes modelos pueden parecer contradictorios, pero esto puede explicarse por el tipo celular empleado, grado de diferenciación celular y la MOI con la que se realiza la infección. (14)

Tabla 3.1. Receptores de Reconocimiento de Patrones, localización y vías de señalización activadas en respuesta a la infección por HCMV. Adaptada de Biolatti y cols. (7)

PPR	Localización	Vía de respuesta activada
TLR2	Membrana celular	IFN β vía MYD88; IL-6, IL-8, IL-12 vía NF- κB
SR-A1		IFN β vía TRIF
TLR3	Endosomas	IFN β vía TRIF; IL-6, IL-8, IL-12 vía NF-κB
TLR9		IFN β vía MYD88; IL-6, IL-8, IL-12 vía NF-κB
NOD1	Citoplasma	IFN β
DAI		IFN β vía DDX3
NOD2		IFN β vía IRF3, IL-8 vía NF-κB
cGAS	Núcleo y citoplasma	IFN α, IFN β vía STING

IFN: Interferón; NFkB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; TRIF: Adaptador con dominio TIR, inductor de IFNβ; IRF3: Factor Regulador de Interferón 3; STING: Estimulador de genes de Interferón; DDX3: Ácido Ribonucleico (RNA) helicasa dependiente de ATP.

En los modelos de infección de células THP-1 con la cepa Toledo de HCMV, se encontró que la interacción de las vías activadas por receptores SR-A1 con las vías activadas por TLR3 y 9, provocan la sobreregulación de la vía de IRF-3 y de algunas citocinas mediadas por la vía NF-κB. A los 10 minutos posinfección (mpi.) se observó un aumento de la expresión de FNTα y de IL-12p35 y una hora después, de IFNβ. (16) Mientras que la infección de las mismas células con la cepa TB40/E aumentó la expresión de cGAS e indujo la síntesis de IFNs vía STING. (17) Estos resultados sugieren que las cepas virales altamente pasajeadas pueden modular diferencialmente la respuesta inmune antiviral. Es notable que, aunque se reconoce la inhibición en la producción de IFNβ, en el caso de las células THP-1 infectadas con TB40/E se estimuló la síntesis de Interferones.

La proteína tegumentaria UL31 ejerce un efecto semejante al de pp65 y tal vez complementario; por ejemplo, se ha reportado que en líneas celulares fibroblásticas la proteína UL31, puede interactuar directamente con cGAS separando el ADN de doble cadena, lo que conlleva a la disminución de la producción de cGAMP y a la regulación a la baja de IFN tipo I. (18)

La proteína pp71, codificada por el gen UL82 también regula negativamente la vía de STING alterando la formación del complejo de translocación que lo trasporta del retículo endoplasmático (ER) a los microsomas perinucleares e inhibe el reclutamiento de TBK1 (Proteína Quinasa Serina/Treonina 1) y de IRF-3 al complejo STING. (19)

Figura 3.1. Activación de respuesta inmune innata y actividad anti-Interferón de HCMV.

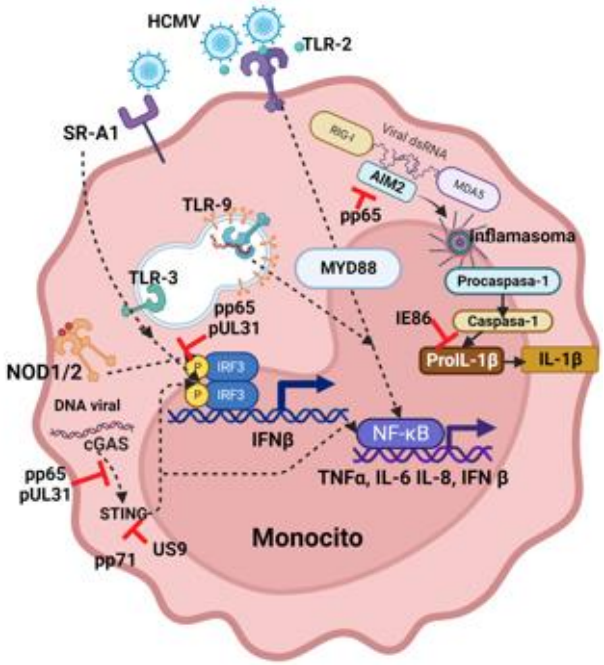


Figura 3.1. Se muestra la activación de los Receptores de Reconocimiento de Patrones extra e intracelulares por componentes de la envoltura y material genético de HCMV, activación de diversas vías de señalización de la respuesta inmune antiviral y síntesis de citocinas proinflamatorias, como el IFNβ, FNTα, IL-6, IL-8. Se señalan **(T)** algunos de los puntos de estas vías de activación que son interrumpidos por proteínas de HCMV. Elaborada con Biorender.

En una vía semejante, la proteína US9 de HCMV disminuye la afinidad de la unión entre STING y TBK1 a través de una interacción competitiva con ambas moléculas, bloqueando la dimerización de STING y finalmente inhibiendo la expresión de IFNβ; a medida que se incrementa en el tiempo la concentración de US9 disminuye la expresión de IFNβ. (20)

3.3. INFLAMASOMAS EN LA INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS

Luego de la infección por HCMV, en respuesta a la activación de los PPRs, se activan y conforman los inflamasomas, que son complejos proteicos ubicados en el citosol y que luego de la infección viral inducen la activación de caspasas y la maduración de citocinas proinflamatorias como IL-1β e IL-18, efecto demostrado luego de la infección con HCMV en células como los fibroblastos gingivales humanos. (Figura 3.1.) (21,22) Algunos de estos complejos proteicos están conformados por NLRP1, AIM2 y RIG-1; el primero es activado por ARN viral y la proteína viroporina, los otros dos son activados por ADN y ARN de doble cadena, respectivamente. (22)
En células THP-1 infectadas con la cepa AD169 de HCMV se activa el inflamasoma AIM2, con una elevación significativa de los niveles de IL-1β y de IL-18, la cual se sostuvo invariable hasta las 96 horas posinfección (hpi). Además, se determinó la

acumulación de Lactato deshidrogenasa en el sobrenadante de las células infectadas, efecto asociado a la muerte celular; sin embargo, en este modelo se logró establecer que AIM2 tuvo un efecto negativo sobre el ciclo celular inducido por la transcripción de genes virales tempranos (UL54) y tardíos (UL83). (23) Continuando con esta línea, también se pudo corroborar que en las células THP-1, la proteína UL83 (pUL83 o pp65) interactúa con la proteína AIM2 del inflamasoma, degradándola y disminuyendo sus niveles a las 24 hpi.; como consecuencia, no hay activación de caspasas, el precursor de la IL-1β no se activa, y no se produce la IL-1β, como tampoco la IL-18, probablemente facilitando el establecimiento de latencia. (Figura 3.1.) (23,24,25)

3.4. LINFOCITOS CITOCIDAS NATURALES (NK) EN LA INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS

Los linfocitos NK hacen parte de la primera línea de defensa ante las infecciones virales al inducir la muerte de las células infectadas por diferentes mecanismos como la Citotoxicidad Dependiente de Anticuerpos (CDA), la activación de los receptores extracelulares de muerte y la exocitosis de gránulos que contienen granzimas y perforinas. (26) La infección con HCMV induce la muerte celular por la expresión de receptores de muerte en la membrana de los linfocitos NK, los cuales interactúan con Fas Ligando (Fas-L) y TRAIL (Ligando Inductor de Apoptosis relacionado con el Factor de Necrosis Tumoral), entre otros, provocando la apoptosis de las células infectadas.

Por su parte, la CDA es otro mecanismo por el cual las células NK pueden controlar la infección por HCMV, a través del CD16 un receptor del fragmento Fc de las inmunoglobulinas antivirales. Finalmente, debe recordarse que las células NK pueden producir IFNγ, dirigiendo la respuesta inmune adaptativa hacia un perfil de linfocitos T helper 1 (Th1). (27,28)

De otra parte, péptidos derivados de la proteína UL40 del HCMV inducen la expansión, activación y diferenciación de la subpoblación de células citocidas naturales positivas para NKG2C, en el contexto de moléculas HLA-E del CMH-I, como parte de la respuesta antiviral; esta subpoblación persiste luego del control de la infección por lo que se considera que son células con memoria inmunológica. (29)

Los mecanismos por los que HCMV puede evadir la acción de los linfocitos NK son básicamente para suprimir las señales de activación de los receptores de estas células o para desencadenar la señalización inhibitoria. (27)

El receptor NKG2D de los linfocitos NK se une a receptores expresados en las membranas de las células infectadas, como la proteína A relacionada con la cadena del CMH-I (MICA), MICB, proteína 1 de unión a UL16 (ULBP1- una proteína de HCMV) y proteínas ULBP2 a 6. Cuando esto sucede, -en particular cuando se une UL16 a las proteínas ULBP-, se produce una retención intracelular de dichas proteínas y de MICB, lo que disminuye la actividad citotóxica de los linfocitos sobre las células infectadas, por la disminución en la activación de NKG2D. (30,31) Algo similar se ha reportado para los genes UL142, US12-2-1 sobre los ligandos de NKG2D: MICA, MICB y ULBP2 y 3, los cuales son inhibidos por mecanismos similares de retención en el aparato de Golgi, en el citoplasma o por su degradación en lisosomas. (27,32,33)

DNAM-1 es otro receptor de los linfocitos NK que funciona como molécula de adhesión que también activa la citotoxicidad y la producción de IFNγ. Los ligandos de DNAM-1 son CD112 y CD155 que se expresan en las membranas celulares bajo condiciones de estrés. En el contexto de la infección por HCMV, la proteína UL141 induce la degradación proteasomal de CD155, disminuyendo así su expresión superficial. (34) Se resalta que las cepas de laboratorio de HCMV altamente pasajeadas, como Towne y AD169, se caracterizan por la deleción del segmento genómico UL/b´ que va desde UL133 hasta UL151 -en el cual se ubica UL141-; por lo tanto, en modelos de infección *in vitro* con estas cepas, se observó la sobre regulación de CD155. (35)

El HCMV también interfiere con la activación del CD16 o receptor de Inmunoglobulinas (FcγR) en la membrana de las células NK, que induce CDA. En este caso, son las glicoproteínas gp34 y gp68 del virus que se unen a los FcγR I, II y III, antagonizando su efecto en la respuesta inmunológica antiviral; simultáneamente se unen a la molécula de la IgG y con una acción sinérgica, llevan a la internalización de los complejos inmunes. (36,37)

En el otro extremo de la capacidad de evasión inmune de HCMV sobre las células NK, se encuentra la persistencia o el incremento de las respuestas inhibitorias que en condiciones de no infección impiden el reconocimiento y eliminación de células sanas. Uno de estos mecanismos es la expresión del CMH-I en la membrana de las células no infectadas; la cual actúa como una señal inhibitoria para los linfocitos NK. Se sabe que HCMV inhibe la expresión de esta molécula en la membrana de las células infectadas, así que a través de proteínas como UL18 (un homólogo del CMH-I), simula la señal en las células NK e impide el reconocimiento de las células infectadas. (27,38) La proteína viral UL18 también se une con alta afinidad a LIR-1 (Receptor 1 de Leucocitos semejante a Inmunoglobulina) expresado en las células NK el cual es un receptor del CMH-I. En este caso, cuando UL18 se une a LIR-1 no es posible el reconocimiento de las células infectadas y por esta vía HCMV también afecta la activación de las células NK LIR-1+. (39)

3.5. ALTERACIÓN EN LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS EN LA INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS

Un evento muy importante en el reconocimiento del antígeno y activación de la inmunidad adaptativa es la presentación antigénica, y como se dijo previamente, HCMV tiene un impacto sobre esta actividad del sistema inmunológico. Este virus codifica algunas glicoproteínas que inhiben la síntesis y expresión de moléculas del CMH-I; por ejemplo, US6 evita la translocación de péptidos procesados en el proteasoma vía TAP (Transportador de Antígeno Procesado), hacia el ER donde son cargados en las moléculas del CMH. Por otra parte, US3 retiene las moléculas del CMH en el ER y US2 junto con US11 inducen una retro translocación hacia el citoplasma a través del canal Sec61, llevando a degradación del CMH en el proteasoma. Finalmente, UL82, retiene la salida del CMH-I desde el ER hacia el Golgi. (5,40,41,42)

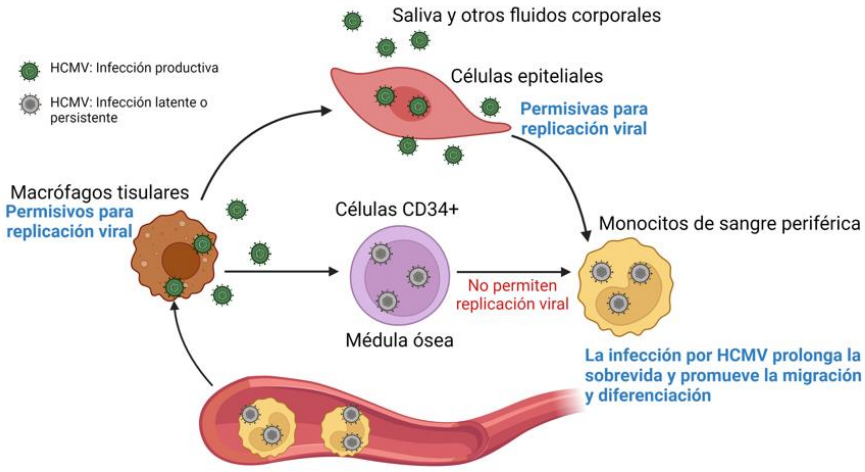
3.6. EFECTO DE LA INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS EN CÉLULAS MONOCÍTICAS

Teniendo presente que HCMV establece latencia en las células CD34+ de la médula ósea y su genoma persiste en las células del linaje mieloide hasta los monocitos de sangre periférica, es necesario revisar qué ocurre con los monocitos al respecto de la influencia de este virus sobre la respuesta inmune, puesto que los monocitos tienen un papel muy importante en la infección y transmisión viral, ya que facilitan la diseminación a distintos órganos y tejidos durante la infección primaria y la reactivación.

La figura 3.2. resume el trascurso de la infección primaria, a través de células epiteliales, infección de monocitos, trasporte en la circulación sanguínea, diferenciación a macrófagos tisulares, que pueden trasportar el virus a la médula ósea, propiciando la infección de células CD34+, y el paso del genoma viral en las células del linaje mieloide para llegar a los monocitos de sangre periférica. (43)

Se ha demostrado la modulación de la respuesta inmune innata en monocitos de sangre periférica infectados con la cepa de HCMV TB40/E, en un modelo de infección, latencia y reactivación a corto plazo (hasta 6 dpi). Con este modelo se observó el rápido establecimiento de latencia (transcripción de ARNs mensajeros asociados a latencia como UL138) desde las 24 hpi.; también se observó que las células con infección latente se diferenciaron a macrófagos M1, con un aumento en la expresión de CD14, CD163 y CD169 y de las moléculas del CMH-II. (44)

Figura 3.2. Infección primaria y diseminación de HCMV en monocitos y macrófagos.



Se muestra el curso de HCMV desde la infección primaria a través de fluidos corporales, con infección productiva en células epiteliales, pasando a los monocitos de sangre periférica y llegando a los tejidos a través de los macrófagos derivados de los monocitos infectados y que llevan el virus a la médula ósea, para infectar las células CD34+ y establecer latencia; la diferenciación en el linaje mieloide lleva células que portan el genoma viral a la circulación periférica. (43) Elaborada con Biorender.

Llama la atención la sobre-regulación de CD163 y CD169 en las células tratadas con virus inactivado con U.V (incapaz de replicarse), efecto que podría atribuirse a la unión de las moléculas de la envoltura o del tegumento viral a receptores en la superficie celular, evento que según los autores podría contribuir en el

establecimiento de latencia. Igualmente, se evidenció que la infección de los monocitos de sangre periférica indujo la diferenciación preferencialmente a macrófagos y limitó la diferenciación hacia células dendríticas, debido a la expresión disminuida o ausente de CD1a, probablemente con el fin de inhibir el reconocimiento de las células infectadas por el sistema inmunológico y de promover el fenotipo de las células que pueden facilitar la diseminación de la infección viral. (44)

En este mismo modelo, el secretoma de las células infectadas -frente a las no infectadas-, demostró una producción selectiva de citocinas proinflamatorias como CXCL-10, FNT-α, IL-6 e IFNα y quimiocinas como CCL2, CCL7 y CCL8; y una disminución en la secreción de CCL13 y CCL24. Este perfil proinflamatorio o M1 se evidenció a las pocas horas luego de la infección y se mantuvo hasta el día seis. En células expuesta al virus TB40/E inactivadas con luz U.V., el secretoma presentó diferencias respecto a las células infectadas, con una disminución significativa de CXCL-10, FNT-α, CCL13 y CCL8, sugiriendo que el genoma viral o el transcriptoma asociado a la latencia, podrían inducir el perfil proinflamatorio del secretoma. (44)

La infección de monocitos CD14+ de donantes sanos con la cepa Towne/E de HCMV, evaluados hasta dos semanas posinfección, también mostró la diferenciación a macrófagos, con aumento del tamaño, de la granularidad, de la movilidad y de la actividad fagocítica, respecto a células no infectadas.

En cuanto a los marcadores de superficie, se detectó la expresión de HLA-DR a las 96 hpi con incrementó hasta el final del periodo de observación, mientras que en células no infectadas no se detectó este marcador. Por otra parte, el marcador CD68 se expresó tanto en las células infectadas como no infectadas, sin embargo, la expresión fue más temprana y de mayor magnitud en los monocitos infectados con HCMV. (45)

Como se ha mencionado antes, la infección de los monocitos de sangre periférica por HCMV induce la diferenciación a macrófagos, células que parecen ser permisivas a la replicación viral o por lo menos al inicio del ciclo replicativo, lo que se puede demostrar por la detección de la proteína Inmediatamente temprana IE, pero también la detección de gH, una proteína tardía. En monocitos de sangre periférica infectados con la cepa Towne/E, se buscó detectar estas proteínas por inmunofluorescencia. A las 2 semanas posinfección, entre el 10 y el 15% de las células fueron positivas y a las 4 semanas entre el 20 y el 25% de las células fueron positivas para las proteínas IE y gH y también para el marcador celular CD68; además, las células diferenciadas presentaron la morfología anteriormente descrita, que correspondió al fenotipo de los macrófagos. Según estos hallazgos, la diferenciación de los monocitos a macrófagos, con un perfil inflamatorio, parece desbloquear la expresión de los genes virales asociados al ciclo replicativo, lo que se demostró titulando por plaqueo a las 4 semanas con un título de 10^3 UFP/mL. (45)

En el trabajo en que se evaluó la expresión de proteínas, también se estudió la diseminación *in vitro* de HCMV en células monocíticas activadas por la infección, con ensayos de migración transendotelial de monocitos de sangre periférica CD14+ y utilizando la línea celular HMEC (*human dermal microvascular endothelial cells*). De esta forma se pudo determinar que las células infectadas, expuestas al virus inactivado con U.V., o las células tratadas con PMA (forbol 12-miristato 13-acetato), – un inductor de diferenciación-, migran 4 veces más que las células no tratadas y

no infectadas, lo que indica que la activación o el incremento de la motilidad celular es consecuencia de la infección por este virus. (45)
La evaluación del perfil de expresión de todo el genoma de los monocitos de sangre periférica infectados con la cepa TB40/E -utilizando un microarreglo con aproximadamente 47.000 sondas-, evidenció la sobre-regulación de 348 genes asociados a la respuesta inflamatoria – inmunológica y antiviral. Por citar algunos ejemplos, hubo una sobre regulación de los genes OAS, ISG, STAT1, MX1 (Proteína de unión a GTP inducida por Interferón), IFIT-1 (Proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1), CCL8, CXCL10, CCL7, CCL13. Mientras que los genes con regulación a la baja estaban implicados principalmente en procesos metabólicos, biosíntesis lipídica y síntesis proteica. (44)
En un modelo de latencia a largo plazo de células CD14+ infectadas con la cepa Fix y con la cepa AD169 derivada de un BAC, las células fueron mantenidas en suspensión durante 10 y 14 días, sin observar diferenciación hasta que las células fueron tratadas con estímulos específicos (Factor Estimulador de Colonias de Monocitos / Macrófagos e IL-3) para inducir la diferenciación a macrófagos. Al infectar las células a las 24 h de cultivo, con la cepa Fix a una MOI de 1, el 35% de las células fueron positivas para la proteína fluorescente verde, mientras que la infección con la cepa AD169 a una MOI de 20, solo alcanzó a ser positiva en el 14% de las células. (46)
Los monocitos infectados con la cepa Fix mostraron expresión transitoria hasta 3 dpi., de los genes UL122 y UL123 (codifican las proteínas inmediatamente tempranas), mientras que las células infectadas con la cepa AD169 mostraron expresión de estos genes desde el día 1 hasta 10 dpi. Se observó también disminución de la expresión de HLA-DR en los monocitos infectados con Fix, respecto a monocitos que no fueron infectados, tanto a los 2 dpi., como a los 20 dpi. (46)

3.7. PAPEL DE LA IL-10 VIRAL (vIL-10)

Las células infectadas con HCMV pueden secretar una citoquina semejante a la IL-10, denominada vIL-10, que contribuye en la modulación de la respuesta inmunológica en el microambiente inflamatorio generado por la infección. (47) La vIL-10 se produce por *splicing* alternativo, es codificada por el gen UL111A y tiene una homología de aproximadamente el 25% con la secuencia de aminoácidos de la IL-10 humana. Esta citoquina inhibe la proliferación y la síntesis de citoquinas en linfocitos de sangre periférica, con la misma capacidad que tiene la IL-10 humana, y reduce la expresión de moléculas del CMH-I y II. También induce la síntesis de la IL-10 humana por monocitos de sangre periférica, macrófagos y células dendríticas inmaduras, potenciando los efectos inmunomoduladores y disminuye la activación de células dendríticas, la producción de citoquinas proinflamatorias y la expresión de CMH-II, en estas células. (48,49)
En modelos *in vitro* con monocitos de sangre periférica, el tratamiento con la vIL-10 recombinante indujo una polarización celular a macrófagos tipo M2c; este es un subtipo de macrófago del fenotipo M2, que además de ser estimulado por la cmvIL-10, expresa CD206, produce IL-10 y su función fisiológica es la fagocitosis de células apoptóticas. También se observó en estas células un aumento en la expresión de CD163 y CD14, disminución simultanea de la expresión del CMH-II,

inhibición indirecta de la actividad proinflamatoria por la sobrerregulación de la enzima HO-1 (Hemo-oxigenasa 1) que inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias como el FNTα y la IL-1β; además de la disminución de la actividad de estos macrófagos M2c para estimular a los Linfocitos TCD4+. (50)
Lo anteriormente expuesto sugiere que la función de la vIL-10 de HCMV es limitar o inhibir la respuesta inmunológica para eliminar las células infectadas, permitir la replicación y la diseminación viral y facilitar el establecimiento de una infección crónica o latente.

Con esta evidencia, ha sido propuesta una secuencia temporal de eventos en la infección primaria de los monocitos por HCMV, la diferenciación a macrófagos y la modulación de la respuesta inflamatoria – inmunológica. En las primeras 72 hpi. ocurre el reconocimiento de las glicoproteínas de la envoltura viral por los PPRs, la entrada del virus y su traslocación al núcleo, donde se evidencia activación de las vías de señalización asociadas a Interferones. (51)
Luego de las 72 hpi. y hasta las dos semanas pos-infección, ocurre la expresión de marcadores como HLA-DR, CD68, CD163, CD14, con diferenciación a un fenotipo M1, proinflamatorio que luego da paso a un fenotipo M2 con síntesis de la vIL-10 y la IL-10 humana, con inhibición de la respuesta inmune antiviral. Finalmente se evidencia la replicación viral por la expresión de las proteínas IE1/2 y la producción de partículas virales. Recordando además que el *splicing* alternativo del gen UL111A induce -también-, la síntesis de la IL-10 asociada a latencia. (51)

3.8. ACTIVIDAD ANTI APOPTÓTICA DE CITOMEGALOVIRUS EN MONOCITOS INFECTADOS

La inducción de muerte celular es un mecanismo antiviral reconocido, que favorece la pérdida o reducción de las células infectadas. A continuación, se describirán algunos de los mecanismos y vías por los que HCMV puede prevenir la muerte celular de los monocitos infectados.
La vida media de los monocitos de sangre periférica es de aproximadamente 1 a 3 días; si estas células son infectadas con HCMV, su corto periodo de vida es incompatible con el lento ciclo replicativo del virus. Para el HCMV, la solución –aparente-, es inducir la diferenciación de estas células a macrófagos, las cuales le permiten al virus completar su ciclo replicativo y tienen una sobrevida de varios meses, favoreciendo de ese modo no solo la replicación sino también la diseminación viral. Adicionalmente HCMV también puede afectar la sobrevivencia de los monocitos, con una actividad anti apoptótica.

El reconocimiento de los patrones moleculares de HCMV por los respectivos receptores, además de iniciar vías de señalización anteriormente mencionadas, también activa la vía extrínseca de la apoptosis. (52) La cual se activa naturalmente por la unión de los ligandos Fas-L o FNTα a sus respectivos receptores Fas R y RFNT1 o RFNT2 (Receptor del Factor de Necrosis Tumoral tipo 1 y tipo 2), presentes en la membrana celular. La activación de los receptores de muerte celular

conlleva a su vez a la activación de la caspasa 8 (iniciadora) y por lo tanto de la vía extrínseca de la apoptosis. (52)

En el caso del HCMV el gen UL36, codifica una proteína que hace parte del tegumento viral, y tiene la capacidad de inhibir la apoptosis, ya que este producto del gen UL36 denominado vICA, inhibe la activación de la caspasa 8. Las células THP-1 fueron tratadas con PMA e infectadas con una cepa mutante de HCMV ΔUL36-Towne-BAC, con la cepa RC2940 (preparada a partir de un derivado purificado en placa de la cepa Towne variante RIT3), o las cepas RC2792 y RQ2792; y se observó la inhibición de las vías apoptóticas dependientes de caspasa 8, y la inhibición de las vías independientes de caspasa 8, que incluyen una vía de la serina proteasa controlada por la proteasa mitocondrial HtrA2/Omi y de la proteína de interacción con el receptor (RIP), dependiente de cinasa. Adicionalmente, se estableció que en las células tratadas con virus mutantes para vICA/pUL36, se inició el programa de muerte dependiente de caspasa 8 en las etapas tempranas de la diferenciación a macrófagos, mientras que las vías independientes de caspasa 8 actúan en etapas tardías de la diferenciación. (53)

Otro de los mecanismos empleados por el HCMV para inhibir la apoptosis de los monocitos con infección persistente es a través del ARN no codificante largo β2.7, un reconocido trascrito asociado a latencia, el cual previene la muerte celular al disminuir la concentración intracelular de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS), por la sobreregulación de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y Glutation peroxidasa (GPX-1). (54)

En modelos de infección de monocitos de sangre periférica con la cepa Towne/E de HCMV, se observó la modulación de vías las de señalización proapoptósicas que se activan, para prolongar la sobrevivencia de los monocitos. De esta forma, se observó como HCMV toma el control de la vía de señalización que se activa luego de la unión de gB o de otras glicoproteínas de la envoltura viral al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (RFCE), sobreregulando la fosfatidilinositol-3–cinasa (PI3K), lo cual provoca un bloqueo temprano (0 a 48 hpi) de la apoptosis. La sobre-regulación de PI3K también induce la producción transitoria de la proteína anti apoptótica Mcl-1 (Proteína de diferenciación de la Leucemia Mieloide inducida), promoviendo un fenotipo de monocitos con una sobrevivencia prolongada, (55) al prevenir el clivaje y la activación de la caspasa 3 (efectora). Luego de las 48 hpi, -al parecer- esta función es asumida por Bcl-2, otra proteína anti apoptótica, que es sobre regulada por la unión de los receptores celulares a integrinas en la membrana celular, por un mecanismo de acción similar al de Mcl-1. (56) Estos resultados resaltan la capacidad de HCMV para inhibir la apoptosis que debería ocurrir naturalmente o en respuesta a la infección viral, en los monocitos de sangre periférica; y esta sobrevida prolongada, permite el inicio de la diferenciación celular y del ciclo replicativo viral.

3.9. CONCLUSIÓN

La actividad inmunomoduladora de HCMV es compleja y afecta tanto a la inmunidad innata como adquirida. Varios genes y proteínas virales inducen la regulación a la baja de los interferones, especialmente IFNβ, alteran la función de los inflamasomas, la actividad citocida de los linfocitos NK y la presentación de antígenos.

Adicionalmente, en los monocitos de sangre periférica -que tienen un papel importante en la infección primaria, en la reactivación y en la diseminación de la infección viral-, el virus induce un estado proinflamatorio inicial, cuyo efecto parece ser la activación de los monocitos para incrementar la movilidad, atraer nuevas células, al tiempo que inhibe la apoptosis e induce la diferenciación a macrófagos, con un incremento del homólogo viral de la IL-10 humana que ejerce un efecto inmunosupresor de la respuesta antiviral.

Este virus consigue que los monocitos trasporten el genoma o partículas virales en la circulación sanguínea, se activen, emigren atravesando las paredes vasculares y se diferencien a macrófagos en distintos compartimientos tisulares, con ocurrencia de la replicación viral.

Finalmente, estos aspectos resultan importantes para reconocer la capacidad moduladora del HCMV en estas células y entender la patogenia de la infección viral principalmente en pacientes con supresión inmunológica. En estos individuos la infección primaria o la reactivación puede tener efectos directos debidos a la replicación viral, provocando lo que se conoce como enfermedad de órgano terminal, con manifestaciones como la gastroenteritis, hepatitis y otras. De otra parte, esta infección podría tener efectos indirectos, debidos a la participación viral en procesos inflamatorios, ejerciendo una fuerte actividad inmunomoduladora, como se resume en la figura 3.3. (3,57)

Figura 3.3. Participación directa e indirecta de HCMV en la patogenia de las complicaciones en los pacientes inmunosuprimidos.

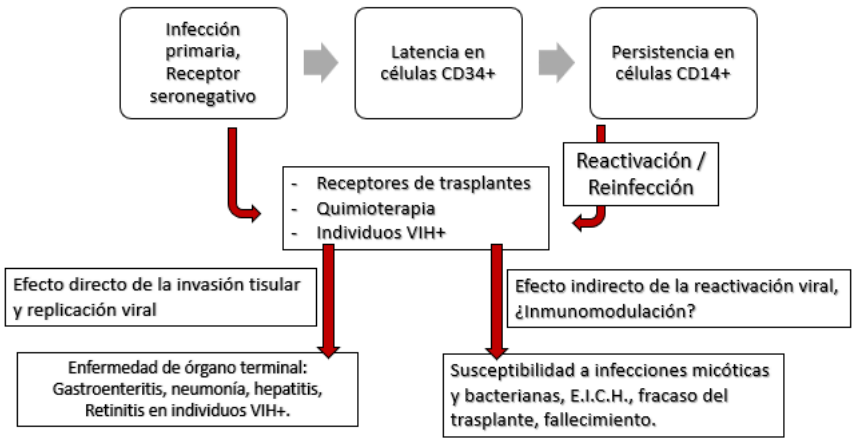


Figura A través de la infección primaria o por la reactivación o reinfección (adquisición de un genotipo distinto por una infección nueva), HCMV puede replicarse en los macrófagos tisulares y este proceso junto con la inducción de un estado proinflamatorio, ejerce efectos directos con la Enfermedad de órgano terminal o efectos indirectos causados por la inducción proinflamatoria e inmunomoduladora diferencial, con las consecuencias mencionadas.

3.10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cannon M.J., Schmid D.S., Hyde T.B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. Rev Med Virol. 2010 Jul;20(4):202-13. doi: 10.1002/rmv.655.
2. Zuhair M., Smit G.S.A., Wallis G., Jabbar F., et al. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. Rev Med Virol. 2019 May;29(3):e2034. doi: 10.1002/rmv.2034.
3. Griffiths P., Reeves M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. Nat Rev Microbiol. 2021; 19(12):759-773. doi: 10.1038/s41579-021-00582-z. Epub 2021 Jun 24.
4. Abbas A. Lichtman A.Pillai S. Inmunología celular y molecular. Novena Edición Copyright © 2018 Elsevier España, S.L.U. https://www-clinicalkey-com.ezproxy.unbosque.edu.co/student/content/book/3-s2.0-B978849113275200016X#hl0000884
5. Mocarski E.S Jr. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. Trends Microbiol. 2002; 10(7):332-9. doi: 10.1016/s0966-842x(02)02393-4.
6. Forte E., Zhang Z., Thorp E.B., Hummel M. Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. Front Cell Infect Microbiol. 2020; 10:130. doi: 10.3389/fcimb.2020.00130.
7. Biolatti M., Gugliesi F., Dell'Oste V., Landolfo S. Modulation of the innate immune response by human cytomegalovirus. Infect Genet Evol. 2018; 64:105-114. doi: 10.1016/j.meegid.2018.06.025.
8. Dell'Oste V., Biolatti M., Galitska G., Griffante G., et al. Tuning the Orchestra: HCMV vs. Innate Immunity. Front Microbiol. 2020;11:661. doi: 10.3389/fmicb.2020.00661.
9. Compton T., Kurt-Jones E.A., Boehme K.W., Belko J., et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. J Virol. 2003; 77(8):4588-96. doi: 10.1128/jvi.77.8.4588-4596.2003.
10. Boehme K.W., Guerrero M., Compton T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. J Immunol. 2006; 177(10):7094-102.
11. Goodwin C.M., Ciesla J.H., Munger J. Who's Driving? Human Cytomegalovirus, Interferon, and NFκB Signaling. Viruses. 2018; 10(9):447. doi: 10.3390/v10090447.
12. Bonjardim C.A. Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses and viruses counteract IFN action. Microbes Infect. 2005; 7(3):569-78. doi: 10.1016/j.micinf.2005.02.001.
13. Prada-Arismendy J., Castellanos J. Genes de susceptibilidad/resistencia a flavivirus, implicaciones en la severidad de la infección. Acta biol. Colomb. 2006; 11(2): 21-30.
14. Abate D.A., Watanabe S., Mocarski E.S. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. J Virol. 2004; 78(20):10995-1006. doi: 10.1128/JVI.78.20.10995-11006.2004.
15. Biolatti M, Dell'Oste V, Pautasso S, Gugliesi F, et al. Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp65 (pUL83) Dampens Type I Interferon Production by Inactivating the DNA Sensor cGAS without Affecting STING. J Virol. 2018; 92(6):e01774-17. doi: 10.1128/JVI.01774-17.

16. Yew K.H., Carsten B., Harrison C. Scavenger receptor A1 is required for sensing HCMV by endosomal TLR-3/-9 in monocytic THP-1 cells. Mol Immunol. 2010; 47(4):883-93. doi: 10.1016/j.molimm.2009.10.009.
17. Paijo J., Döring M., Spanier J., Grabski E., et al. cGAS Senses Human Cytomegalovirus and Induces Type I Interferon Responses in Human Monocyte-Derived Cells. PLoS Pathog. 2016; 12(4):e1005546. doi: 10.1371/journal.ppat.1005546.
18. Huang Z.F., Zou H.M., Liao B.W., Zhang H.Y., et al. Human Cytomegalovirus Protein UL31 Inhibits DNA Sensing of cGAS to Mediate Immune Evasion. Cell Host Microbe. 2018; 24(1):69-80.e4. doi: 10.1016/j.chom.2018.05.007.
19. Fu Y.Z., Su S., Gao Y.Q., Wang P.P., et al. Human Cytomegalovirus Tegument Protein UL82 Inhibits STING-Mediated Signaling to Evade Antiviral Immunity. Cell Host Microbe. 2017; 21(2):231-243. doi: 10.1016/j.chom.2017.01.001.
20. Choi H.J., Park A., Kang S., Lee E., et al. Human cytomegalovirus-encoded US9 targets MAVS and STING signaling to evade type I interferon immune responses. Nat Commun. 2018; 9(1):125. doi: 10.1038/s41467-017-02624-8.
21. Botero J.E., Contreras A., Parra B. Profiling of inflammatory cytokines produced by gingival fibroblasts after human cytomegalovirus infection. Oral Microbiol Immunol. 2008; 23(4):291-8. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00427.x.
22. Chen I.Y., Ichinohe T. Response of host inflammasomes to viral infection. Trends Microbiol. 2015; 23(1):55-63. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.007.
23. Huang Y., Liu L., Ma D., Liao Y., et al. Human cytomegalovirus triggers the assembly of AIM2 inflammasome in THP-1-derived macrophages. J Med Virol. 2017 Dec;89(12):2188-2195. doi: 10.1002/jmv.24846.
24. Huang Y., Ma D., Huang H., Lu Y., et al. Interaction between HCMV pUL83 and human AIM2 disrupts the activation of the AIM2 inflammasome. Virol J. 2017; 14(1):34. doi: 10.1186/s12985-016-0673-5.
25. Botto S., Abraham J., Mizuno N., Pryke K., et al. Human Cytomegalovirus Immediate Early 86-kDa Protein Blocks Transcription and Induces Degradation of the Immature Interleukin-1β Protein during Virion-Mediated Activation of the AIM2 Inflammasome. mBio. 2019; 10(1):e02510-18. doi: 10.1128/mBio.02510-18.
26. Lodoen M.B., Lanier L.L. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. Curr Opin Immunol. 2006; 18(4):391-8. doi: 10.1016/j.coi.2006.05.002.
27. De Pelsmaeker S., Romero N., Vitale M., Favoreel H.W. Herpesvirus Evasion of Natural Killer Cells. J Virol. 2018; 92(11):e02105-17. doi: 10.1128/JVI.02105-17.
28. Zuo W., Zhao X. Natural killer cells play an important role in virus infection control: Antiviral mechanism, subset expansion and clinical application. Clin Immunol. 2021; 227:108727. doi: 10.1016/j.clim.2021.108727.
29. Hammer Q., Rückert T., Borst E.M., Dunst J., et al. Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells. Nat Immunol. 2018; 19(5):453-463. doi: 10.1038/s41590-018-0082-6.

30. Welte S.A., Sinzger C., Lutz S.Z., Singh-Jasuja H., et al. Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. Eur J Immunol. 2003; 33(1):194-203. doi: 10.1002/immu.200390022.
31. Wu J., Chalupny N.J., Manley T.J., Riddell S.R., Cosman D., Spies T. Intracellular retention of the MHC class I-related chain B ligand of NKG2D by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. J Immunol. 2003; 170(8):4196-200.
32. Ashiru O., Bennett N.J., Boyle L.H., Thomas M., et al. NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. J Virol. 2009; 83(23):12345-54. doi: 10.1128/JVI.01175-09.
33. Fielding C.A., Weekes M.P., Nobre L.V., Ruckova E., et al. Control of immune ligands by members of a cytomegalovirus gene expansion suppresses natural killer cell activation. Elife. 2017; 6:e22206. doi: 10.7554/eLife.22206.
34. Tomasec P., Wang E.C., Davison A.J., Vojtesek B., et al. Downregulation of natural killer cell-activating ligand CD155 by human cytomegalovirus UL141. Nat Immunol. 2005; 6(2):181-8. doi: 10.1038/ni1156.
35. Cerboni C., Mousavi-Jazi M., Linde A., Söderström K., et al. Human cytomegalovirus strain-dependent changes in NK cell recognition of infected fibroblasts. J Immunol. 2000; 164(9):4775-82. doi: 10.4049/jimmunol.164.9.4775.
36. Corrales-Aguilar E., Trilling M., Hunold K., Fiedler M., et al. Human cytomegalovirus Fcγ binding proteins gp34 and gp68 antagonize Fcγ receptors I, II and III. PLoS Pathog. 2014; 10(5):e1004131. doi: 10.1371/journal.ppat.1004131.
37. Kolb P., Hoffmann K., Sievert A., Reinhard H., et al. Human cytomegalovirus antagonizes activation of Fcγ receptors by distinct and synergizing modes of IgG manipulation. Elife. 2021; 10:e63877. doi: 10.7554/eLife.63877.
38. Reyburn H.T., Mandelboim O., Valés-Gómez M., Davis D.M., et al. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. Nature. 1997; 386(6624):514-7. doi: 10.1038/386514a0.
39. Chapman T.L., Heikeman A.P., Bjorkman P.J. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. Immunity. 1999; 11(5):603-13. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80135-1.
40. Sun J.C., Lanier L.L. The Natural Selection of Herpesviruses and Virus-Specific NK Cell Receptors. Viruses. 2009; 1(3):362. doi: 10.3390/v1030362.
41. Noriega V.M, Hesse J., Gardner T.J., Besold K., et al. Human cytomegalovirus US3 modulates destruction of MHC class I molecules. Mol Immunol. 2012; 51(2):245-53. doi: 10.1016/j.molimm.2012.03.024.
42. Oresic K., Noriega V., Andrews L., Tortorella D. A structural determinant of human cytomegalovirus US2 dictates the down-regulation of class I major histocompatibility molecules. J Biol Chem. 2006; 281(28):19395-406. doi: 10.1074/jbc.M601026200.
43. Chan G., Nogalski M.T., Stevenson E.V., Yurochko A.D. Human cytomegalovirus induction of a unique signalsome during viral entry into

monocytes mediates distinct functional changes: a strategy for viral dissemination. J Leukoc Biol. 2012; 92(4):743-52. doi: 10.1189/jlb.0112040.
44. Noriega V.M., Haye K.K., Kraus T.A., Kowalsky S.R., et al. Human cytomegalovirus modulates monocyte-mediated innate immune responses during short-term experimental latency in vitro. J Virol. 2014; 88(16):9391-405. doi: 10.1128/JVI.00934-14.
45. Smith M.S., Bentz G.L., Alexander J.S., Yurochko A.D. Human cytomegalovirus induces monocyte differentiation and migration as a strategy for dissemination and persistence. J Virol. 2004; 78(9):4444-53. doi: 10.1128/jvi.78.9.4444-4453.2004.
46. Hargett D., Shenk T.E. Experimental human cytomegalovirus latency in CD14+ monocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107(46):20039-44. doi: 10.1073/pnas.1014509107.
47. Poole E., Neves T.C., Oliveira M.T., Sinclair J., da Silva M.C.C. Human Cytomegalovirus Interleukin 10 Homologs: Facing the Immune System. Front Cell Infect Microbiol. 2020; 10:245. doi: 10.3389/fcimb.2020.00245.
48. Avdic S., McSharry B.P., Slobedman B. Modulation of dendritic cell functions by viral IL-10 encoded by human cytomegalovirus. Front Microbiol. 2014; 5:337. doi: 10.3389/fmicb.2014.00337.
49. Avdic S., McSharry B.P., Steain M., Poole E., et al. Human Cytomegalovirus-Encoded Human Interleukin-10 (IL-10) Homolog Amplifies Its Immunomodulatory Potential by Upregulating Human IL-10 in Monocytes. J Virol. 2016; 90(8):3819-3827. doi: 10.1128/JVI.03066-15.
50. Avdic S., Cao J.Z., McSharry B.P., Clancy L.E., et al. Human cytomegalovirus interleukin-10 polarizes monocytes toward a deactivated M2c phenotype to repress host immune responses. J Virol. 2013; 87(18):10273-82. doi: 10.1128/JVI.00912-13. Epub 2013 Jul 17.
51. Min C.K., Shakya A.K., Lee B.J., Streblow D.N., et al. The Differentiation of Human Cytomegalovirus Infected-Monocytes Is Required for Viral Replication. Front Cell Infect Microbiol. 2020; 10:368. doi: 10.3389/fcimb.2020.00368.
52. Salaun B., Romero P., Lebecque S. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. Eur J Immunol. 2007; 37(12):3311-8. doi: 10.1002/eji.200737744.
53. McCormick A.L., Roback L., Livingston-Rosanoff D., St Clair C. The human cytomegalovirus UL36 gene controls caspase-dependent and -independent cell death programs activated by infection of monocytes differentiating to macrophages. J Virol. 2010; 84(10):5108-23. doi: 10.1128/JVI.01345-09.
54. Perera M.R., Roche K.L., Murphy E.A., Sinclair J.H. A Viral Long Non-Coding RNA Protects against Cell Death during Human Cytomegalovirus Infection of CD14+ Monocytes. Viruses. 2022; 14(2):246. doi: 10.3390/v14020246.
55. Chan G., Nogalski M.T., Bentz G.L., Smith M.S., et al. PI3K-dependent upregulation of Mcl-1 by human cytomegalovirus is mediated by epidermal growth factor receptor and inhibits apoptosis in short-lived monocytes. J Immunol. 2010; 184(6):3213-22. doi: 10.4049/jimmunol.0903025.
56. Collins-McMillen D., Kim J.H., Nogalski M.T., Stevenson E.V., et al. Human Cytomegalovirus Promotes Survival of Infected Monocytes via a Distinct

Temporal Regulation of Cellular Bcl-2 Family Proteins. J Virol. 2015; 90(5):2356-71. doi: 10.1128/JVI.01994-15.
57. Freeman R.B. Jr. The 'indirect' effects of cytomegalovirus infection. Am J Transplant. 2009; 9(11):2453-8. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02824.x.

II. **JUSTIFICACIÓN**

El Citomegalovirus humano (HCMV) es un virus perteneciente a la familia *Herpesviridae*, que infecta al 90 -100% de la población en países subdesarrollados. En la mayoría de los individuos seropositivos la infección es asintomática; sin embargo, desde hace tiempo se reconoce la importancia de la infección/reactivación por HCMV en individuos con supresión inmunológica, afectando de manera significativa a los pacientes receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos (RTPH). En estos pacientes el riesgo de complicaciones asociadas a HCMV conlleva -además del riesgo de fallecimiento-, a sobrecostos por días de hospitalización, medicamentos y tratamientos requeridos por el paciente con la probabilidad de fracaso del trasplante.

Algunos estudios han encontrado diferencias en el curso clínico y desenlace en los pacientes receptores de trasplante, relacionados con el(los) genotipo(s) de Citomegalovirus infectante(s); en particular la presencia de más de un genotipo de HCMV se relaciona con una viremia más alta y mayor dificultad para controlar la infección. A pesar de estos resultados la genotipificación no hace parte de los procedimientos diagnósticos de rutina en los pacientes receptores de trasplante.

De otra parte, HCMV puede ser detectado a partir de la saliva, un fluido que se obtiene de forma fácil y segura tanto para el paciente como para el operador; además de la detección es posible llevar a cabo la genotipificación mediante técnicas disponibles hoy en día como la PCR anidada y la secuenciación.

En Colombia, hasta la fecha no hay estudios en los que se intente establecer el genotipo de HCMV en RTPH y menos aun utilizando la saliva como muestra para el diagnóstico y genotipificación del virus, por lo que este estudio buscó la detección de HCMV y la determinación del(los) genotipo(s) a partir de saliva para contribuir en la comprensión del comportamiento de la infección y de los genotipos de este virus, en nuestro medio. Además, se buscó evaluar la posible relación entre los genotipos de HCMV infectantes y el desenlace clínico en una cohorte de pacientes receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos.

Por otra parte, para estudiar los mecanismos patogénicos de HCMV sigue siendo fundamental el trabajo en laboratorio utilizando cultivos celulares. Las células que mayormente se emplean en el cultivo celular de HCMV son fibroblastos humanos de prepucio y piel y la línea celular de fibroblastos humanos de pulmón embrionario (MRC-5); las cuales son muy permisivas para la infección, por lo que se facilita la obtención de resultados, sin embargo, se ha observado que las cepas que han sido sometidas a varios pasajes en cultivos celulares presentan cambios genéticos que las diferencian de los aislados clínicos y de las cepas con bajo número de pasajes en laboratorio, hecho que puede afectar los resultados de los estudios que quieren evaluar la patogenicidad de HCMV, en especial los efectos sobre la respuesta inflamatoria – inmunológica.
Esta situación puede ser superada con la obtención de aislados clínicos de HCMV. La consecución de estos aislados es difícil por características propias del virus,

como su ciclo replicativo lento, el hecho de que las partículas virales permanecen mayormente dentro de las células luego del ciclo replicativo y la presencia de virus contaminantes o adventicios en las muestras. Es por ello por lo que era importante establecer un protocolo de obtención de un aislado clínico, alcanzando un título viral adecuado, y permitiendo llevar a cabo los estudios *in vitro* con resultados mucho más aproximados al comportamiento viral *in vivo*. Inicialmente se propuso la obtención del aislado a partir de las muestras de saliva que se recolectaron para el cumplimiento del primer objetivo y posteriormente empleando otros fluidos corporales.

Finalmente, una de las principales características de HCMV -que puede explicar las complicaciones que se diagnostican en pacientes RTPH-, es su capacidad de modular las respuestas inflamatorias / inmunológicas; por lo que se consideró importante evaluar las diferencias en la actividad inmunomoduladora *in vitro* entre dos cepas laboratorio con alto y bajo número de pasajes y el aislado clínico, con el fin de aportar elementos que permitan entender la capacidad de HCMV para modular las respuestas del sistema inmunológico a su favor y las posibles diferencias entre el aislado clínico y las cepas de laboratorio o de referencia.

III. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar y comparar la actividad inmunomoduladora *in vitro* de un aislado clínico de HCMV con cepas de laboratorio, en una línea celular de monocitos humanos.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar la posible relación entre los genotipos de HCMV con las complicaciones y el desenlace, en pacientes receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos.

- Establecer las condiciones metodológicas para aislar y cosechar HCMV de muestras clínicas.

- Evaluar y comparar *in vitro* la activación y expresión de mediadores inflamatorios en monocitos/macrófagos infectados con un aislado clínico y dos cepas de laboratorio de HCMV.

IV. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para alcanzar cada uno de los objetivos planteados, se desarrollaron tres estrategias experimentales diferentes.

Para el primer objetivo específico: Evaluar la posible relación entre los genotipos de HCMV con las complicaciones y el desenlace, en pacientes receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos, se obtuvieron entre abril y diciembre de 2016 muestras de saliva de pacientes RTPH de la Unidad de Trasplante de la Fundación

Hospital Pediátrico la Misericordia (UT-HOMI), previa aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional (Act No. 15 of 2015), y firma de consentimiento y el asentimiento informado de los pacientes y sus acudientes.

Las muestras de saliva estimulada se obtuvieron una vez por semana durante el periodo de hospitalización de los pacientes. Luego, se extrajo el ADN de las muestras y posteriormente se llevó a cabo una PCR cualitativa para detectar el gen UL83 del HCMV. Las muestras positivas para el virus se procesaron de nuevo por una PCR anidada, para obtener inicialmente un producto de 751 pb, el cual fue re-amplificado en una segunda ronda, donde se utilizaron *primers* específicos para cada de uno de los 5 principales genotipos de HCMV. Adicionalmente, los productos de la segunda ronda de amplificación fueron sometidos a un procedimiento estándar de secuenciación con el equipo ABI 3730XL (Macrogen Company, Seoul, Korea). El análisis de similitud de secuencias de ADN se realizó mediante BLAST en la base de datos de NCBI, luego un alineamiento con el software MEGA X usando Clustal W, utilizando secuencias representativas de los genotipos y se construyó un árbol filogenético, comparando las muestras de saliva positivas con las secuencias reportadas, que incluían las cepas de laboratorio más frecuentemente utilizadas como Merlin y Towne.

Adicionalmente se recolectó información de las historias clínicas sistematizadas como datos sociodemográficos, clínica y el HLA de los donantes y receptores, según el caso y se utilizó el software STATA 13.0 (College Station, Texas, USA) para un análisis univariado y bivariado de las características clínicas y la relación entre la detección de HCMV en saliva, el genotipo, el HLA y las complicaciones que el paciente desarrolló durante el periodo de hospitalización. La prueba exacta de Fisher y la prueba de correlación de Spearman se aplicaron para establecer las diferencias entre las variables y se obtuvo el valor de *p*.

Para el desarrollo del segundo objetivo específico: Establecer las condiciones metodológicas para aislar y cosechar HCMV de muestras clínicas, se consideró necesario establecer un protocolo para el aislamiento de este virus, ya que se ha reportado con frecuencia la variabilidad genética de las cepas de laboratorio de HCMV respecto a los aislados clínicos, principalmente en genes con funciones en el tropismo y también en la evasión inmunológica.

Teniendo en cuenta los resultados del primer objetivo, que en 29 de las 105 muestras de saliva se había detectado HCMV, se decidió partir de estas muestras de saliva para lograr el aislamiento. Posteriormente se emplearon otros fluidos corporales en donde también se producen las descargas virales asintomáticas como orina, sangre o en el lavado broncoalveolar (LBA) durante la infección/reactivación de HCMV. Se tomaron muestras de estos fluidos de pacientes de la Fundación Hospital Pediátrico la Misericordia (HOMI), previa aprobación del Comité de Ética, y firma del consentimiento y el asentimiento informado y firmado de los pacientes y sus acudientes.

Inicialmente se recolectaron 105 muestras de saliva de 20 pacientes y en una segunda fase, se incluyeron 61 niños, recolectando seis muestras de orina, 27 de LBA y 37 plasmas.

Todas las muestras se diluyeron en PBS, se inocularon sobre células MRC-5 y centrifugaron (Shell-vial); se observaron diariamente hasta detectar efecto citopático

(ECP), momento en el cual se recolectó el sobrenadante y se confirmó la presencia de HCMV por PCR. Se observó ECP en 61 muestras de saliva y 29 de estas fueron positivas para el virus, y con estas muestras se continuó con el aislamiento viral. De la segunda fase de muestras, se encontró que siete de estas fueron positivas para el virus y con estas se inició el aislamiento.

Para esto, el sobrenadante (previamente obtenido) fue inoculado en células MRC-5 y cuando se observó ECP atribuible a HCMV, las células fueron desprendidas mecánicamente, y se recolectó el sobrenadante junto con el lisado celular, se sometió a sonicación y se almacenó a -80°C.
Según el análisis molecular se encontró que las muestras de saliva presentaron virus adventicios o contaminantes como Herpes Simplex-1 (VHS-1). Algo similar se encontró con las muestras tomadas en la segunda fase, sin embargo, solo una muestra de LBA indujo ECP compatible con el descrito para HCMV la cual fue positiva para el virus por PCR y negativa por esta misma prueba para virus contaminantes como VHS-1 y 2, Adenovirus, Pan Enterovirus y Poliomavirus BK y JC (BKV). Este aislamiento de HCMV denominado B52, fue compatible con el genotipo gB1, fue pasajeado dos veces en células MRC-5 y alcanzó un título de 2,18 $x10^6$ UFP/mL. En cuanto al empleo del plasma, se observó que las células inoculadas con los plasmas presentaron daño celular temprano que impidió continuar con el aislamiento.
De los resultados fue evidente que la saliva es una muestra compleja y que por la presencia de virus adventicios el aislamiento no fue posible; por el contrario, el LBA permitió el aislamiento viral, descartando la presencia de virus contaminantes y con títulos adecuados para estudios *in vitro*.
Finalmente, para el desarrollo del tercer objetivo específico: Evaluar y comparar *in vitro* la activación y expresión de mediadores inflamatorios en monocitos/macrófagos infectados con un aislado clínico y dos cepas de laboratorio de HCMV, se tomó el aislado clínico B52 y utilizando un modelo de latencia – reactivación en células THP-1, se evaluó la actividad inmunomoduladora de B52, comparándola con la inducida por dos cepas de laboratorio de HCMV frecuentemente utilizadas: la cepa Merlin con bajo número de pasajes en cultivo celular y la cepa Towne con alto número de pasajes. El modelo contempla el tratamiento con un inductor de la activación y diferenciación celular, el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y se evaluó el efecto de la infección y del tratamiento con PMA en tres periodos de tiempo, 48, 72 y 120 horas posinfección (hpi.).

La inoculación a una MOI de 1 se hizo en suspensión, 1 x 10^5 células THP-1 se sembraron en cajas de 12 pozos que se sometieron a centrifugación lenta (Shell-vial). A las 24 hpi, se aplicó el tratamiento con PMA en una concentración de 200 ng/mL y durante 48 horas. Al final de cada periodo de tiempo, se recolectó el sobrenadante y las células fueron tratadas con tripsina y EDTA para iniciar el desprendimiento celular que finalizó con el rastrillo.
Se evaluó la expresión de marcadores de diferenciación CD14, CD64, CD11b, CD68 y activación celular CD206 y HLA-DR. Por RT-qPCR la expresión relativa de los transcritos para las citocinas asociadas a la activación, diferenciación y movilización de monocitos/macrófagos como IFNα e IFNβ; TNFα, IL-1β, CXCL-10,

IL-8 e IL-10. Finalmente, en el sobrenadante se cuantificó la concentración de algunos de estos y otros mediadores como IFNγ, IL-6, CCL-18, IL-12p70, CXCL-9, IL-4, RANTES, MCP-1, CCL-22, MIP-1β, FAS-L y los factores de crecimiento VEGF-A, PDGF-AB.

Se observó un efecto diferencial y temprano del aislado B52, respecto a la infección con las cepas de referencia Merlin y Towne, siendo notoria la regulación a la baja del IFN beta y la sobregulación de la IL-10. El efecto del aislado clínico B52 sobre la expresión de CD206 y HLA-DR fue dependiente de la estimulación con PMA y se incrementó con el tiempo. Este efecto fue diferente del observado en la infección con la cepa de laboratorio Merlin. El aislado B52 tiene un efecto proinflamatorio e inmunomodulador; con regulación diferencial y temprana de mediadores, no dependiente del tratamiento con PMA ni de la replicación viral. El efecto de las cepas Merlin y Towne es tardío.

El aislado B52 infectó las células THP-1 y se replicó con una eficiencia aparentemente menor a la observada para las cepas Towne y Merlin; aparentemente el efecto inmunomodulador no depende de esa capacidad replicativa, pero debe tenerse en cuenta que el comportamiento normal del virus in vivo es que las partículas virales permanecen asociadas a las células luego de la replicación viral.

La infección de células monocíticas por el aislado clínico B52 ejerce efectos que contribuyen en la activación y diferenciación a macrófagos, promoviendo la replicación en estas células e inhibiendo la respuesta antiviral. La infección con HCMV induce diferenciación de las células THP-1 a un fenotipo de macrófago M1 y con una leve tendencia hacia un fenotipo M2.

Fueron evidentes las diferencias en el efecto proinflamatorio e inmunoregulador entre el aislado B52 y las cepas de laboratorio Merlin y Towne de HCMV, que deben tenerse en cuenta en la evaluación experimental de la actividad inmunomoduladora de este virus.

A continuación, se presentan en formato articulo los resultados obtenidos en el desarrollo de cada uno de objetivos específicos planteados, en su orden.

V. RESULTADOS

5.1. LA SALIVA COMO UN MEDIO PARA DETECTAR Y GENOTIPIFICAR CITOMEGALOVIRUS

5.1.1. INTRODUCCIÓN

Citomegalovirus humano (HCMV) es el patógeno viral más importante en los receptores de trasplantes, en los que puede causar complicaciones como la neumonía, gastroenteritis y llevar al fracaso del trasplante, entre otras complicaciones.

Este virus puede reconocer y unirse a una amplia variedad de receptores celulares, utilizando las glicoproteínas de envoltura viral. Interesantemente se han descrito

polimorfismos en genes que codifican para estas glicoproteínas de la envoltura como gB, los cuales han llevado a la identificación de genotipos, reconociéndose actualmente 5 principales denominados gB1 hasta gB5.

En algunos grupos de pacientes se ha establecido una relación entre el o los genotipos infectantes con el desarrollo de complicaciones, el fallecimiento y la viremia.
La determinación del genotipo se realiza por distintas técnicas como PCR en tiempo real, anidada, Digestión y Análisis de Restricción de Fragmentos, análisis filogenético de máxima verosimilitud y secuenciación, entre otros.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la posible relación entre los genotipos de HCMV con las complicaciones y el desenlace, en pacientes receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos.

5.1.2. METODOLOGÍA

- **Pacientes y colección de muestras de saliva**:

Se reclutaron pacientes de la Unidad de Trasplante de Precursores Hematopoyéticos del HOMI (UT-HOMI), entre abril y diciembre de 2016. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología (Universidad Nacional de Colombia-Bogotá, Acta No. 15 de 2015) y fue clasificado de riesgo menor del mínimo según las normas nacionales. (1)
Luego de una explicación del estudio, los pacientes y familiares que ingresaron a la UT-HOMI aceptaron participar y firmaron los formatos de asentimiento y consentimiento informado. A partir de las historias clínicas de cada paciente, se obtuvo la información sobre diagnóstico, tipo de trasplante, HLA del donante y del receptor (cuando se disponía de ellos), complicaciones y desenlace, entre otros.
Las muestras de saliva se colectaron semanalmente durante la hospitalización y luego de 30 seg de estimulación al masticar cera base de uso odontológico. Se depositaron aproximadamente 2 mL de saliva en tubos estériles de 15 mL que contenían 450 µL de medio DMEM (*Dubelcco´s Modified Eagle Medium Sigma D1152*) suplementado con 100 UI/mL de penicilina y se refrigeraron hasta su transporte al laboratorio. A continuación, se añadió un volumen similar de PBS y se centrifugó durante 10 min a 4 °C (4000 × g), y el sobrenadante se recolectó y almacenó a -80 °C hasta su uso.

- **Extracción de ADN:**

Se tomó una alícuota de 50 µL de muestra y se mezcló con 150 µL de resina Chelex 100® (Sigma-Aldrich C7901) preparada al 20% en Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 0,1 mM y azida sódica 0,1%. A continuación, la solución se agitó por 10 seg, se incubó a 56 °C por 20 min., seguida de una segunda incubación a 100 °C por 10 min. La suspensión se dejó enfriar y la resina se sedimentó para recolectar la fase acuosa (eluído), la cual se utilizó para la amplificación del ADN, siguiendo las instrucciones del fabricante.

- **Detección y genotipificación de HCMV:**

El ADN viral se detectó mediante amplificación por PCR utilizando los *primers* 5′-GTCAGCGTTCGTTCCCA-3′ y 5′-GGGACACAACCGTAAAGC-3′, que amplifican un fragmento de 283 pb del gen de la proteína estructural UL83. (2)
El programa de amplificación fue el siguiente: 94 °C - 2 min., 35 ciclos de 94 °C por 30 seg,, 60 °C por 1 min., 72 °C por 30 seg., seguidos de una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio. Como control positivo se utilizó ADN de la cepa Towne de HCMV cosechado de la línea celular MRC-5 (donada por la Dra. Beatriz Parra del Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle, Colombia).
Para iniciar la genotipificación de HCMV en muestras de saliva, se adaptó el protocolo de PCR múltiplex anidada previamente descrito por Tarragó y cols. (3), basado en la amplificación del gen UL55. Los *primers* utilizados y los productos esperados se enumeran en la Tabla 5.1.1.
Tabla 5.1.1. PCR anidada, *primers* y productos esperados.

Primera ronda				
PCR	**Polaridad**	**Posición (Nucleótidos)**	**Secuencia 5´ a 3´**	**Producto en pb**
CMVQ1+	HS5GLYBG+	868-885	TTTGGAGAAAACGCCGAC	
CMVQ1-	HS5GLYBG-	1619-1597	CGCGCGGCAATCGGTTTGTTGTA	751
Segunda Ronda				
PCR	**Polaridad**	**Posición (Nucleótidos)**	**Secuencia 5´ a 3´**	**pb**
CMVGT1+	HS5GLYBG+	1111-1130	ATGACCGCCACTTTCTTATC	420
CMVGT2+	HEHCMVGB+	1074- 1096	TTCCGACTTTGGAAGACCCAACG	613
CMVGT3+	HS5GLYBM+	1341–1359	TAGCTCCGGTGTGAACTCC	190
CMVGT4+	HS5GLYBD+	1057–1082	ACCATTCGTTCCGAAGCCGAGGAGTCA	465
CMVGT5+	AF043721+	307–325	TACCCTATCGCTGGAGAAC	139
CMVQ2-	HS5GLYBG-	1531–1513	GTTGATCCACRCACCAGGC	

Para la primera ronda, se tomaron 100 µg/µL de ADN utilizando el siguiente programa de amplificación por PCR: 94 °C- 2 min., 35 ciclos de 94 °C - 30 seg., 60 °C -1 min., 72 °C - 30 seg. y 72 °C -5 min. Para la segunda ronda, se utilizaron 2 µl del producto de la primera ronda y se utilizó el mismo programa de amplificación.

Para la genotipificación, los productos de amplificación de la segunda ronda se sometieron a secuenciación estándar utilizando el secuenciador ABI 3730XL (Macrogen Company, Seoul, Corea). El análisis de similitud de secuencias de ADN se realizó mediante BLAST en la base de datos NCBI. Para determinar y verificar los genotipos de HCMV en las muestras de saliva, se realizó una alineación múltiple de secuencias en MEGA X, (4) utilizando el software Clustal W y las secuencias de nucleótidos representativas de los genotipos gB del HCMV. Los códigos de acceso para cada genotipo que se empleó son los siguientes: Towne (M22343), C327A (M60929), Merlin (NC 006273.2) para gB1; AD169 (X04606), C336A (M60931) para gB2; C076A (M85228), Toledo-p7 (MF783090) para gB3, finalmente para C128A (M60924) y C194A (M60926) para gB4.(5)
Se construyó un árbol filogenético Neighbor-Joining (6) utilizando distancias evolutivas calculadas mediante el método de probabilidad compuesta máxima. (7)

Este análisis involucró 12 secuencias nucleotídicas y se encontraron 476 posiciones en el conjunto final de datos, eliminando todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares).

- **Análisis uni y bivariado:**

Se empleó un método descriptivo para evaluar las características generales de todos los individuos que participaron en el estudio, incluyendo variables demográficas, la positividad para HCMV, el genotipo viral, el genotipo de HLA y aspectos clínicos de la evolución de cada paciente. El software empleado para el análisis estadístico fue STATA 13.0 (College Station, Texas, USA). Se hicieron análisis uni y bivariados de las características demográficas y clínicas y de la relación entre la presencia de HCMV en saliva, el genotipo viral, el HLA y las complicaciones que el paciente desarrolló durante su estancia hospitalaria y el desenlace. Se utilizó la prueba exacta de Fisher y la prueba de correlación de Spearman para establecer las diferencias entre las variables, finalmente se obtuvo el valor de *p* para cada análisis.

5.1.3. RESULTADOS

- **Características Sociodemográficas, diagnósticos, tipo de trasplante y complicaciones.**

Se incluyeron 20 RTPH pediátricos, el 60% fueron niños (12) con una edad media de 10,3 años (rango 4-16). Los diagnósticos previos al trasplante más frecuentes fueron Leucemia Linfoide Aguda (LLA) en ocho pacientes (40%), seguida de anemia aplásica congénita o adquirida (AAC), linfoma de Hodgkin (LH) y anemia de Fanconi (AF) (dos pacientes cada una). Además, se incluyó a un paciente con un diagnóstico inicial de anemia de Fanconi que desarrolló Leucemia Mieloide Aguda (LMA), un paciente con anemia de células falciformes, un paciente con enfermedad granulomatosa crónica y un paciente con linfohistiocitosis hemofagocítica.
Ocho pacientes (40%) recibieron un trasplante alogénico de sangre de cordón umbilical (TCU), siete (35%) un trasplante de donante idéntico emparentado (DIE) y dos (10%) trasplante autólogo. De los tres pacientes restantes, uno recibió un trasplante singénico, otro un trasplante alogénico haplo-cordón, y el tercero recibió inicialmente TCU y luego un trasplante de DIE.
En la Tabla 5.1.2. se enlistan las complicaciones reportadas en las historias clínicas de los pacientes. Diecinueve pacientes (95%) presentaron alguna complicación; cuatro pacientes tuvieron una complicación, seis pacientes desarrollaron dos y nueve pacientes presentaron de tres a seis complicaciones.

Tabla 5.1.2. Complicaciones reportadas en las historias clínicas de los 20 pacientes RTPH incluidos en este estudio.

Complicación	n (%)
Neutropenia febril	17 (85)
EICH piel	5 (25)
Cistitis hemorrágica	5 (25)
Neumonía	3 (15)
Mucositis Oral	2 (10)
Bacteriemia	2 (10)
Sepsis	2 (10)
Sinusitis	2 (10)
EICH gastrointestinal	1 (5)
Mucositis gastrointestinal	1 (5)
Infección fúngica no especificada	1 (5)
Ictericia	1 (5)
Hipertensión	1 (5)
Falla primaria de injerto	1 (5)
Falla multiorgánica	1 (5)
Colitis amebiana	1 (5)
Síndrome convulsivo	1 (5)
Recaída de Leucemia	1 (5)
Aspergilosis pulmonar	1 (5)
Tuberculosis pulmonar	1 (5)
Choque séptico	1 (5)

En la tabla 5.1.2. aparecen las complicaciones reportadas en el conjunto de pacientes incluidos en el estudio, con el número y porcentaje de pacientes en el que estas complicaciones se diagnosticaron.

De estas, la más frecuente fue la neutropenia febril (17 niños, 85%). De los tres pacientes en los que no se reportaron complicaciones, uno recibió un trasplante autólogo y los otros dos un trasplante alogénico. La EICH cutánea y la cistitis hemorrágica se presentaron en cinco pacientes (25%), cada una. Se diagnosticó neumonía en el 15% (3 pacientes), dos de ellos con neumonía multilobar. Un paciente falleció durante la hospitalización.

- **Genotipos de HLA:**

En cuanto al HLA, debe anotarse que se logró recopilar la información de 16 pacientes; dos pacientes recibieron trasplante autólogo y uno recibió trasplante singénico, casos en los cuales no se requiere el estudio pre-trasplante de HLA. De un paciente no fue posible obtener la información.
Las combinaciones alélicas que se repitieron aparecen resaltadas; el alelo DQ03 fue el más reportado, con una frecuencia de 11 en 50% de los casos (8 pacientes, Tabla 5.1.3.). seguido de los alelos A24 y B35 identificados en el 43.8% (7 pacientes) cada alelo.
No se estableció ninguna relación significativa entre la positividad para HCMV en saliva, el genotipo gB1 y los alelos del HLA. Tampoco se encontraron asociaciones en los tres pacientes con el alelo B44 y que fueron negativos por PCR.

Tabla 5.1.3. Combinaciones alélicas para los 16 pacientes de los cuales se obtuvo el HLA; las combinaciones alélicas que se repitieron se encuentran resaltadas. Los pacientes 12,16,18 y 20 no fueron incluidos.

Paciente	Alelos										Positividad para HCMV
	A1	A2	B1	B2	C1	C2	DR1	DR2	DQ1	DQ2	
1	A02	A30	B07	B42	Cw17	Cw7	DR12	DR15	DQ05	DQ06	+
2	A11	A24	B44	B46			DR01	DR04	DQ09	DQ08	-
3	A24	A03	B35	B51	Cw1	Cw1	DR4	DR09	DQ03	DQ03	-
4	A11	A24	B35	B44	Cw4	Cw1	DR1	DR13	DQ05	DQ06	-
5	A02	A03	B40	B35	Cw3	Cw4	DR4	DR14	DQ03	DQ03	+
6	A32	A24	B14	B35	Cw4	Cw8	DR1	DR11	DQ05	DQ03	+
7	A31	A68	B15	B35			DR04	DR08			+
8	A29	A33	B07	B44	Cw7	Cw15	DR01	DR10	DQ05	DQ05	-
9	A29	A01	B45	B57	Cw6	Cw7	DR13	DR15	DQ06	DQ06	+
10	A03	A24	B51	B35	Cw1	Cw4	DR11	DR16	DQ03	DQ03	-
11	A30	A24	B13	B18	Cw6	Cw12	DR07	DR11	DQ02	DQ03	+
13	A30	A30	B13	B13	Cw6	Cw6	DR07	DR11	DQ02	DQ03	+
14	A32	A03	B07	B07	Cw7	Cw7	DR15	DR14	DQ06	DQ05	+
15	A01	A02	B08	B50	Cw7	Cw6	DR03	DR04	DQ02	DQ04	-
17	A26	A66	B14	B58	Cw8	Cw6	DR07	DR13	DQ02	DQ03	+
19	A02	A24	B07	B35	Cw1	Cw7	DR04	DR13	DQ03	DQ06	+

En la tabla 5.1.3. aparecen los alelos del HLA que más frecuentemente se identificaron en los 16 pacientes, a la izquierda se encuentra el número con el que se identificó a cada paciente en el estudio.

- **Detección de HCMV por PCR cualitativa:**

Se encontró el ADN de HCMV en por lo menos una muestra de saliva de 12 pacientes (60%) y se recolectaron en total 105 muestras de las cuales 29 fueron positivas (29.6%) para el virus. (Tabla 5.1.4.) El promedio de muestras de saliva por paciente fue de 5, con algunas particularidades; por ejemplo, del paciente seis se tomaron nueve muestras y en todas ellas se detectó el virus; en los pacientes 5 y 13 se tomaron ocho muestras de saliva, en el paciente 5 únicamente la muestra 1 fue positiva y en el paciente 13 las dos primeras lo fueron. En algunos casos, como en el paciente 2, el bajo número de muestras se explicó por la condición general del paciente.

Tabla 5.1.4. Detección y genotipo de HCMV en las muestras de saliva.

Paciente	Número de muestras/ muestras positivas	Genotipo
1	5/0	-
2	2/0	-
3	4/0	-
4	6/0	-
5	8/1	gB1
6	9/9	gB1
7	6/4	gB1
8	4/0	-
9	5/3	gB1
10	4/0	-
11	6/3	gB1
12	5/0	-
13	8/2	gB1
14	7/1	gB1
15	5/0	-
16	6/1	gB1
17	6/2	gB1
18	2/1	gB1
19	4/1	gB1
20	3/1	gB1

Tabla 5.1.4. En la columna de la izquierda se encuentran los pacientes en el orden en que ingresaron al estudio. En la columna central aparece el número de muestras de saliva que se recolectó de cada paciente, junto con el número de esas muestras que fue positivo por PCR para HCMV y en la columna de la derecha está el genotipo que se identificó en cada caso positivo.

- **Genotipos de HCMV identificados:**

Utilizando la secuenciación estándar, seguida de análisis de similitud de secuencias y alineación múltiple, se identificó el genotipo de HCMV en las muestras de saliva de los 12 pacientes positivos por PCR; encontrando únicamente el genotipo gB1 en todos los pacientes positivos (Tabla 5.1.4).

Figura 5.1.1. Árbol filogenético para el fragmento del gen UL55 de muestras positivas y representativas de cada paciente.

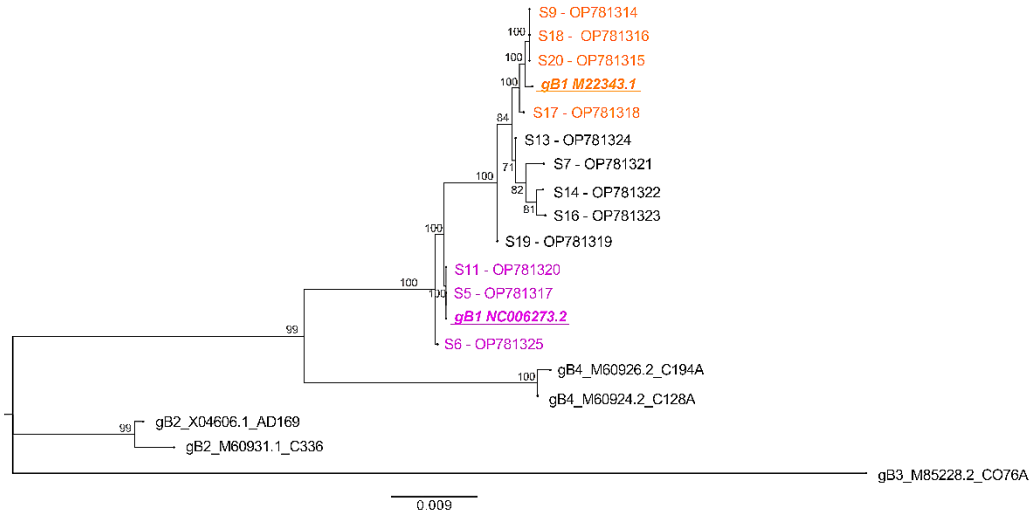


Figura 5.1.1. Están subrayadas las secuencias de referencia de las cepas Merlin (púrpura) y Towne (anaranjado) y la relación de las muestras de saliva identificadas con la letra S y el número del paciente. Se observa barra en nucleótidos.

Al analizar el fragmento del gen UL55 de HCMV, se encontró que todas las muestras estuvieron principalmente relacionadas con gB1; pero al comparar las secuencias de referencia reportadas para cepas de laboratorio, se observó que algunas de las muestras, por ejemplo, las muestras de los pacientes 5, 6 y 11 estuvieron más relacionadas a la cepa Merlin, mientras que las muestras de los pacientes 9, 17, 18 y 20 estuvieron relacionadas con la cepa Towne (Figura 5.1.1). Las secuencias fueron depositadas en la base de datos de GenBank del *National Institute of Health*, con los números de acceso OP781314 – OP781325.

- **Análisis uni- y bivariado:**

En los pacientes positivos para HCMV no se encontró asociación entre el genotipo y el sexo (p=0.16), edad (p=0.36) o el número de complicaciones (p=0.87). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre pacientes con al menos una muestra de saliva positiva para HCMV y 3 o más complicaciones (7 pacientes) p=0.6, ni al ser diagnosticados con neutropenia febril (p=0.242).
El paciente que tuvo falla primaria del injerto fue positivo para HCMV en saliva, presentó otras complicaciones y falleció; en los otros dos casos fatales durante la hospitalización, solo uno de ellos tuvo una muestra positiva por PCR sin ninguna asociación estadísticamente significativa.

5.1.4. DISCUSIÓN

- **Uso de la saliva como muestra de interés para la detección y genotipificación de HCMV en pacientes pediátricos receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos.**

Este es el primer estudio sobre la detección y genotipificación de HCMV en saliva en una cohorte pediátrica de RTPH, en Colombia. Como se sabe, la saliva es una secreción exocrina con funciones muy importantes en la cavidad oral, siendo también un excelente vehículo para la transmisión de HCMV la cual puede ocurrir por la dispersión de gotas y aerosoles en individuos asintomáticos. Este fluido es fácil de recolectar, con un riesgo mínimo tanto para el operador como para el paciente durante la toma; se puede trasportar de forma fácil y segura y todo este proceso no requiere de personal con entrenamiento especializado, lo que reduce los costos, respecto a la toma y procesamiento de muestras de sangre. (8)
Es por estas razones, por lo que la saliva se emplea con frecuencia para diagnosticar y monitorear virus de la familia *Herpesviridae* en pacientes receptores de trasplante, ya que estos virus son una de las principales causas de complicaciones en estos pacientes. (9,10,11)

En este trabajo, 29 de 105 (27.6%) muestras de saliva recolectadas fueron positivas para HCMV; encontrando en algunos pacientes solo una muestra positiva y en otros casos, algunas o todas las muestras positivas para el virus. De manera interesante, en todos los pacientes positivos, las descargas virales en saliva fueron asintomáticas (sin lesiones evidentes de etiología viral en la mucosa oral), y los dos pacientes diagnosticados con mucositis oral fueron negativos para HCMV en saliva.

Esta intermitencia en la detección del HCMV en saliva puede explicarse por el estado de la respuesta inmune del paciente, y por la administración de antivirales como ganciclovir, como lo sugiere Sarmento y cols. (9) al detectar el virus en saliva de cuatro de 20 pacientes receptores de trasplante renal. Adicionalmente, por la replicación viral que ocurre de forma independiente en los distintos compartimientos anatómicos, es posible detectar el virus en un fluido como la saliva, mientras que muestras como la sangre pueden ser negativas, en el mismo momento de la toma de muestra de saliva. Esto fue demostrado previamente por Correa-Sierra y cols. (10) quienes detectaron descargas virales asintomáticas en 27 pacientes pediátricos receptores de trasplante de órgano sólido, que fueron evaluados durante 32 semanas postrasplante. En estos pacientes se encontró que el 70.4% de estos fueron positivos para HCMV en la saliva, mientras que el virus solamente se detectó en 10 de las 27 muestras de sangre evaluadas. Por lo tanto, este estudio y otros han mostrado que el comportamiento de las descargas virales en la saliva de RTPH es variable, dinámica y puede depender del estado de supresión inmunológica, de la reconstitución de la médula ósea hematopoyética y por supuesto de la administración de terapia antiviral. (11,12)

Por otro lado, este trabajo mostró la posibilidad de genotipificar el HCMV evaluando la secuencia del gen UL55 que codifica para la glicoproteína gB, la cual es importante para la fusión y entrada de HCMV a las células infectadas, e influencia el tropismo viral por su interacción con distintos receptores celulares. (13,14,15)
En nuestro caso, la genotipificación se hizo de muestras directas de saliva, encontrando el genotipo gB1 en los 12 pacientes que fueron positivos para el virus por PCR. El gB1 es el genotipo más frecuentemente reportado en estudios de diversas regiones del mundo, sin embargo, en algunos de estos trabajos en pacientes RTPH se han identificado otros genotipos como gB2, gB3 y gB4, destacando coinfecciones o infecciones mixtas. (16,17,18)
La confirmación del genotipo por secuenciación permitió obtener datos más robustos, debido a que la detección del genotipo por tamaño del producto de amplificación puede ser imprecisa ya que algunos de estos productos son similares. Adicionalmente, hoy en día el coste de la secuenciación ha disminuido haciendo esta técnica más accesible, por lo que se recomienda utilizar ambos métodos.

La secuenciación de ADN es una técnica complementaria para la genotipificación de HCMV que se basa en el sitio de clivaje de gB (gBSCl), distinto para cada genotipo (gBSCl 1 a 4); y se sugiere su aplicación ya que la glicoproteína gB presenta alta variabilidad en los extremos N-terminal (gBN 1 to 4) y C-terminal (gBC 1 to 2), que son a su vez altamente conservadas en cada genotipo. Aunque los genotipos más comunes de HCMV son gB1, seguido por gB2, gB3 y gB4, hay evidencia de recombinación homóloga entre los gBSCls. De hecho, se han reportado distintas secuencias gBN pero no asignadas a un sistema de numeración de genotipos (5); en estos casos el empleo de métodos convencionales como la PCR múltiplex o el análisis de polimorfismos por restricción de fragmentos, pueden pasar por alto alguna de estas variantes, por lo que la secuenciación es altamente recomendada.

- **Características clínicas de los pacientes RTPH:**

La LLA fue el diagnóstico pre-trasplante más frecuente en nuestra cohorte, coincidiendo con lo reportado por el Instituto Nacional de Cancerología de Colombia, datos según los cuales esta condición neoplásica es la que más afecta a la población infantil en nuestro país. (19)
El segundo diagnóstico previo al trasplante fue la anemia aplásica (congénita o adquirida), luego el Linfoma Hodgkin y sólo un caso de LMA, al contrario de lo publicado por la Sociedad Europea de Trasplante de Sangre y Médula Ósea (EBMT), en la que un tercio de los casos de trasplante fueron en pacientes con LMA. (20) En este grupo también se encontraron pacientes con enfermedades no neoplásicas además de la anemia aplásica, como la enfermedad granulomatosa crónica y la linfohistiocitosis hemofagocítica, patologías en las que se recomienda Trasplante de Precursores Hematopoyéticos (TPH), por entidades como la EBMT. (21,22)

En esta cohorte, se registró neutropenia febril en 17 pacientes (85%), que es una de las complicaciones más frecuentes en los pacientes que reciben tratamiento

mieloablativo. La terapia antimicrobiana empírica se inicia precozmente en los pacientes, asumiendo que el agente causal es bacteriano o fúngico. Sin embargo, en algunos casos no es posible determinar estos agentes y puede sospecharse una etiología viral, pero el HCMV no se notifica con frecuencia. (23,24,25)

La segunda complicación más frecuente fue la EICH (n = 5). El riesgo de infección o reactivación del HCMV tras el trasplante aumenta con la inmunosupresión asociada a la prevención y/o el tratamiento de la EICH. El uso de corticosteroides también afecta a la reconstitución inmunitaria y contribuye a aumentar el riesgo de reactivación. Las relaciones entre el HCMV y la EICH son bidireccionales, ya que la inmunosupresión y la consiguiente posibilidad de reactivación y diseminación viral también contribuyen al desarrollo de la EICH y de otras complicaciones graves asociadas al HCMV, como neumonía, gastroenteritis e incluso fracaso del trasplante o recaída de la leucemia. (25,26)

La infección o reactivación por HCMV se asocia con frecuencia a morbilidad y mortalidad en pacientes sometidos a TPH, aunque los métodos más sensibles de detección y el tratamiento temprano han mejorado significativamente el pronóstico de los pacientes. La detección de viremia se asocia a la terapia con ganciclovir o valganciclovir, aunque estos antivirales producen o agravan la mielosupresión, posiblemente contribuyendo a la aparición de complicaciones infecciosas. (27,28,29)

Dado que todos los pacientes con HCMV tenían el genotipo gB1, no fue posible establecer asociaciones con los resultados observados. Once de los 12 pacientes que fueron positivos para el virus en saliva presentaron complicaciones relacionadas muy posiblemente con factores como los diagnósticos previos al trasplante y el tipo de trasplante y con la infección/reactivación por HCMV, sin embargo, la búsqueda del genotipo de virus infectante y la posibilidad de coinfecciones puede ayudar a comprender los episodios de infección/reactivación y más importante, el desenlace de los pacientes.

- **El HLA y la detección de HCMV:**

La población colombiana representa una mezcla de cuatro grupos principales de herencia: Mestizos, indígenas, afrocolombianos y romaníes. (30) Por lo tanto, es posible pensar que en nuestro país existe una distribución HLA diferente a la observada en otras regiones. En nuestro estudio, el alelo HLA DQ03 fue el más frecuente en la cohorte estudiada, seguido de los alelos A24 y B35, que estaban presentes en siete individuos (datos disponibles de 16 pacientes). Estos dos últimos alelos son los más frecuentemente reportados en la población colombiana. (31,32,33) La variabilidad observada seguramente corresponde con la variabilidad étnica y la distribución geográfica que se relata para el HLA.

A pesar de ello, no encontramos ninguna asociación entre los alelos, la positividad de HCMV en saliva, o el genotipo gB1, ni entre la composición HLA en cada paciente y las complicaciones o resultados en los pacientes evaluados.

5.1.5. CONCLUSIÓN

En esta cohorte, se demostró la factibilidad de la saliva para establecer la reactivación del HCMV y la genotipificación mediante técnicas muy sensibles como la secuenciación.

También se observó que todos los pacientes que fueron positivos para HCMV fueron gB1 positivos y hasta el presente estudio, no había información sobre los genotipos del virus en Colombia; al parecer este genotipo es predominante, como lo muestran los estudios en grupos de receptores de trasplante en otros países. (16,17,18)

La evaluación de los factores de riesgo de infección/reactivación por HCMV en RTPH pediátricos sigue siendo esencial para prevenir y controlar este evento, que conlleva a la posibilidad de complicaciones graves e incluso la muerte del paciente. (16,17,18) La serología pre-trasplante continúa siendo esencial para establecer el riesgo de infección/reactivación por HCMV en el paciente receptor del trasplante, pero durante la hospitalización, es deseable confirmar si se produce la reactivación, para lo cual se puede utilizar saliva y amplificar y secuenciar un fragmento del ADN viral para confirmar la infección y determinar el genotipo o genotipos virales. (11,34)

Varios estudios han intentado establecer la relación entre genotipos, complicaciones y desenlace en receptores de precursores hematopoyéticos y trasplantes de órgano sólido, con resultados variables. (16,17,18) Aunque el número de pacientes que formaron parte de este trabajo fue pequeño y no permitió inferir esas asociaciones, refuerza la importancia de determinar el (los) genotipo(s) del HCMV.

5.1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/RESOLUCION-8430-DE-1993.PDF
2. Gouarin S., Gault E., Vabret A., Cointe D., et al. Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. J Clin Microbiol. 2002; 40(5):1767-72. doi: 10.1128/JCM.40.5.1767-1772.2002.
3. Tarragó D., Quereda C., Tenorio A. Different cytomegalovirus glycoprotein B genotype distribution in serum and cerebrospinal fluid specimens determined by a novel multiplex nested PCR. J Clin Microbiol. 2003; 41:2872-7. doi: 10.1128/JCM.41.7.2872-2877.2003.
4. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol Evol. 2018; 35:1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
5. Deckers M., Hofmann J., Kreuzer K.A., et al. High genotypic diversity and a novel variant of human cytomegalovirus revealed by combined UL33/UL55 genotyping with broad-range PCR. Virol J. 2009; 6:210. doi: 10.1186/1743-422X-6-210.

6. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987; 4(4):406-25. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
7. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(30):11030-5. doi: 10.1073/pnas.0404206101.
8. Kaczor-Urbanowicz K.E., Martin Carreras-Presas C., Aro K., Tu M., et al. Saliva diagnostics - Current views and directions. Exp Biol Med (Maywood). 2017; 242:459-472. doi: 10.1177/1535370216681550.
9. Sarmento D.J.S., Caliento R., Souza A.O., Tozetto-Mendoza T.R., et al. Salivary shedding of herpesviruses in renal transplant recipients. J Investig Clin Dent. 2018;9:e12356. doi: 10.1111/jicd.12356.
10. Correa Sierra C.B., Kourí Cardellá V., Pérez Santos L., Silverio C.E., et al. Herpesviruses excretion insaliva of pediatric transplant recipients. Transpl Infect Dis. 2017;19(6). doi: 10.1111/tid.12771.
11. Bohórquez SP, Díaz J, Rincón CM, et al. Shedding of HSV-1, HSV-2, CMV, and EBV in the saliva of hematopoietic stem cell transplant recipients at Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia, Bogotá, D.C. Biomedica. 2016; 36(0):201-10. doi: 10.7705/biomedica.v36i0.2985.
12. Correia-Silva JF, Bruna-Romero O, Resende RG, Miranda LP, et al. Saliva as a source of HCMV DNA in allogeneic stem cell transplantation patients. Oral Dis. 2010; 16(2):210-6. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01637.x.
13. Chow SW, Dennison KM. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. J Infect Dis. 1991; 163:1229-34. doi: 10.1093/infdis/163.6.1229.
14. Shepp DH. Match ME, Lipson SM, Pergolizzi RG. A fifth human cytomegalovirus glycoprotein B genotype. Res Virol.1998;149:109-14. doi: 10.1016/s0923-2516(98)80086-1.
15. Meyer-König U., Vogelberg C., Bongarts A., Kampa D., et al. Glycoprotein B correlates with cell tropism in vivo of human cytomegalovirus infection. J Med Virol. 1998; 5:75-81.
16. Correia-Silva J.F., Resende R.G., Arão T.C., Abreu M.H., et al. HCMV gB genotype and its association with cytokine levels in hematopoietic stem cell transplantation. Oral Dis. 2011; 17(5):530-7. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01801.x.
17. Zawilinska B., Szostek S., Kopec J., Piatkowska-Jakubas B., et al. Multiplex real-time PCR to identify a possible reinfection with different strains of human cytomegalovirus in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. Acta Biochim Pol. 2016; 63(1):161-66. doi: 10.18388/abp.2015_1162.
18. Ciotti M., Cella E., Rittà M., Ciccozzi M., et al. Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotype Distribution in Italian Transplant Patients. Intervirology. 2017; 60(4):165-170. doi: 10.1159/000486593.
19. Instituto Nacional de Cancerología. Anuario INC 2016. https://www.cancer.gov.co/recursos_user/files/libros/archivos/Anuario%20INC%202016.

20. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. Bone Marrow Transplant. 2016; 51:786-92. doi: 10.1038/bmt.2016.20.
21. Zaucha-Prażmo A., Sadurska E., Pieczonka A., Goździk J., et al. Risk Factors for Transplant Outcomes in Children and Adolescents with Non-Malignant Diseases Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Ann Transplant. 2019;24:374-382. doi: 10.12659/AOT.915330.
22. Georges G.E., Doney K., Storb R. Severe aplastic anemia: allogeneic bone marrow transplantation as first-line treatment. Blood Adv. 2018;2:2020-2028. doi: 10.1182/bloodadvances.2018021162.
23. Chan S.T., Logan A.C. The clinical impact of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Why the quest of meaningful prophylaxis still matters. Blood rev. 2017;31:173-183. doi: 10.1016/j.blre.2017.01.002.
24. Lehrnbecher T., Robinson P., Fisher B., Alexander S., et al. Guideline for the Management of Fever and Neutropenia in Children With Cancer and Hematopoietic Stem-Cell Transplantation Recipients: 2017 Update. J Clin Oncol. 2017; 35(18):2082-2094. doi: 10.1200/JCO.2016.71.7017.
25. Teranishi H, Ohzono N, Miyata I, et al. Incidence of Viremia With DNA Viruses in Oncology Patients With Febrile Neutropenia. J Pediatr Hematol Oncol. 2018;40:605-608. doi: 10.1097/MPH.0000000000001300.
26. Melendez-Munoz R, Marchalik R, Jerussi T, et al. Cytomegalovirus Infection Incidence and Risk Factors Across Diverse Hematopoietic Cell Transplantation Platforms Using a Standardized Monitoring and Treatment Approach: A Comprehensive Evaluation from a Single Institution. Biol Blood Marrow Transplant. 2019;25:577-586. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.10.011.
27. Ljungman P. Cytomegalovirus infections in transplant patients. Scand J Infect Dis Suppl. 1996; 100:59-63.
28. Rowe R.G, Guo D., Lee M., Margossian S., et al. Cytomegalovirus Infection in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Risk Factors for Primary Infection and Cases of Recurrent and Late Infection at a Single Center. Biol Blood Marrow Transplant. 2016; 22:1275-1283. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.04.004.
29. Ljungman P., de la Camara R., Robin C., Crocchiolo R., et al. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). Lancet Infect Dis. 2019;19:e260-e272. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30107-0.
30. DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Censo general, 2018. https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/grupos-etnicos/informacion-tecnica.

31. Páez-Gutiérrez I.A., Hernández-Mejía D.G., Vanegas D., Camacho-Rodríguez B., Perdomo-Arciniegas A.M. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies of 1463 umbilical cord blood units typed in high resolution from Bogotá, Colombia. Hum Immunol. 2019; 80:425-426. doi: 10.1016/j.humimm.2019.03.006.
32. Arrunategui A.M., Villegas A., Ocampo L.A., Rodríguez L.M., Badih A. Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas del sistema HLA clase I y II en donantes de una población del suroccidente colombiano. Acta Med Colomb. 2013; 38(1):16-21.
33. Hernández-Mejía D.G., Páez-Gutiérrez I.A., Dorsant Ardón V., Camacho Ramírez N., et al. Distributions of the HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, and HLA-DQB1 alleles and haplotype frequencies of 1763 stem cell donors in the Colombian Bone Marrow Registry typed by next-generation sequencing. Front Immunol. 2023; 13:1057657. doi: 10.3389/fimmu.2022.1057657.
34. Barrado L., Prieto C., Hernando S., Folgueira L. Detection of glycoproteins B and H genotypes to predict the development of Cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. J Clin Virol. 2018; 109:50-56. doi: 10.1016/j.jcv.2018.11.001.

5.2. AISLAMIENTO DE CITOMEGALOVIRUS HUMANO A PARTIR DE FLUIDOS CORPORALES

5.2.1. INTRODUCCIÓN

Desde la década de los años 50 del siglo XX, cuando se inició la identificación del virus Citomegalovirus humano (HCMV), causante de la enfermedad por inclusión citomegálica se reconocieron las dificultades que conlleva trabajar con este virus en laboratorio. Desde los trabajos de Margaret Smith se hizo evidente que HCMV es específico de especie y que requiere células humanas para lograr su cultivo. Además, el ciclo replicativo del virus en cultivo es lento, la lisis de las células a causa de la infección o efecto citopático (ECP) aparece luego dos o más semanas desde que se inicia el cultivo, y los títulos virales (cantidad de virus producido) en los primeros pasajes son bajos.

A pesar de esto, se han logrado establecer algunas cepas de laboratorio como Towne y AD169, las cuales son utilizadas rutinariamente para diversos fines. Estas cepas se cosechan en cultivos de fibroblastos humanos en las que HCMV se replica fácilmente, lo que permite la obtención de títulos virales apropiados para el trabajo en laboratorio. Sin embargo, por cada pasaje o manipulación del virus en el cultivo, simultáneamente ocurren modificaciones en el genoma viral que pueden afectar el comportamiento del HCMV en los estudios sobre el tropismo y la influencia en la respuesta inmunológica.

Estos aspectos son claves para entender la dinámica y comportamiento del virus en los individuos tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos, y por las diferencias en las cepas en términos de tropismo, patogenicidad y otros atributos, se hace necesario obtener un aislado viral con pocos pasajes y con títulos adecuados para su uso en modelos de infección.

Esto pudo lograrse mediante el empleo de la centrifugación a baja velocidad al momento de la inoculación (Shell-vial) y posteriormente cuando aparece el efecto citopático, con el desprendimiento mecánico de las células y la sonicación de estas para lograr el rompimiento celular liberando al sobrenadante partículas virales.

Por lo que el objetivo del trabajo fue establecer las condiciones metodológicas para aislar y cosechar HCMV de muestras clínicas.

5.2.2. METODOLOGÍA

Previa aprobación del Comité de Ética en Investigación (Acta No.15 Facultad de Odontología, Universidad Nacional), se inició el aislamiento a partir de las 105 muestras de saliva (S) obtenidas de pacientes RTPH pediátricos (primer objetivo), o muestras de plasma y otros fluidos corporales, como el Lavado broncoalveolar (LBA) y orina (U). Acta del Comité de Ética de la Fundación Hospital Pediátrico la Misericordia CEI 52-18.

En todos los casos, las muestras se depositaron en tubos estériles de 15 mL con 450 µL de medio DMEM (*Dubelcco´s Modified Eagle Medium*) suplementado antibiótico (100U/mL de penicilina + 100ug/mL de streptomicina) y se refrigeraron hasta el laboratorio. A continuación, se añadió un volumen igual de PBS y se centrifugó por 10 min a 4 °C (4000 × g), luego el sobrenadante se recolectó y almacenó a -80 °C hasta su uso.

En laboratorio, las muestras se identificaron según el fluido del que se obtuvieron y el número correspondió al del paciente, a medida que fue incluido en el estudio. Las muestras de saliva con la letra **S**, los LBA se identificaron con la letra **B** y las muestras de orina con la letra **U**. El protocolo de aislamiento fue el siguiente (Figura 5.2.1.):

- **Pasaje cero (P0):**

En cajas de 24 pozos se sembraron $1x10^5$ células por pozo de la línea fibroblástica MRC-5 y se mantuvieron en DMEM suplementado con SFB al 10% en un ambiente enriquecido con dióxido de carbono (CO_2) al 5% y a 37ºC. A las 24 horas, antes de la inoculación las muestras fueron descongeladas y diluidas en PBS (*phosphate buffered saline*); para el caso de las muestras de orina se diluyeron 1:2 y los plasma 1:20, y fueron centrifugadas a 13.000 RPM por un minuto a temperatura ambiente (TA), para eliminar células, restos celulares y moléculas de alto peso molecular.
Luego se retiró el medio de mantenimiento de las células y se adicionaron 330 µL de la suspensión de la muestra por triplicado y se centrifugaron (*Shell-vial*) a 1000 g por 30 min, a 25°C y se incubaron a 37°C por dos horas. Luego, el inóculo se retiró y se añadieron 500 µL de medio DMEM con SFB al 5% y antibiótico/antimicótico 2x (100 U/mL de penicilina + 100 µg/mL de streptomicina + anfotericina).
Las células se observaron bajo microscopio diariamente para determinar la aparición de efecto citopático (ECP), el cual se registró con una, dos o tres cruces según la extensión del daño de la monocapa, pérdida de esta, desprendimiento celular, células redondeadas, formación de sincitios. En las células en las que se registró el ECP, se retiró el medio de cada pozo y se almacenó en tubos 1,5 mL (haciendo un pool de los tres pozos), este medio se centrifugó a 2000 RPM por 5 min y el sobrenadante se congeló a -80°C. En el caso de no detectar ECP, se mantuvo el cultivo hasta por dos semanas, sin cambiar el medio; si luego de ese periodo no se observó ECP, se descartó la caja de pozos y se consideró un aislamiento negativo.

- **Pasaje 1 (P1):**

En botellas de cultivo celular de 25 mL se sembraron células MRC-5 en medio DMEM con SFB al 10%, cuando se alcanzó una confluencia del 80% se retiró el medio y se inocularon con 500 µL del sobrenadante de P0. Las células se agitaron suavemente por una hora, a temperatura ambiente y posteriormente se adicionó medio de cultivo con SFB al 5%, hasta completar 5mL.

Figura 5.2.1. Protocolo de aislamiento de Citomegalovirus humano y obtención de cosechas, a partir de plasma y fluidos corporales: saliva, LBA y orina.

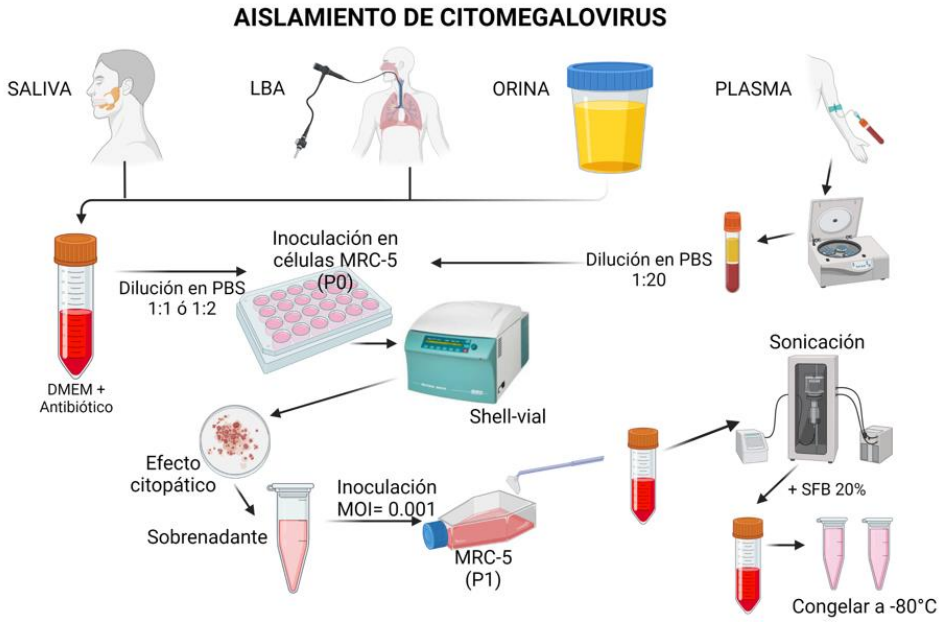


Figura 5.2.1. Para el aislamiento de HCMV se obtuvieron muestras de saliva, lavado broncoalveolar, orina y plasma. Se diluyeron en PBS y se inocularon células MRC-5 que fueron sometidas a Shell-vial (P0). Se recolectaron los sobrenadantes que fueron inoculados en células MRC-5, agitación suave, desprendimiento y recolección de sobrenadantes, sonicación y almacenamiento (p1 y P2).

Las células se incubaron a 37°C y CO_2 al 5% y se hizo observación diaria hasta observar ECP en aproximadamente el 80% de las células, en caso contrario, el cultivo se mantuvo hasta por dos semanas.
Si el ECP fue evidente en el 80 o 100% de las células, se utilizó un rastrillo (*Cell scraper*) para desprender las células y se recolectó la suspensión en un tubo de 50 mL. Esta suspensión se sonicó con un ajuste de potencia de 40% (15-30W) cuatro veces por 30 seg y a 4ºC.
Finalmente se adicionó SFB a una concentración final de 20%, la suspensión se alícuotó en tubos 1.5mL y se congeló a -80°C.
Para su uso, después de descongelar, las alícuotas se centrifugaron por 1 min a 13.000 RPM a TA, para separar los restos celulares y moléculas de alto peso.
A partir de los sobrenadantes de P1 se obtuvieron los pasajes subsecuentes, siguiendo el mismo protocolo.

- **Titulación viral:**

El título de HCMV en estos pasajes se estableció por $TCID_{50}$ (*Tissue Culture Infectious Dose* 50%), en fibroblastos gingivales humanos primarios.
En cajas de 96 pozos se sembraron $2x10^5$ células por pozo en medio DMEM con SFB al 10% y antibiótico/antimicótico 2x. A las 24 horas post siembra se preparó 1mL de las diluciones seriadas del inóculo desde $1x10^{-1}$ a $1x10^{-9}$ en medio DMEM

suplementado con SFB al 2% y antibiótico/antimicótico 2x. Luego se retiró el medio de cultivo de los pozos y se añadió la dilución a seis pozos cada una. Como control negativo se añadió PBS en seis pozos.
A las dos horas se retiró el inóculo y se adicionó medio DMEM con SFB al 2%. Diariamente las células se observaron bajo microscopio, registrando la aparición de ECP por pozo, hasta 120 horas posteriores a la inoculación. Se calculó el título viral en Unidades Formadoras de Placa (UFP) por mL.

- **Cosecha viral (Figura 5.2.1.):**

Para la obtención de cosechas virales con títulos apropiados en pasajes tempranos del aislado clínico se utilizó el método de Britt modificado. (1)

Se sembraron células MRC-5 en frascos de cultivo de 25mL mantenidas en DMEM con SFB al 10% y antibiótico/ antimicótico 2x. Al observar una confluencia del 80%, se retiró el medio y se reemplazó con 1,3mL de medio fresco que contenía aproximadamente de 1 a 5 UFP con la siguiente fórmula:
Volumen del stock viral =0.01(MOI) x Número de células x 1/título viral

Las células se agitaron suavemente por una hora a TA. Se añadió medio hasta completar 5 mL y se incubó a 37°C, observando cada 24 horas hasta detectar la aparición de ECP. Cuando se observó ECP en el 80 a 100% de las células, se desprendieron las células con rastrillo, se recolectó la suspensión en tubo de 50 mL y se sonicó como se describió previamente, se añadió SFB a una concentración final del 20%, se alícuotó en tubos 1,5mL y se congeló a -80°C. Para mantener en cultivo, cosechar y titular las cepas Merlin y la cepa Towne se emplearon los protocolos previamente descritos.

- **Detección por PCR de Citomegalovirus y de virus contaminantes:**

De las muestras (S, B, U) y virus aislados se extrajeron el ADN o ARN utilizando el kit Stratec y por PCR convencional se confirmó o se descartó la presencia de HCMV, y de posibles contaminantes virales como los Virus Herpes Simplex (VHS) 1 y 2, Adenovirus y Pan Enterovirus. En la Tabla 5.2.1. se presentan los protocolos de amplificación que se utilizaron.

- **Genotipificación del aislamiento B52 y de las cosechas de las cepas Merlin y Towne:**

Utilizando la misma metodología para la secuenciación de las muestras de saliva, se realizó una alineación múltiple de secuencias en MEGA X utilizando el software Clustal W y las secuencias de nucleótidos representativas de los genotipos gB del HCMV. (6) Los códigos de acceso para cada genotipo que se empleó son los siguientes: Towne (M22343), C327A (M60929), Merlin (NC 006273.2) para gB1; AD169 (X04606), C336A (M60931) para gB2; C076A (M85228), Toledo-p7 (MF783090) para gB3, finalmente para C128A (M60924) y C194A (M60926) para gB4. (7)

Tabla 5.2.1. Protocolos de amplificación de ADN de HCMV, VHS-1 y 2, Adenovirus y Pan Enterovirus, por PCR convencional.

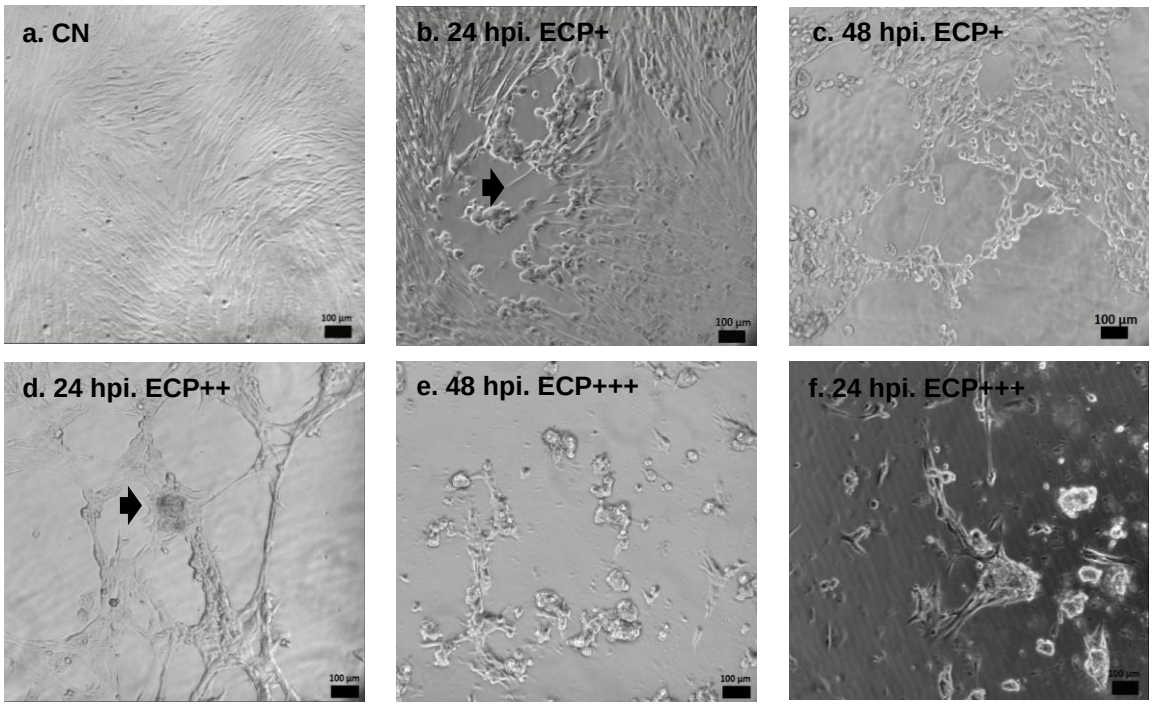
	HCMV	VHS-1 y VHS-2		Adenovirus	Pan Enterovirus
PCR	**Convencional**	**Anidada**		**Convencional**	**Transcripción reversa**
Blanco	**UL83**	**ADN polimerasa viral**		**Exon Gen**	**5´UTR**
Primers	F5'GTCAGCGTTCGT GTTTCCCA-3' R5'GGGACACAACAC CGTAAAGC-3'	Primera Ronda: F5'-GGC CAG CAG ATC CGC GTC TT-3' R5'- GCT GGG GTA CAG GCT GGC AA -3' Segunda Ronda: F5'-CTG CCG GAC ACC CAG GGG CG-3 R 5'-CCC GCC CTC CTC GCG TTC GT-3'		F5´-GCC-ACG-GTG-GGG-TTT-CTA-AAC-TT-3´ R5´-GCC-CCA-GTG-GTC-TTA-CAT-GCA-CAT-C-3´	F5´TACTTTGGGTGT CCGTGTTT3´ R5´TGGCCAATCCA ATAGCTATATG 3´
Protocolo de amplificación	94 °C por 3 minutos; 30 ciclos (94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos)	95 °C por 3 minutos, 25 Ciclos (95 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos)		94 °C por 3 minutos; 30 ciclos (94 °C por 30 segundos, 64 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos)	55°C por 15 minutos, 95°C por 3 minutos; 30 Ciclos (94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos)
Enzima	GoTaq® Flexi (Promega, United States)				Luna® (NEB, England)
Producto de amplificación en pares de bases (pb)	283 pb	129 pb	163 pb	132 pb	152 pb
Referencia	Gouarin y cols. 2002 (2)	Sun y cols. 2003 (3)		Dou y cols. 2018 (4)	Zhang y cols. 2014 (5)

5.2.3. RESULTADOS

De los P0 de las 105 muestras de saliva, se observó ECP en 61, y en 21 de estos se detectó el ADN de HCMV por PCR. En la Figura 5.2.2. se muestra el resultado del aislamiento a partir de muestras de saliva de los pacientes 6, 7, 17 y 20.

Estos 21 aislamientos fueron también procesados por PCR para otros virus, encontrando que siete de estos fueron negativos los virus VHS-1 y 2. A partir del P0 de estos aislamientos se inició el P1 hasta llegar a P3, pasaje en el cual estas muestras fueron positivas para el VHS-1 (Figura 5.2.3.), lo que sugiere que estos alfa herpesvirus estaban presentes en un título muy bajo que se incrementó en los sucesivos pasajes.

Figura 5.2.2. Daños en la morfología celular durante el aislamiento de HCMV (P0), a partir de muestras de saliva.



a: Control negativo (CN). Células MRC-5 tratadas con PBS. A las 48 hpi. se observa integridad de la monocapa y morfología celular compatible con normalidad.

b. Paciente 20. La flecha señala la pérdida de la monocapa y desprendimiento celular, células redondeadas.

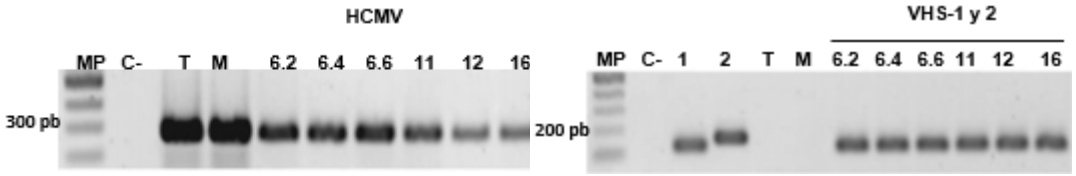
c. Paciente 17. Se observa pérdida de la monocapa en un 50% con desprendimiento celular.

d. Paciente 6. La flecha señala un sincitio, fusión de células infectadas y no infectadas. Se observa pérdida de la monocapa.

e. Paciente 6. Pérdida de la monocapa cercana al 80%. Desprendimiento celular con células redondeadas.

f. Paciente 7. Pérdida cercana al 100% de la monocapa con redondeamiento y desprendimiento celular.

Figura 5.2.3. Resultado PCR convencional para detección de HCMV y VHS-1 y 2 en el pasaje 3 de las muestras de los pacientes 6, 11, 12 y 16.



MP: Marcador de peso, C- Control negativo, T: Towne, M: Merlin. Del paciente 6 aparecen los resultados para las muestras 2, 4 y 6.

Por las infecciones contaminantes con virus tan altamente prevalentes como VHS en las muestras de saliva, se descartó la posibilidad de obtener aislados clínicos de HCMV únicos a partir de estas. Fue por ello por lo que se incluyeron 61 pacientes pediátricos del HOMI, de los que se obtuvieron 27 muestras de LBA, 6 muestras de orina, y 37 de plasma.

Siguiendo el mismo protocolo de aislamiento que se utilizó en saliva, los resultados utilizando LBA, U, P por PCR y por la observación microscópica fueron los siguientes (Tabla 5.2.2).
La inoculación de los plasmas en los fibroblastos -aún en una dilución de 1:20-, produjo una rápida formación de una capa de proteínas coaguladas cubriendo las células, con lesión y desprendimiento de estas, por lo que se descartó la posibilidad de aislamiento a partir de estas muestras.

Tabla 5.2.2. Aislamiento de Citomegalovirus a partir de muestras de Lavado bronco alveolar (LBA) y orina (U).

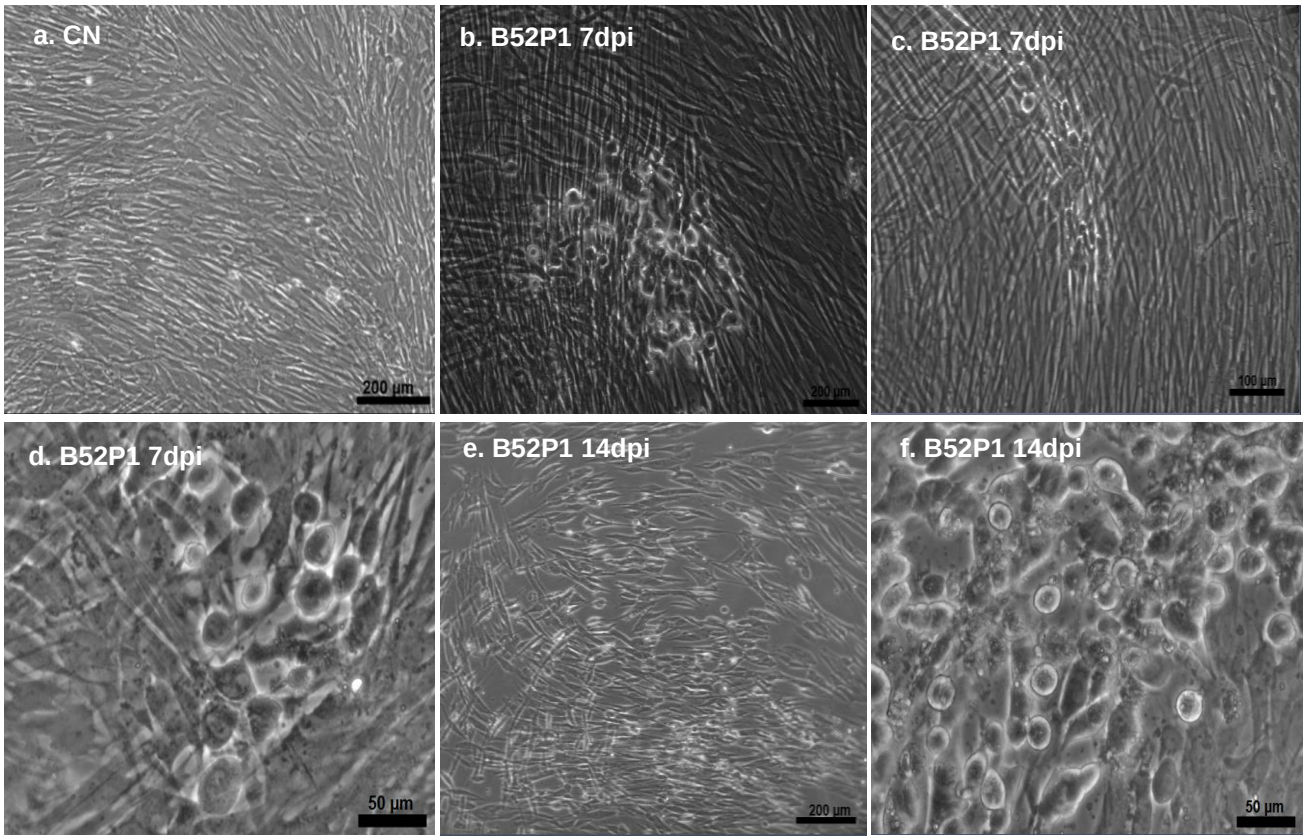
TIPO Y NÚMERO DE MUESTRAS	POSITIVAS PCR	P0		P1		P2		P3	
		ECP	PCR	ECP	PCR	ECP	PCR	ECP	PCR
LBA: 27	B03	+++	+	+++	+	-			
	B04	+/-	+	-	-				
	B18	-	-						
	B47	+++	+	+	-				
	B48	-	-						
	B52	+++	+	+++	+	+++	+		
	B56	-	-						
U: 6	U17	++	+	-	+	-	+	-	+
	U24	+	+	+++	-				

Tabla 5.2.2. Resultados por PCR y Efecto Citopático (ECP), pasajes 0, 1, 2 y 3 en cultivo celular. Se resalta la muestra B52, a partir de la cual se logró el aislado clínico.

Únicamente el LBA denominado B52, produjo ECP desde el P0, que se mantuvo en los pasajes P1 y P2, (Figura 5.2.4.) con un aspecto compatible con lo reportado para HCMV, como la formación de focos de células redondeadas, refringentes, que se desprendieron. Estas células fueron positivas por PCR para HCMV y negativas para VHS-1 y 2, Adenovirus, Pan Enterovirus y Polioma virus BK y JC (BKV).

Con estos resultados, se inició la producción de una cosecha viral con pasaje 2, utilizando la técnica reportada por Britt (1) con algunas modificaciones, como se describió previamente. Adicionalmente la muestra U17, obtenida de una recién nacida con infección congénita por HCMV; que fue positiva únicamente para el virus, no indujo ECP en P2 y P3, (Figura 5.2.5.) por lo tanto, esta muestra no fue utilizada debido a la gran dificultad para titular su producción por la técnica de $TCID_{50}$.

Figura 5.2.4. Daños en la morfología celular observados en el Pasaje 1 de la muestra B52.



a. Control negativo (CN). Células MRC-5 tratadas con PBS.

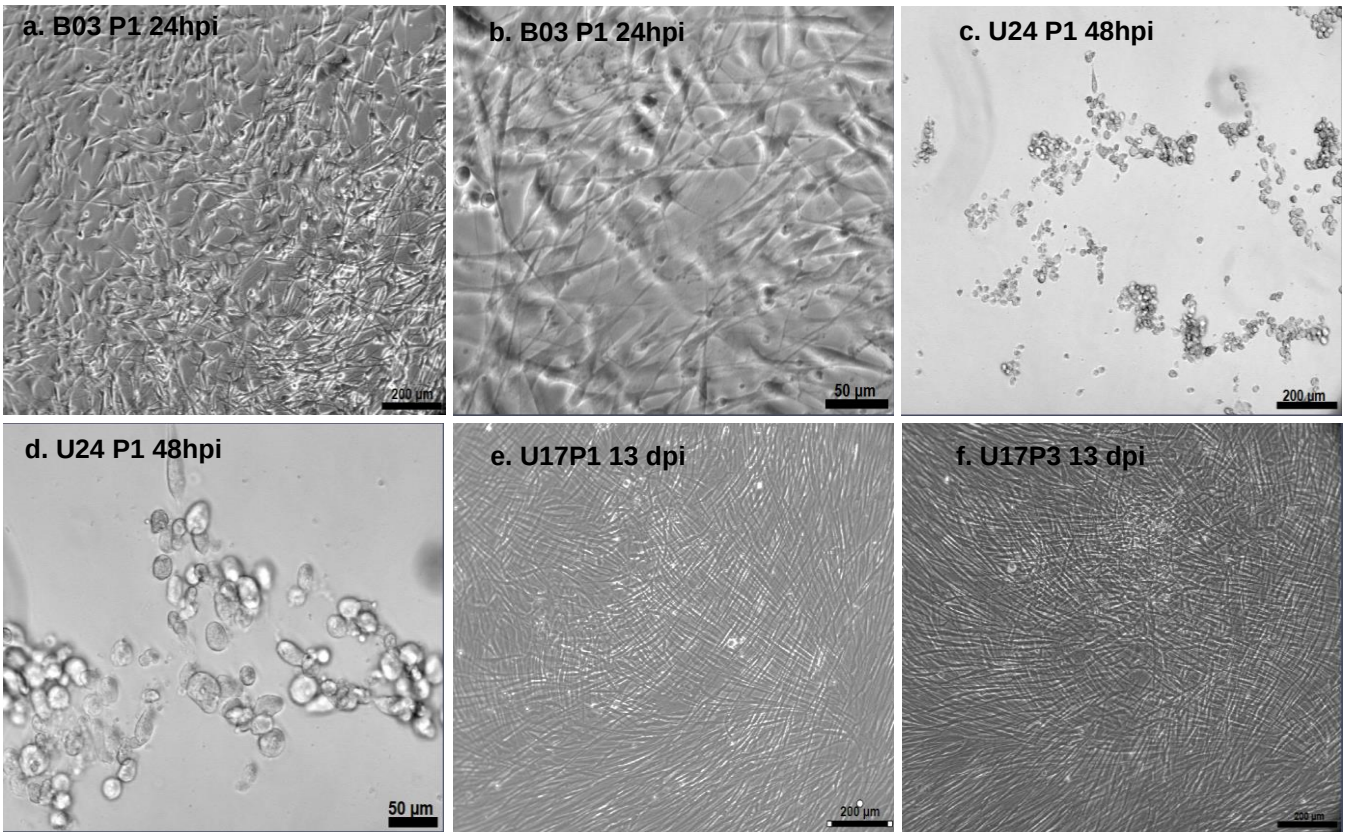
b y c. B52 en Pasaje 1. A los 7 dpi. se observan focos de células con evidente desprendimiento, redondeadas u ovaladas, refringentes.

d. B52 en Pasaje 1. En mayor aumento se observa un foco de las células con ECP.

e y f. B52 en Pasaje 1. A los 14 dpi. se observa extensión del ECP, afectación de la integridad de la monocapa, mayor número de células desprendidas respecto al día 7.

Otras muestras como la B03, B47 y U24 indujeron ECP tanto en el P0 y P1, sin embargo, este efecto no mostró características compatibles con lo observado en los pasajes en cultivo de B52 o a las descritas en la literatura para HCMV. La muestra B03 fue positiva por PCR, mientras que las muestras B47 y U24 fueron negativas en el pasaje 1, además, presentaron un ECP atípico, por lo que se descartaron para continuar el aislamiento (Figura 5.2.5.)

Figura 5.2.5. Daños en la morfología celular observados en los pasajes 1, 2 y 3 de las muestras B03, U24 y U17.



a y b. B03 en Pasaje 1. Efecto citopático con encogimiento celular extenso a las 24 hpi., sin células redondeadas.
c y d. U24 en Pasaje 1. Se observó desprendimiento celular temprano con células redondeadas, no compatible con el ECP descrito para HCMV.
e y f. U17 en Pasaje 1 y 3. A los 13 dpi., es evidente la integridad de la monocapa, no se observa ECP

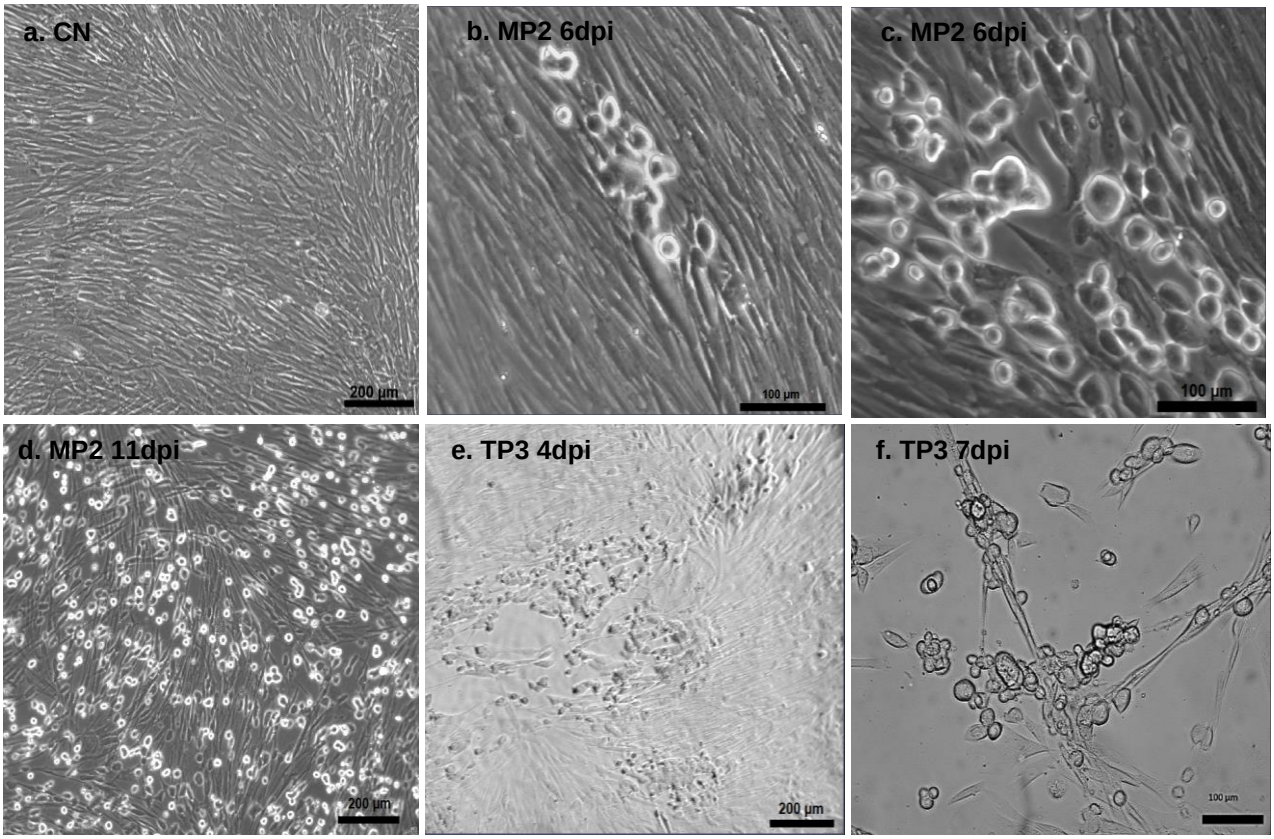
Luego de obtener las cosechas de B52 en el P2, se empleó el mismo procedimiento para obtener cosechas de las cepas de laboratorio Merlin y Towne, cuyas características morfológicas se observan en la Figura 5.2.6.

Posterior a la obtención de las cosechas virales, se llevó a cabo la titulación por $TCID_{50,}$ con los siguientes resultados, expresados en UFP/mL (Tabla 5.2.3.):

Tabla 5.2.3. Titulación del aislado clínico y de la cepa Merlin por $TCID_{50.}$

	B52	**Merlin**
P1	4.6×10^{3}	3.6×10^{3}
P2	2.18×10^{6}	3.6×10^{4}

Figura 5.2.6. Daños en la morfología celular observados en los pasajes 2 y 3, de las cepas Merlin y Towne.



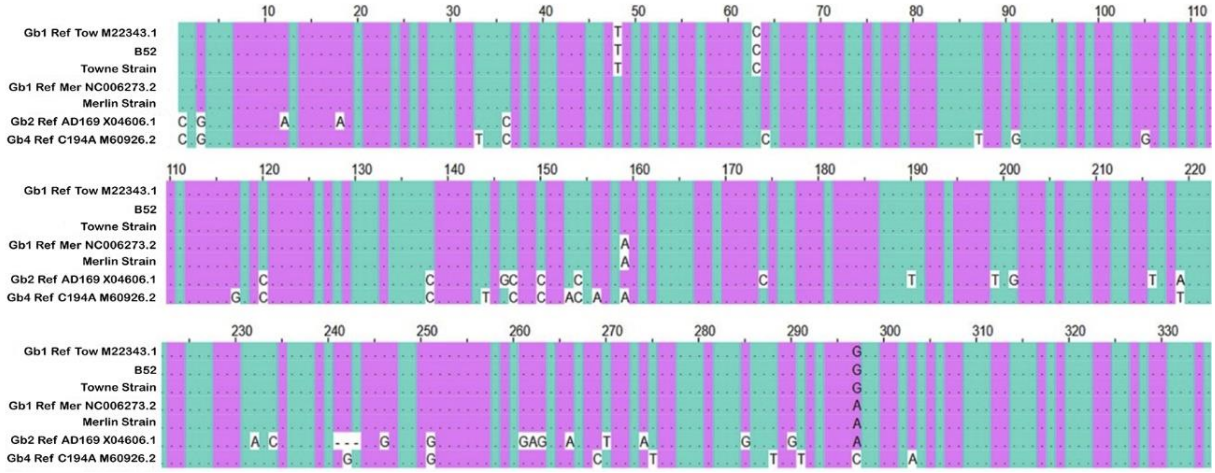
a. Control negativo (CN). Células MRC-5 tratadas con PBS.

b, c y d. Cepa Merlin (M) en Pasaje 2. Se observa la formación de focos de células que se desprenden, aparecen redondeadas y son refringentes. Llama la atención la similitud con la figura 5.2.4. d. ECP de B52. e y f. Cepa Towne (T) en Pasaje 3. Se observa la alteración de la monocapa al 4 dpi. y la pérdida cercana al 100%, con evidente alteración morfológica, al 7 dpi.

Para obtener las cosechas de la cepa Towne se utilizó el mismo protocolo empleado para cosechar el aislado y la cepa Merlin (método de Britt modificado); y se determinó un título de 2.7×10^7 UFP/mL en el pasaje 5.

Finalmente, se llevó a cabo la genotipificación del aislado B52 y de las cepas de laboratorio Merlin y Towne, por secuenciación y alineamiento, identificando en todos los casos el genotipo gB1 (Figura 5.2.7.)

Figura 5.2.7. Genotipificación del aislado clínico B52, las cepas de referencia Merlin y Towne, por alineamiento, en comparación con secuencias de referencia reportadas en el NCBI, para cada genotipo.



5.2.4. DISCUSIÓN

HCMV es uno de los principales patógenos en pacientes con compromiso inmunológico, grupo que ha ido en aumento debido al auge de los trasplantes de precursores hematopoyéticos y de órgano sólido. Como se ha descrito ampliamente, su actividad inmunomoduladora puede comprometer de forma importante el curso clínico de los pacientes trasplantados y de todos aquellos con alteración o disminución de la respuesta inmunológica. Es por esto por lo que el estudio *in vitro* de la actividad reguladora del sistema inmunológico por HCMV continúa siendo un objetivo importante de muchos grupos en todo el mundo. (8)

También es claro que en la mayoría de estos trabajos se emplean las cepas de laboratorio con alto número de pasajes en cultivo como Towne, AD169 y TB40/E. El alto número de pasajes y el hecho de que usualmente se obtienen las cosechas en líneas celulares de fibroblastos llevan a la ocurrencia de modificaciones genómicas que afectan el tropismo y la evasión inmunológica. (9) Sin embargo, queda la pregunta ¿Cómo se ha superado esta situación? Se están empleando Cromosomas Bacterianos Artificiales (BACs), técnica con la que se pueden llevar a cabo los experimentos con virus que deben tener un contenido genético muy cercano al de las denominadas cepas salvajes, reconstruyendo el genoma.
Otra posibilidad es la obtención de los aislados clínicos de HCMV; las dificultades para la consecución de los aislados de HCMV se han citado previamente y son las que seguramente han llevado a la utilización de los BACs. Sin embargo, dada la complejidad de la infección por HCMV y la variabilidad genética que se puede generar durante la infección, reactivación y/o reinfección compartimentalizada, es razonable asumir que el comportamiento viral más aproximado al del virus *in vivo*

muy probablemente se va a encontrar en los aislados clínicos, por lo que nos propusimos establecer el protocolo para aislamiento y cosecha de HCMV a partir de muestras clínicas.

Una de las mayores dificultades reportadas en el aislamiento de HCMV es el ciclo replicativo lento por lo que se debe esperar más de dos semanas la aparición de ECP, indicador de la ocurrencia de replicación viral, como fue reportado por Gregory y Menegus ya en 1983. (10)
El protocolo que se estableció en este trabajo comenzó con el trasporte de las muestras en el medio de cultivo celular DMEM con antibiótico y la posterior dilución en PBS, lo que seguramente mejoró la viabilidad de las partículas virales, manteniendo el título viral y la capacidad infecciosa, al tiempo que disminuyó la actividad citopática de la muestra. (11)
En 1984 Gleaves propuso la técnica de centrifugación lenta Shell-vial, para el aislamiento de HCMV, reportando que entre las 36 y 96 horas posinfección (hpi.) fue posible la detección de antígeno temprano viral, por inmunofluorescencia. (12) Desde ese momento, se ha confirmado que esta centrifugación mejora ostensiblemente el aislamiento de HCMV desde diversos tipos de muestras, acortando el periodo de aparición del ECP, como lo demostró el estudio de Leland y cols. (13) El objetivo de esta técnica es mejorar la adsorción viral a las membranas celulares sin causar daño celular, disminuyendo el tiempo de aparición del ECP. Por esto fue posible que, partiendo de 105 muestras de saliva, se observara ECP en 61, en las dos semanas posinfección.

Se intentó el aislamiento con muestras de saliva, pero, aunque se partió de 21 aislamientos positivos para HCMV en el P0, se terminó detectando virus contaminantes (VHS), en el P2 o P3, como sería de esperar en este fluido. Este aparente resultado adverso, refuerza la necesidad de verificar desde los pasajes iniciales si el ECP observado se debe a HCMV y/o a otros virus que también pueden encontrarse en la muestra. En lo referente a la saliva, teniendo en cuenta que la seroprevalencia para VHS 1 y 2 se encuentra entre el 50 y 90% en la población de todo el mundo y que estos virus son detectados por las descargas virales asintomáticas en individuos trasplantados o inmunocompetentes, no sorprende la coinfección con los virus Herpes. (14,15,16) Sin olvidar la complejidad de este fluido, en el que se encuentran proteínas de alto peso molecular como la mucina o la Inmunoglobulina A, que actúan como aglutininas atrapando las partículas virales o la presencia de otros organismos contaminantes además de los Virus Herpes, como bacterias y hongos. (17,18)
De otra parte, las líneas celulares fibroblásticas, con las que usualmente se busca obtener el aislado y las cosechas de HCMV, también son susceptibles a la infección por VHS, aunque en algunos casos se ha reportado que el ECP puede aparecer tardíamente y la sensibilidad a la infección podría ser menor, comparada con otras líneas celulares. (19,20)
La estrategia fue entonces buscar el aislamiento a partir de muestras en las que también puede aparecer HCMV por las descargas virales y/o por la infección/reactivación. Se obtuvieron muestras de LBA, orina y plasma para iniciar el mismo proceso de aislamiento. En total, se obtuvieron 175 muestras incluyendo

las de saliva y finalmente la muestra B52 demostró el patrón morfológico de ECP clásico descrito para HCMV, la formación de focos de células redondeadas, contiguas, que se expanden hasta confluir; confirmando por PCR la detección de este virus. (11)

En cuanto al LBA, es un procedimiento durante el cual se instila solución salina a las vías aéreas inferiores y se emplea en el diagnóstico de patologías pulmonares de diversa etiología. La forma de obtención, a partir del fluido recuperado de las vías aéreas inferiores disminuye la posibilidad de contaminación con virus respiratorios que usualmente se encuentran en las vías aéreas superiores. (21)

Referente a HCMV, el aislamiento a partir del LBA se ha empleado con fines diagnósticos principalmente; por ejemplo, en el trabajo de Eriksson y cols. (22) evaluaron 52 pacientes inmunocomprometidos con sintomatología compatible con infección pulmonar de los que se obtuvo el LBA para confirmar la infección por HCMV. Por medio de técnicas como PCR, detección de antígeno por inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa y aislamiento viral, en células MRC-5, reportan un tiempo de espera para la aparición del ECP de hasta de 6 semanas, ya que no centrifugaron las células. De los 52 pacientes, en 22 la PCR fue positiva y de estos 22 pacientes en 15 el aislamiento mostró ECP; en nuestro trabajo se tomó LBA en 27 pacientes, en siete la PCR fue positiva para HCMV y de estas muestras el P0 indujo ECP en cuatro. La concordancia entre el aislamiento en P0 y la PCR en el trabajo de Eriksson fue 68.18% y para nuestro caso 57.14%, pero con una disminución importante del periodo de observación. (22)

En el trabajo de Leuzinger y cols. (23) compararon el cultivo celular aplicando Shell-vial, con 1600 RPM durante 45 min. y pruebas cuantitativas de ácidos nucleicos (QNAT), para el diagnóstico de HCMV en tres grupos de pacientes hospitalizados, en los que se cambió la concentración del eluído luego de la extracción de ácidos nucleicos. Cuando llevaron a cabo la extracción el mismo día de la toma del LBA e iniciaron el cultivo celular, a partir de 112 muestras, encontraron resultado positivo en el 9% y por QNAT en hasta 18%. De este modo estos autores encontraron una concordancia entre el cultivo celular y la QNAT del 91% cuando concentraron 10 veces las muestras. Este trabajo, además de confirmar la pertinencia del Shell-vial para mejorar la detección temprana de HCMV, demostró el inicio del ciclo replicativo de HCMV en los fibroblastos, por la detección de la proteína inmediatamente temprana IE y corroboró la viabilidad de los LBAs para el cultivo celular de HCMV.

En este mismo trabajo, también emplearon la centrifugación, pero no reportan observación de ECP y la detección de la infección fue por inmunofluorescencia en un tiempo relativamente corto respecto al tiempo que puede tomar el desarrollo de la infección celular y la replicación viral a niveles detectables. Vale la pena resaltar que la detección de ácidos nucleicos de HCMV no implica la ocurrencia de replicación viral activa, lo que sí se puede confirmar en el cultivo celular por la aparición de ECP. (23)

En nuestro trabajo, de las 27 muestras de LBA, en siete de ellas el resultado por PCR fue positivo, por lo que se decidió continuar con el aislamiento. En el P0, cuatro muestras produjeron ECP, con algunas características atípicas para B03 y B47, y en el P1 fue evidente que el ECP no correspondía con el causado por HCMV interrumpiendo el aislamiento a partir de estos LBAs.

Desde el Pasaje 0, B52 mostró un ECP característico, con PCR positiva y en el P2 fue la única muestra con un comportamiento en cultivo concordante con lo que se observa en células infectadas con HCMV; estos resultados confirman que la detección positiva de ácidos nucleicos no se relaciona estrictamente con un aislamiento positivo e igualmente que el ECP no necesariamente se puede atribuir a Citomegalovirus y es probable que pueda ser causado por otros virus como los respiratorios. La presencia de estos virus adventicios se descartó por PCR en el aislado de la muestra B52.

Las dificultadas asociadas con el aislamiento, tales como el ciclo replicativo lento, la especificidad por células humanas y el hecho de que las partículas virales que se producen por la replicación en el cultivo permanecen asociadas a las células y no son liberadas al sobrenadante, también afectan la obtención de cosechas con títulos virales altos en pasajes tempranos, lo que es ideal si se quiere tener un aislado clínico para estudios *in vitro*. (1)

El protocolo publicado por Britt (1), para obtención de cosechas virales de cepas de laboratorio fue adaptado para cosechar el aislado B52, luego del pasaje 0 (P0).

Se inició el cultivo de células MRC-5 en botellas de 25 mL, que al alcanzar la confluencia aproximada al 80%, fueron inoculadas con un volumen muy bajo del sobrenadante del P0, con el fin de promover una infección celular que va a trascurrir lentamente, permitiendo el paso de partículas virales entre células infectadas y no infectadas. El ECP en el P1 de B52 apareció entre 4 a 6 días posinfección, con la formación de focos de células refringentes, redondeadas, que se desprendieron. Este efecto se extendió, provocando la confluencia de estos focos, pero manteniendo la viabilidad de las células que aún no se infectaban. Se decidió introducir algunas modificaciones al protocolo de Britt; por ejemplo, no retirar el inóculo y completar el medio de cultivo luego de la agitación a temperatura ambiente para el P1 y P2; no se observó pérdida celular y, por el contrario, la monocapa permaneció en buen estado. Además, se decidió utilizar botellas de 25 mL para el pasaje 1 y botellas de 75 mL para el P2, aunque Britt recomienda en primer lugar botellas de 150 mL, deja abierta la posibilidad de emplear botellas de menor volumen.

Durante el aislamiento y pasajeo de B52, alcanzar el efecto citopático en el 80 al 100% de las células tomó entre 12 y 14 días; en ese momento se hizo un desprendimiento mecánico que también provocó la ruptura celular con lo que las células y las partículas virales pasaron al sobrenadante, el que se retiró completamente de la botella. Luego, la sonicación terminó la ruptura de las células y la liberación de virus; al añadir suero fetal bovino para una concentración final de 20%, antes de alicuotar y congelar, se preservó la integridad de las partículas virales (criopreservación). Si no se promueve esta liberación de partículas virales, muy posiblemente se está subestimando el nivel de replicación viral que ocurrió en el cultivo. (1)

Cuando la inoculación se hace con un MOI elevado (de 1 a 5), el efecto citopático aparece tempranamente, dentro de las 24 a 36 horas posteriores a la inoculación, impidiendo que la infección se propague lentamente entre las células, y finalmente hay una menor producción y recuperación de partículas virales. (1,24)

El HCMV puede detectarse por largos periodos de tiempo en la orina de niños que adquirieron la infección congénita o en los primeros meses de vida y es el fluido

corporal donde se puede detectar con mayor probabilidad en la población pediátrica (25); en este estudio se obtuvieron 6 muestras de orina a partir de niños hospitalizados. Solamente dos muestras fueron positivas por PCR, a partir de las cuales se inició el aislamiento; la muestra U17 se obtuvo de una niña con infección congénita y a pesar de la positividad de la PCR en pasajes 1, 2 y 3, no se produjo ECP, corroborando lo dicho previamente: la detección de ácidos nucleicos virales no necesariamente implica que se trate de partículas virales infecciosas. Este resultado también se podría atribuir a un título muy bajo que no lleva una replicación viral con ECP detectable al microscopio.

La otra muestra de orina, U24, produjo un ECP que no se pudo atribuir a HCMV en cultivo celular; con una pérdida temprana de la monocapa (entre 24 y 48 hpi) y una morfología redondeada; tal como se propone para los LBAs, es posible que este efecto se produzca por otros virus presentes en la muestra, como el BKV, que tiene una alta prevalencia en la población mundial. (26) Se decidió descartar esta muestra para continuar el aislamiento por lo que no se confirmó la presencia del BKV.

Teniendo en cuenta que HCMV infecta y se propaga en fibroblastos humanos primarios, se emplearon fibroblastos gingivales primarios, en pasajes 6 a 12 para la titulación por $TCID_{50}$. Los títulos obtenidos para el aislado B52 fueron más altos que los encontrados para la cepa de laboratorio Merlin, que presentó un comportamiento levemente diferente, con un ciclo replicativo más lento (Figura 5.2.6. y Tabla 5.2.3.). Cuando se estableció la cepa Merlin en el año 2000, ya en el pasaje 3 se evidenció una modificación en el gen UL128. Ha quedado claro que los pasajes en cultivo de fibroblastos facilitan la ocurrencia de las alteraciones genómicas, lo que podría explicar las diferencias en el comportamiento de la cepa Merlin, respecto al aislado B52. Sin embargo, para lograr la secuencia completa del genoma de la cepa Merlin en el pasaje 3, los autores describen que lograron títulos hasta de $1x10^8$ UFP/mL. (27,28)

El comportamiento de la cepa de laboratorio Towne, con múltiples pasajes en cultivo fibroblástico fue claramente diferente, con la aparición temprana del ECP y con títulos virales más altos. (Figura 5.2.6.)

En cuanto a la genotipificación, se empleó la secuenciación para comparar el genotipo de las cepas de laboratorio Merlin y Towne con el aislado B52; en los tres casos el genotipo fue gB1, que como ya se dijo, es el más frecuentemente identificado en todo el mundo. Al parecer UL55 no es igualmente susceptible a las modificaciones genómicas reportadas en las cepas de laboratorio o referencia y que ocurren en la región UL/*b´* y en particular UL128, lo que podría explicar la identificación de gB1 en el aislado clínico y las cepas de laboratorio.

5.2.5. CONCLUSIÓN

Este trabajo estableció un aislado clínico de HCMV en un pasaje temprano de cultivo celular, modificando los protocolos de Shell-vial y de cosecha para cepas de laboratorio, con la inducción de lisis celular, lo que mejora los títulos y permite obtener un aislado con muy bajos pasajes en cultivo y con un título viral que hace viable su utilización en estudios *in vitro*.

Tratándose de fluidos corporales, es necesario descartar por PCR y por la evaluación microscópica del ECP la presencia de posibles virus adventicios como los VHS-1 y 2, Adenovirus, Pan Enterovirus y BKV.
El LBA demostró ser una muestra apta para este aislamiento, contrario a la saliva, cuya composición microbiológica impidió aislar el HCMV, que era el objetivo inicial. En este trabajo las muestras de plasma ocasionaron una pérdida celular inmediata luego de la inoculación, por lo que se consideró este tipo de muestra poco útil para el aislamiento viral. El aislado clínico B52 se comportó de forma similar a la cepa Merlin, pero con evolución más rápida del ECP y con título viral superior.

5.2.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Britt W.J. Human cytomegalovirus: propagation, quantification, and storage. Curr Protoc Microbiol. 2010; Chapter 14: Unit 14E.3. doi: 10.1002/9780471729259.mc14e03s18.
2. Gouarin S., Gault E., Vabret A., Cointe D., et al. Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. J Clin Microbiol. 2002; 40(5):1767-72. doi: 10.1128/JCM.40.5.1767-1772.2002.
3. Sun Y, Chan. R.K., Tan S.H., Ng P.P. Detection and genotyping of human herpes simplex viruses in cutaneous lesions of erythema multiforme by nested PCR. J Med Virol. 2003; 71(3):423-8. doi: 10.1002/jmv.10502.
4. Dou Y., Li Y., Ma C., Zhu H., et al. Rapid diagnosis of human adenovirus B, C and E in the respiratory tract using multiplex quantitative polymerase chain reaction. Mol Med Rep. 2018; 18(3):2889-2897. doi: 10.3892/mmr.2018.9253.
5. Zhang S., Wang J., Yan Q., He S., et al. A one-step, triplex, real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection of enterovirus 71, coxsackie A16 and pan-enterovirus in a single tube. PLoS One. 2014; 9(7):e102724. doi: 10.1371/journal.pone.0102724.
6. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol Evol. 2018; 35:1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
7. Deckers M., Hofmann J., Kreuzer K.A., et al. High genotypic diversity and a novel variant of human cytomegalovirus revealed by combined UL33/UL55 genotyping with broad-range PCR. Virol J. 2009; 6:210. doi: 10.1186/1743-422X-6-210.
8. Griffiths P., Baraniak I., Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. J Pathol. 2015; 235(2):288-97. doi: 10.1002/path.4437.
9. Dargan D.J., Douglas E., Cunningham C., Jamieson F., et al. Sequential mutations associated with adaptation of human cytomegalovirus to growth in cell culture. J Gen Virol. 2010; 91:1535-46. doi: 10.1099/vir.0.018994-0.
10. Gregory W.W., Menegus M.A. Practical protocol for cytomegalovirus isolation: use of MRC-5 cell monolayers incubated for 2 weeks. J Clin Microbiol. 1983 Apr;17(4):605-9. doi: 10.1128/jcm.17.4.605-609.1983.

11. Leland D.S., Ginocchio C.C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. Clin Microbiol Rev. 2007; 20(1):49-78. doi: 10.1128/CMR.00002-06.
12. Gleaves C.A., Smith T.F., Shuster E.A., Pearson G.R. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. J Clin Microbiol. 1984; 19(6):917-9. doi: 10.1128/jcm.19.6.917-919.1984.
13. Leland D.S., Hansing R.L., French M.L. Clinical experience with cytomegalovirus isolation using conventional cell cultures and early antigen detection in centrifugation-enhanced shell vial cultures. J Clin Microbiol. 1989; 27(6):1159-62. doi: 10.1128/jcm.27.6.1159-1162.1989.
14. Miller C.S., Danaher R.J. Asymptomatic shedding of herpes simplex virus (HSV) in the oral cavity. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008; 105(1):43-50. doi: 10.1016/j.tripleo.2007.06.011.Bradley H, Markowitz LE, Gibson T, McQuillan GM. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2--United States, 1999-2010. J Infect Dis. 2014; 209(3):325-33. doi: 10.1093/infdis/jit458.
15. Bradley H., Markowitz L.E., Gibson T., McQuillan G.M. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2--United States, 1999-2010. J Infect Dis. 2014; 209(3):325-33. doi: 10.1093/infdis/jit458.
16. Bohórquez S.P., Díaz J., Rincón C.M., Estupiñán M., et al. Shedding of HSV-1, HSV-2, CMV, and EBV in the saliva of hematopoietic stem cell transplant recipients at Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia, Bogotá, D.C. Biomedica. 2016; 36(0):201-10. doi: 10.7705/biomedica.v36i0.2985.
17. Llena-Puy C. The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006; 11(5):E449-55.
18. Arweiler N.B., Netuschil L. The Oral Microbiota. Adv Exp Med Biol. 2016;902:45-60. doi: 10.1007/978-3-319-31248-4_4.
19. Zhang W., Gao P., Gui X., Zhou L., et al. Induction of Rod-Shaped Structures by Herpes Simplex Virus Glycoprotein I. J Virol. 2020; 94(17):e00231-20. doi: 10.1128/JVI.00231-20.
20. Landry M.L., Mayo D.R., Hsiung G.D. Comparison of guinea pig embryo cells, rabbit kidney cells, and human embryonic lung fibroblast cell strains for isolation of herpes simplex virus. J Clin Microbiol. 1982; 15(5):842-7. doi: 10.1128/jcm.15.5.842-847.1982.
21. Davidson K.R., Ha D.M., Schwarz M.I., Chan E.D. Bronchoalveolar lavage as a diagnostic procedure: a review of known cellular and molecular findings in various lung diseases. J Thorac Dis. 2020; 12(9):4991-5019. doi: 10.21037/jtd-20-651.
22. Eriksson B.M., Brytting M., Zweygberg-Wirgart B., Hillerdal G., et al. Diagnosis of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage by polymerase chain reaction, in comparison with virus isolation and detection of viral antigen. Scand J Infect Dis. 1993; 25(4):421-7. doi: 10.3109/00365549309008522.
23. Leuzinger K., Stolz D., Gosert R., Naegele K., et al. Comparing cytomegalovirus diagnostics by cell culture and quantitative nucleic acid testing in broncho-alveolar lavage fluids. J Med Virol. 2021; 93(6):3804-3812. doi: 10.1002/jmv.26649.

24. Fortunato E.A. Using Diploid Human Fibroblasts as a Model System to Culture, Grow, and Study Human Cytomegalovirus Infection. Methods Mol Biol. 2021; 2244:39-50. doi: 10.1007/978-1-0716-1111-1_3.
25. Cannon M.J., Hyde T.B., Schmid D.S. Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection. Rev Med Virol. 2011; 21(4):240-55. doi: 10.1002/rmv.695.
26. Knowles W.A. Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). Adv Exp Med Biol. 2006; 577:19-45. doi: 10.1007/0-387-32957-9_2.
27. Dolan A., Cunningham C., Hector R.D., Hassan-Walker A.F., et al. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. J Gen Virol. 2004; 85(Pt 5):1301-1312. doi: 10.1099/vir.0.79888-0.
28. Wilkinson G.W., Davison A.J., Tomasec P., Fielding C.A., et al. Human cytomegalovirus: taking the strain. Med Microbiol Immunol. 2015; 204(3):273-84. doi: 10.1007/s00430-015-0411-4.

5.3. ACTIVACIÓN Y EXPRESIÓN *in vitro* DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN MONOCITOS/MACRÓFAGOS INFECTADOS CON UN AISLADO CLÍNICO Y DOS CEPAS DE LABORATORIO DE HCMV.

5.3.1. INTRODUCCIÓN

El Citomegalovirus humano (HCMV) infecta entre el 50 y 100% de la población en todo el mundo, con diferencias claras entre los países desarrollados y subdesarrollados en los que se encuentra la prevalencia más alta. La mayoría de los individuos adquiere la infección desde el nacimiento o en los primeros años y se establece latencia de por vida. (1,2)

Es bien conocido que en los individuos inmunocompetentes o con un sistema inmunológico sano la infección es por lo general asintomática, ya que su respuesta inmunológica robusta se basa en la producción de Interferones de tipo I, la actividad de las células *natural killer* (NK) para eliminar las células infectadas, mecanismos de la respuesta adaptativa con los anticuerpos que bloquean la unión y entrada de los virus a las células y los linfocitos T citotóxicos que también eliminan las células infectadas. (3) Esta respuesta mantiene la regulación sobre la replicación viral y por lo tanto sobre la carga viral, controlando así la posibilidad de que HCMV produzca la enfermedad de órganos terminales. Sin embargo, en los individuos que padecen alguna forma de inmunosupresión, se observa la mayor morbilidad y mortalidad asociada con este virus.

El trabajo *in vitro* con HCMV es fundamental para esclarecer la patogenia de las múltiples afectaciones y complicaciones que pueden diagnosticarse en los individuos con supresión inmunológica que son los de mayor riesgo de sufrir la infección / reactivación y que están relacionadas con la modulación de la respuesta inmunológica.

La línea de células THP-1 obtenida de un paciente con Leucemia Monocítica Aguda es de tipo monocitos (4), que luego del tratamiento con forbol 12-miristato 13 acetato (PMA), un éster de forbol con capacidad de inducir la diferenciación por activación de la proteína quinasa C (PKC) y la activación de vías de respuesta inmunológica y desensibilización de receptores, induce sobre estas un fenotipo de macrófago, con cambios morfológicos de tipo ameboide, con aumentó de diámetro, núcleo lobulado, formación de agregados y la expresión persistente de marcadores como CD16, CD14, CD11b y TLR-2. (5,6,7)

Dada la similitud en el comportamiento de las células THP-1 respecto a las células CD14+ de sangre periférica, se ha propuesto la utilización de esta línea como modelo experimental de la infección o el establecimiento de latencia y reactivación de HCMV. En el primer modelo la inoculación viral se hace después de inducir la diferenciación con PMA (8) y se evalúa el efecto de la infección en células que ya han adquirido el fenotipo de macrófago. En el modelo de latencia/reactivación; las células son infectadas en suspensión y luego son sembradas, lo que permite el establecimiento de latencia viral sin que ocurra el ciclo lítico en la mayoría de las células; y el tratamiento posterior con PMA induce la diferenciación de las células

monocíticas a macrófagos que llegan a ser permisivas al ciclo viral replicativo. De esta forma es posible observar el efecto de la infección en células no diferenciadas, la capacidad de HCMV para establecer latencia y el efecto de doble vía de la diferenciación celular y la reactivación viral. (7,9,10,11)
Luego de lograr el aislado clínico B52, se decidió no solamente evaluar su actividad sobre una línea celular monocítica en la expresión de mediadores de la respuesta inflamatoria – inmunológica, sino comparar el aislado con dos cepas de laboratorio o de referencia: Merlin, con bajo número de pasajes en cultivo celular y Towne que ha sido altamente pasajeada. Los pasajes en cultivo celular fibroblástico han llevado a la aparición de alteraciones genéticas, que pueden condicionar el efecto de la infección en células monocíticas. Teniendo en mente que la mayoría de los trabajos utiliza cepas de referencia, se consideró necesario, no sólo evaluar el efecto del aislado clínico que ofrece un panorama mucho más aproximado a la situación *in vivo*, sino comparar el efecto del aislado con el de las cepas Merlin y Towne.
Por lo tanto, nuestro objetivo consistió en evaluar y comparar *in vitro* la activación y expresión de mediadores inflamatorios en monocitos/macrófagos infectados con un aislado clínico y dos cepas de laboratorio de HCMV.

5.3.2. METODOLOGÍA

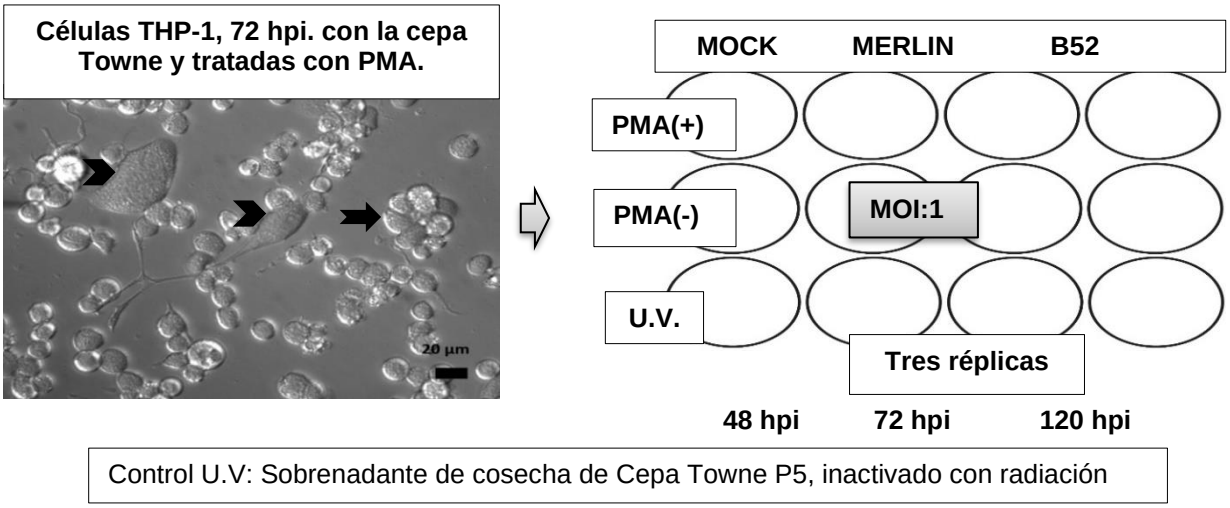
- **Cultivo de células THP-1 y establecimiento del modelo de latencia – reactivación utilizando el aislado clínico B52 o las cepas de referencia Merlin y Towne de Citomegalovirus humano:**

Las células THP-1 (TIB-202 ATCC) se mantuvieron en suspensión en botellas T25 en medio RPMI suplementado con SFB al 10%, antibiótico y antimicótico al 1% y glutamina al 1%. Para establecer el modelo de latencia - reactivación se adaptó el protocolo propuesto por Arcangeletti y cols. (11) que consiste en la infección de las células THP-1, para luego estimularlas con PMA, llevándolas a su diferenciación. El protocolo se describe a continuación.
A partir de la suspensión celular, las células THP-1 se colectaron, centrifugaron para concentrar y se sembraron $2x10^5$ células en placas de 12 pozos mantenidas en medio RPMI suplementado. (Figura 5.3.1.) Para la infección se utilizaron a una MOI:1 las cepas de referencia Towne o Merlin y el aislado clínico B52 obtenidos previamente de sobrenadantes de células MRC-5. Las células junto con uno de los virus evaluados se centrifugaron inmediatamente a 700g por 45 min a 25°C -método conocido como Shell vial-, luego se incubaron por dos horas a 37ºC y al finalizar el tiempo, se retiró el inóculo cuidadosamente y se adicionó medio fresco.
A las 24 horas post-infección (hpi.) se centrifugaron las células por 10 min a 216 *g*, se retiró el medio y se adicionó en algunos pozos medio con PMA (Sigma-Aldrich P1269) 200 ng/mL y se incubaron por 48 horas, al cabo de las que se repitió la centrifugación a 216 *g*, se retiró el medio y se adicionó medio fresco. Las células se incubaron y evaluaron a las 48, 72 y 120 hpi.
Al finalizar cada periodo de tiempo evaluado, se recolectaron los sobrenadantes de las células infectadas y tratadas con cada condición y se almacenaron a -80°C. De igual forma las células se disociaron enzimática y mecánicamente con una solución

de Tripsina de 0.5%, EDTA 10 mM en PBS. Luego se detuvo la reacción y las células fueron removidas y transferidas a tubos de 1.5 mL, placas de 12 pozos o sembradas en laminilla. Cada condición y periodo se procesó en tres réplicas de dos cultivos independientes. En la figura 5.3.1. se resumen las condiciones de cultivo de las células THP-1 en placa de 12 pozos.

Figura 5.3.1. Aspecto morfológico de las células THP-1 y diseño experimental de la infección con el aislado B52 y las cepas de referencia Towne y Merlin y tratamiento con PMA

Figura 5.3.1. A la izquierda, cultivo de células THP-1 infectadas con la cepa Towne y tratadas con PMA; se observan células redondeadas formando conglomerados o clústeres (➧); y células adheridas, de mayor tamaño, con prolongaciones citoplasmáticas (➧), lo que sugiere la diferenciación a macrófagos. A la derecha se muestra el esquema de la placa de 12 pozos, con la distribución de las distintas condiciones de control, infección y tratamiento con PMA.



Control U.V: Sobrenadante de cosecha de Cepa Towne P5, inactivado con radiación

- **Detección de β-actina e inmunofluorescencia de la proteína IE1/2 en células THP-1 infectadas con el aislado clínico B52 o las cepas de referencia Merlin y Towne:**

Luego de la recolección de las células, estas se sembraron en laminillas ubicadas en placas de 24 pozos según los tiempos, tratamientos y cepa de virus utilizado. Luego de la siembra se retiró el medio y agregó paraformaldehído (PFA) al 4% por 20 min. A continuación, se lavaron las células y se trataron con cloruro de amonio 50 mM por 30 min. a temperatura ambiente (TA). Luego se permeabilizaron con Tritón al 0.3% en PBS, y se agregó solución de bloqueo (suero de cabra 10% en PBS) por 45 min. a TA. Posteriormente, se aplicó el anticuerpo anti IE1/2 (DAKO, Ref. M0854) 1:100 diluido en solución de bloqueo al 5% y Tritón X-100 al 0.15% y se incubó por 1 hora a 37°C. Las células se lavaron con PBS y se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 594 (1/500) diluido en suero de bloqueo al 5%, e incubó por 45 min. a TA. A continuación, se aplicó el fármaco faloidina

fluorescente (Cell Signaling), diluido en PBS (1:20) por 30 min. Finalmente se lavaron las células y se adicionó Hoechst 1/100 e incubó por 15 min. y las laminillas se montaron sobre láminas portaobjetos utilizando Polymount y sellaron con esmalte. Las células fueron evaluadas bajo microscopio Zeiss AxioImager M2 y el software Zen 2012.

- **Evaluación de la expresión de transcritos celulares y virales en células THP-1 infectadas con el aislado B52 o las cepas Merlin y Town de Citomegalovirus humano:**

Otra parte de las células se transfirieron en tubos de 1,5 mL donde se inició la extracción de ácidos nucleicos utilizando el kit RTP® DNA/RNA Virus mini kit (STRATEC), siguiendo las indicaciones del fabricante. El eluído se utilizó para la amplificación por PCR en tiempo real, utilizando el kit LUNA® Universal qPCR Master Mix (NEB), siguiendo las indicaciones del fabricante. Como plantilla se utilizó 100 µg RNA y los *primers* empleados se utilizaron a 0.1 µM. Las secuencias se relacionan en la tabla 5.3.1:

Tabla 5.3.1. Genes y *primers* empleados en la RT-qPCR para la evaluación de trascritos celulares.

Gen	*Primer forward* 5´ ⟶ 3´	*Primer reverse* 3´⟶ 5´
IFNα	GCTTGAAGGACAGAGATGAC	CTGCTGGTAGAGTTCCAGTGT
IFNβ	AACAGGTAGTAGGCGACACT	AGGAGCTTCTGACACTGACA
FNTα	CGAGTGACAAGCCCGTAG	GGCAGCCTTGTCCCTTGAAG
IL-8	AGACAGCAGAGCACACAAGC	ATGGTTCCTTCCGGTGGT
IL-10 (humana)	ACATCAAGGCGCATGTGAAC	TAGAGTCGCCACCCTGATGT
IL-1β	CACGATGCACCTGTACGATCA	GTTGCTTATCCTGTCCCT
CXCL-10	GCCATTCTGATTTGCTGCCT	GCTGATGCAGGTACAGCGT
β-Actina	GCCATTCTGATTTGCTGCCT	GCTGATGCAGGTACAGCGT

El programa de amplificación fue el siguiente:

Tabla 5.3.2. Programa de amplificación para RT-qPCR de trascritos celulares en células THP-1.

Proceso	**Temp (**°C)	**Tiempo**	
Transcripción reversa (RT)	55	15 min	
Desnaturalización	95	2 min	
	95	10 Seg	40 ciclos

- **Evaluación de la expresión de marcadores de superficie en células THP-1 infectadas con B52 o las cepas de referencia Merlin y Towne de Citomegalovirus humano:**

Las células recolectadas fueron centrifugadas a 5000 RPM por 3 min., luego se lavaron con PBS, centrifugaron y fijaron con PFA al 1% a TA por una hora. A continuación, se inició la marcación con los diferentes anticuerpos a una dilución 1:200 a 4°C por 30 min. Luego las células se lavaron dos veces, se centrifugaron y se resuspendieron en 200 µL de PBS. Se realizó la lectura de 10.000 eventos utilizando un citómetro Beckman Accuri A6.
Los anticuerpos (BIOLEGEND) y sus respectivos fluorocromos, se relacionan a continuación:

Tabla 5.3.3. Anticuerpos y fluorocromos empleados en la evaluación de la expresión de marcadores de superficie en células THP-1.

PANEL 1			**PANEL 2**		
CANAL	**Anticuerpo**	**Fluorocromo**	**CANAL**	**Anticuerpo**	**Fluorocromo**
FL1	CD64	FITC	FL2	CD206	PE
FL2	CD11b	PE	FL3	HLA-DR	PerCpCy5
FL3	CD14	PerCpCy5			
FL4	CD68	Alexa F 647			

- **Evaluación de mediadores inflamatorios en el sobrenadante de células THP-1 infectadas con B52 o las cepas Merlin y Towne de Citomegalovirus humano:**

Los sobrenadantes recolectados de los cultivos infectados y tratados fueron procesados para evaluar la concentración de 20 analitos utilizando el kit Human Magnetic Luminex® Assays (R&D Systems) y la plataforma Luminex 200 xMAP multiplex. Los datos obtenidos se muestran como la media aritmética de tres réplicas, los gráficos se elaboraron tomando como referencia el resultado de las células sin infección y sin tratamiento con PMA, Mock (-), para las células infectadas y sin tratamiento con PMA. Para los gráficos de los resultados de la infección con los tres virus y el tratamiento con PMA en las células THP-1, se tomó el resultado de las células sin infección y tratadas con PMA, Mock (+), y se muestran las diferencias entre las distintas condiciones y este Mock (+).

- **Titulación por $TCID_{50}$ de los sobrenadantes de las células THP-1, infectadas con B52 o las cepas Merlin o Towne:**

Se recolectaron los sobrenadantes y se procedió de la siguiente forma:
Se sembraron $2x10^4$ células MRC5 (CCL-171 ATCC) por pozo en placas de 96 pozos mantenidas en medio DMEM suplementadas con SFB al 10% y antibiótico/antimicótico. A las 24 horas post siembra se prepararon diluciones

seriadas desde $1x10^{-1}$ a $1x10^{-9}$ de cada uno de los sobrenadantes de las células THP-1 infectadas y sin tratamiento con PMA por 48 hpi., en DMEM con SFB al 2% y antibiótico/antimicótico. Luego se retiró el medio de cultivo de los pozos y se añadieron 100 µL de cada dilución. A las 2 hpi. se retiró el inóculo y se adicionó medio DMEM con SFB al 2%. Como control negativo se utilizó PBS. Diariamente hasta 120 horas posteriores a la inoculación las células se observaron bajo microscopio, registrando la aparición de efecto citopático (ECP) por pozo y se calculó el título viral en Unidades Formadoras de Placa (UFP) por mL. El ECP de cada sobrenadante se evaluó en seis pozos diferentes de dos experimentos independientes.

- **Cuantificación absoluta del gen UL54 que codifica la ADN polimerasa de Citomegalovirus:**

Para establecer el número de copias del gen en los sobrenadantes de las células THP-1 infectadas con el aislado B52 y las cepas Merlin y Towne, se utilizó una curva de cuantificación absoluta. Se hizo clonación en el vector pGEM de un fragmento del gen UL54 y luego se transformó en bacterias *E. coli*. Se hizo la purificación del plásmido por lisis alcalina y se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm.
El número de copias del plásmido se estableció con la siguiente fórmula:
N° de copias = 260 ng/µL x $(6.022x10^{23})$ **/** 3244pb x $1x10^{9}$ x 660 = 7.3×10^{10} copias/ µL.
Posteriormente se obtuvo la curva estándar, empleando diluciones en base 10 y finalmente la PCR en tiempo real con Sybr Green para el gen UL54. Los *primers* empleados fueron los siguientes:
Primer forward: CCCTCGGCTTCTTCTCACAACAAT
Primer reverse: CGAGTTAGTCTTGGCCATGCAT
Estos *primers* se emplearon a una concentración de 0.1 µM y el protocolo de amplificación fue el siguiente: 95°C por 5 minutos, 95°C por 15 segundos y 60°C por un minuto, 35 ciclos.

- **Análisis estadístico:**

Se aplicó la prueba de Chi2 para establecer las diferencias en la expresión de cada marcador de superficie, por cada condición de infección y periodo de tiempo, respecto a las células THP-1 no infectadas y sin tratamiento con PMA, Mock (-). Las diferencias estadísticamente significativas fueron aquellas con un valor de $p < 0.05$ y aparecen señaladas en las respectivas figuras de cada condición con un asterisco rojo.

5.3.3. RESULTADOS

- **La proteína IE1/2 fue detectada en las células infectadas independientemente del virus, tratamiento y tiempo postinfección:**

En las células THP-1 no infectadas con y sin tratamiento con PMA, no se detectó la proteína IE1/2; estas células presentaron una morfología redondeada que se mantuvo en los tres periodos de tiempo y sugiere que mantuvieron un fenotipo monocítico (Figs. 5.3.2. A, E, I y Fig. 5.3.3. A, E, I). En las células no tratadas con PMA e infectadas con B52 la marcación para IE1/2 se observó principalmente en el núcleo en los tres tiempos evaluados (Figs. 5.3.2. D, H y L), y en algunas células infectadas con Towne a las 48 hpi, se detectó la proteína en el citoplasma de forma granular con puntos bien definidos, o con una distribución difusa y con aumento del tamaño celular (Fig. 5.3.2. B). De igual modo en algunas células infectadas con B52 a las 120 hpi se observaron prolongaciones citoplasmáticas (Fig. 5.3.2. L), y la infección con Merlin también indujo irregularidades en la membrana celular en este mismo tiempo (Fig. 5.3.2. K).
En las células tratadas con PMA e infectadas, la proteína IE1/2 se detectó en el núcleo de algunas células en todos los tiempos y condiciones de infección evaluados, con una marcación bien definida. Como se aprecia en las Figuras 5.3.3. D, H y L, en las células infectadas con B52 la proteína viral se encontró en todos los periodos de tiempo. También se observó una distribución punteada en el citoplasma en proximidad al núcleo siendo esta más evidente en las células infectadas con Towne a las 72 hpi. (Fig. 5.3.3. F). Adicionalmente en las células infectadas con B52 y Towne se observaron cambios compatibles con la morfología de los macrófagos, células fusiformes, con aumento de tamaño y prolongaciones citoplasmáticas (Figs. 5.3.3. J, L), mientras que las células infectadas con Merlin y tratadas con PMA no mostraron prolongaciones citoplasmáticas (Fig. 5.3.3. K).

- **Expresión relativa de genes de citocinas, marcadores de superficie y mediadores inflamatorios solubles:**

En las células THP-1 tratadas o no con PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) -como control de diferenciación y activación celular-, e infectadas con el aislado clínico (B52) o con las cepas de referencia (Towne o Merlin), se evaluó la expresión de los transcritos para las citocinas asociadas a la activación, diferenciación y movilización de monocitos/macrófagos como los **Interferones:** IFNα e IFNβ; **Citocinas proinflamatorias**: FNTα, IL-1β, CXCL-10, e IL-8 y la citocina **inmunosupresora** IL-10, en los tres tiempos post-infección propuestos (48, 72 y 120 hpi.). Como controles se evaluaron células expuestas al Mock (sobrenadante de Fb no infectados), o a los virus inactivados con luz U.V. Posteriormente, se determinó la eficiencia de expresión de cada transcrito con el software LingReq y se utilizó la fórmula de Schefé y cols. (2006) para calcular la expresión relativa respecto al Mock sin PMA y β actina como gen de referencia También se evaluó en las mismas condiciones de infección y tratamiento con o sin PMA, la expresión de algunos marcadores asociados a **cambios en el fenotipo** CD14, CD11b, CD68, CD64, CD206 y HLA-DR, en los tres tiempos post-infección planteados (48, 72 y 120 hpi.), utilizando citometría de flujo y la producción de mediadores solubles por LUMINEX.

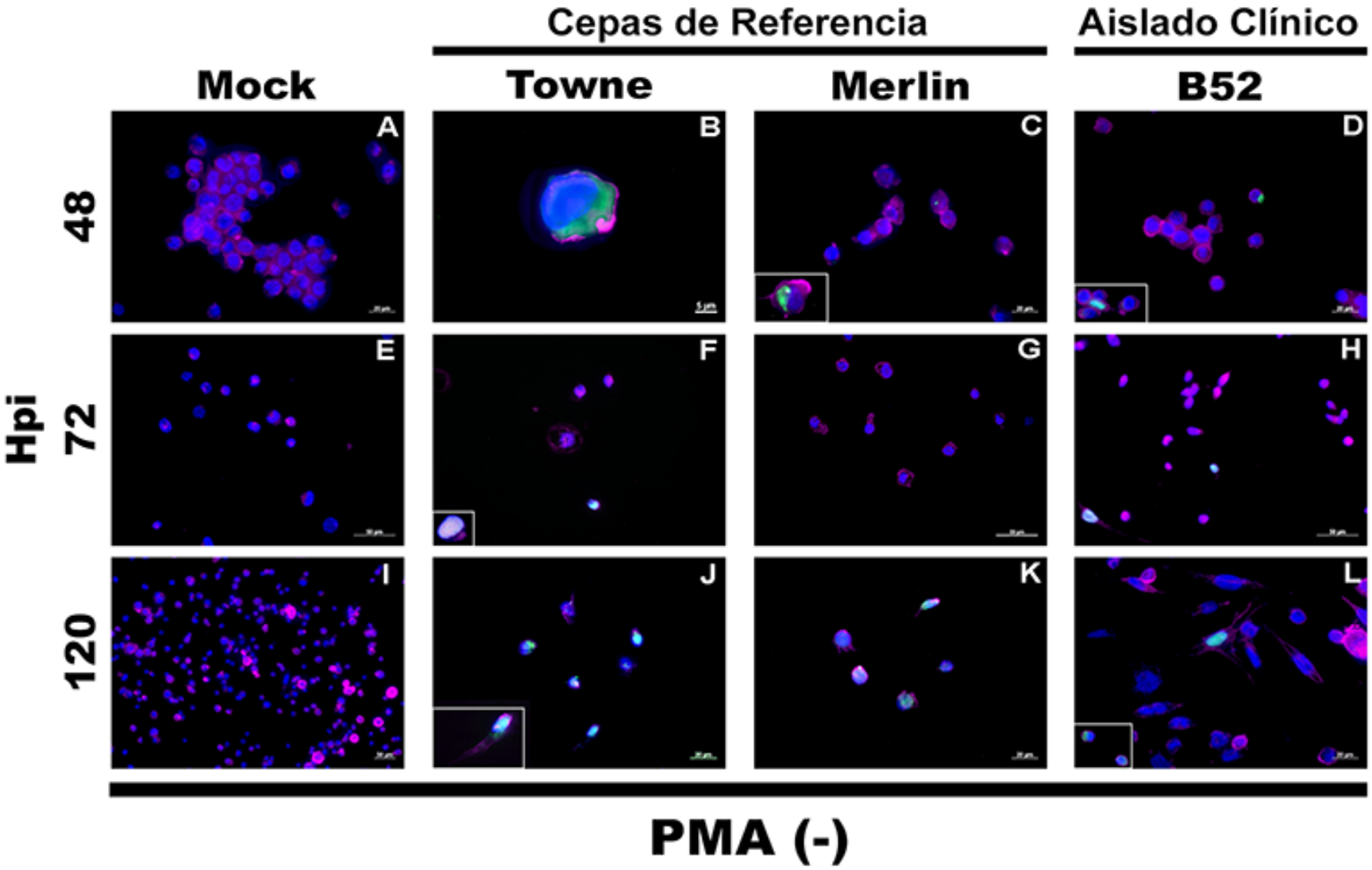


Figura 5.3.2. **IE1/2, Núcleos, Actina.** Detección de la proteína IE1/2 de HCMV en células THP-1 PMA (-), no infectadas e infectadas con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, en tres periodos de tiempo.

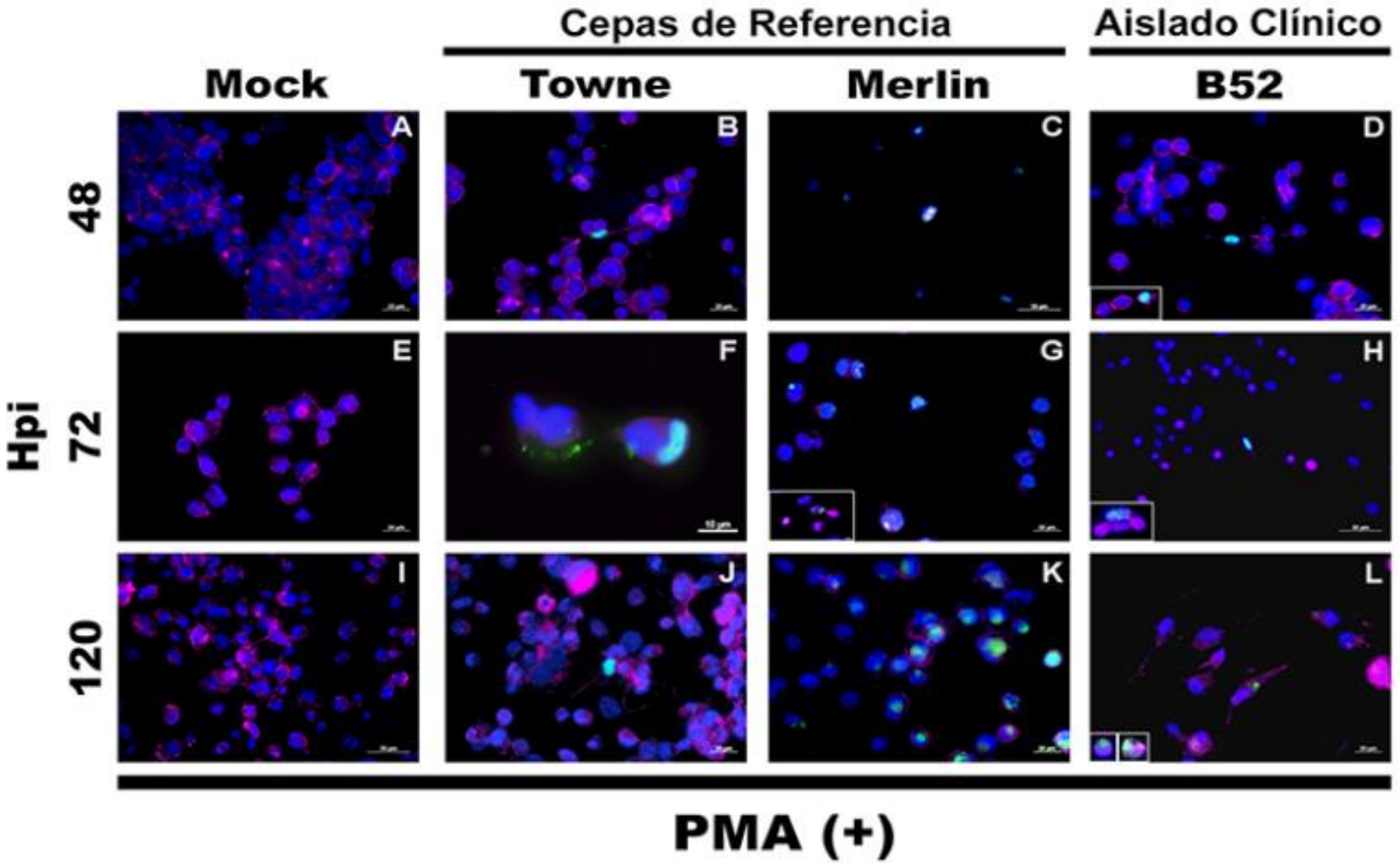


Figura 5.3.3. **IE1/2, Núcleos, Actina.** Detección de la proteína IE1/2 de Citomegalovirus en células THP-1 PMA (+), no infectadas e infectadas con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, en tres periodos de tiempo.

Los resultados de la expresión relativa de algunos de los genes y concentraciones de mediadores se encuentran como tablas en las que aparecen los valores obtenidos para la expresión relativa (Número de veces) y gráficos de esta expresión relativa, respecto al control que fueron las células no tratadas con PMA y no infectadas – Mock (-).
Las concentraciones de los mediadores solubles (LUMINEX), se encuentran en tablas y están expresadas en pg/mL; los gráficos de las concentraciones de mediadores muestran las diferencias entre las células infectadas y sin tratamiento con PMA respecto a la media obtenida en las células no infectadas y no tratadas con PMA, Mock (-). Para las células infectadas y tratadas con PMA, se muestran las diferencias respecto a la media obtenida de las células no infectadas y tratadas con PMA, Mock (+).

- **El aislado clínico indujo una sobre regulación diferencial temprana de genes de Interferones, independiente del tratamiento con PMA, regulando a la baja el IFNβ en los sobrenadantes de las células THP-1:**

En las células infectadas con el aislado clínico B52, tratadas (+) o no (-) con PMA se observó a las 48 hpi., un incremento en la expresión relativa para IFNα de 7 veces, mientras que en las otras condiciones experimentales los cambios en su expresión fueron inferiores a 1. A las 72 hpi., hubo un aumento de 3.7 veces, en las células infectadas con la cepa Towne y tratadas (+) con PMA, mientras que en las células infectadas con B52 se disminuyó entre 3 y 7 veces, siendo este efecto mayor en las células sin (-) PMA. A las 120 hpi., se evidenció que las células infectadas con las cepas de referencia (Towne o Merlin) y tratadas con (+) PMA mostraron un aumento en su expresión de 3 veces, mientras que la infección con el aislado clínico redujo su expresión 7 veces, respecto a las 48 hpi., y de 3 veces respecto a las 72 hpi. (Figura 5.3.4.)

En el sobrenadante de las células infectadas con B52 se observó un aumento en la concentración de IFNα a las 48 hpi., tanto en las células tratadas con PMA (32,88 pg/mL) como en las no tratadas (30,21pg/mL) y fue mayor a la detectada en los sobrenadantes de las células infectadas con las cepas Merlin o Towne, las cuales mostraron diferencias entre las células no tratadas con PMA (-) y las tratadas PMA (+), sin embargo, en estas últimas la concentración fue levemente mayor. El mismo comportamiento para este Interferón se observó a las 72 y 120 hpi. (Figura 5.3.5. y Tabla 5.3.4.)

Figura 5.3.4. Expresión relativa de los genes de Interferones alfa (IFNα) y beta (IFNβ), citocinas proinflamatorias FNTα, CXCL-10, IL-1β e IL-8, y la citocina inmunosupresora IL-10, en células THP-1 tratadas o no con PMA, respecto a la expresión en células tratadas con el Mock sin PMA (-).

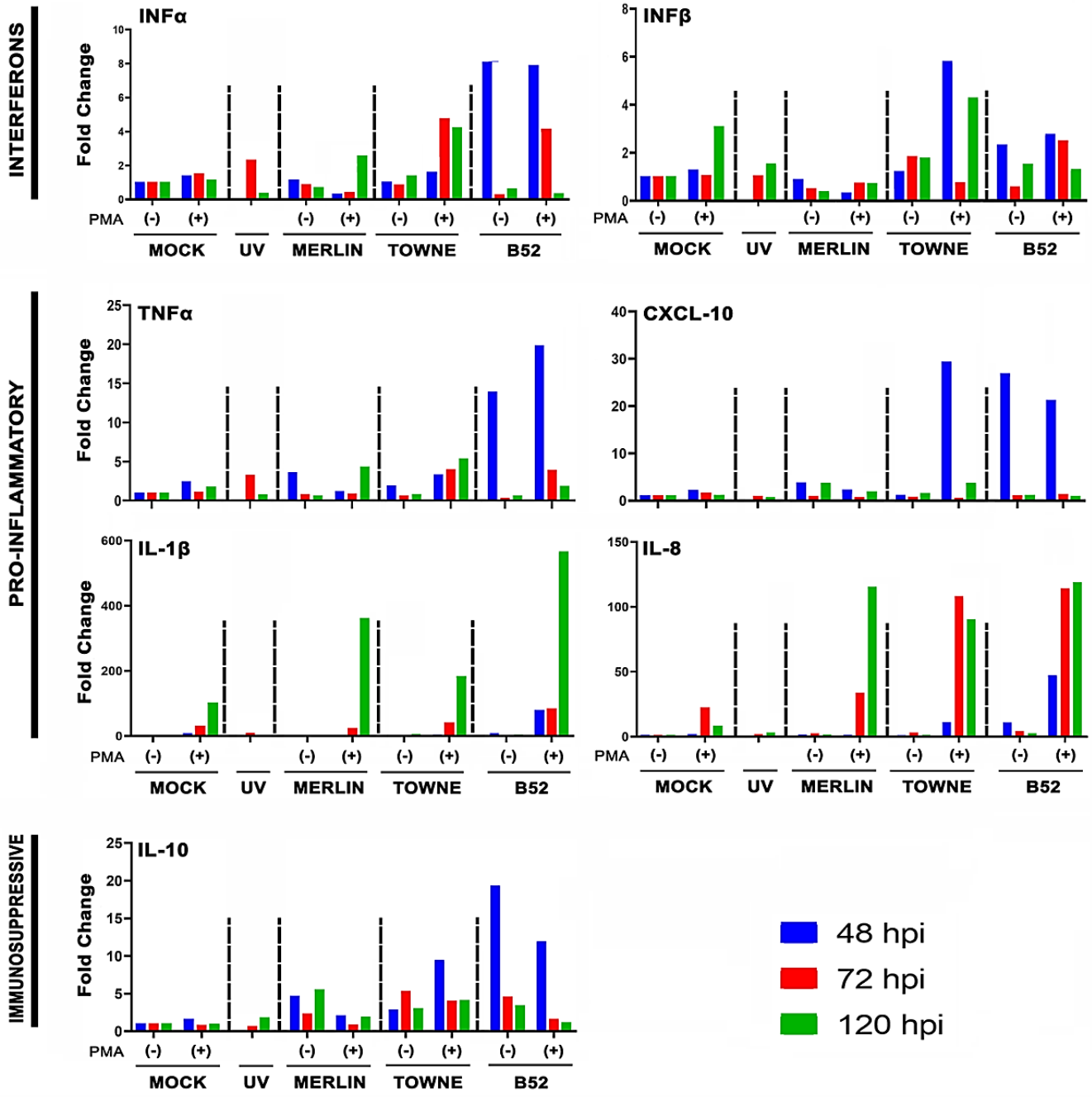


Tabla 5.3.4. Regulación de la expresión relativa y concentraciones de IFNα por la infección con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, respecto a las células no infectadas, en tres periodos de tiempo.

RT-qPCR= *fold change*.		LUMINEX pg/mL	Mock		U.V.	Merlin		Towne		B52	
			PMA (-)	PMA (+)	PMA (-)	PMA (-)	PMA (+)	PMA (-)	PMA (+)	PMA (-)	PMA (+)
IFNα	48 hpi.	RT-qPCR	1	1,37	0	1,13	0,3	1,02	1,59	8,09	7,87
		LUMINEX	16,75	18,94	18,09	19,37	24,53	16,29	21,83	30,21	32,88
	72 hpi.	RT-qPCR	1	1,45	2,3	0,85	0,4	0,82	4,73	0,26	4,13
		LUMINEX	16,29	28,5	20,62	19,57	31,23	21,42	34,47	28,11	38,46
	120 hpi.	RT-qPCR	1	1,14	0,35	0,7	2,54	1,38	4,21	0,6	0,32
		LUMINEX	19,27	32,06	16,75	28,14	37,18	25,38	34,8	27,42	35,11

El IFNβ, presentó a las 48 hpi., una expresión relativa de 5 veces por encima del control (Mock sin PMA), en las células infectadas con Towne y tratadas con PMA y en menor medida en las células infectadas con B52 independientemente del tratamiento con PMA. A las 72 hpi., disminuyó 5 veces la expresión de IFNβ en las células infectadas con Towne y tratadas con (+) PMA, mientras que en las células infectadas con B52 y tratadas (+) PMA, la expresión aumento 1.5 veces y en las células PMA (-) fue inferior al control. A las 120 hpi., las células expuestas al Mock y tratadas (+) con PMA presentaron un aumento en la expresión de IFN β, de 2 veces.

En las células infectadas con Towne y PMA (+) se incrementó 4 veces la expresión de IFNβ, mientras que en las células infectadas con el aislado clínico, disminuyó la expresión independiente del tratamiento con PMA. En las demás condiciones evaluadas no se observaron cambios relevantes, respecto al control. Se observó un efecto proinflamatorio diferenciado en cuanto al tiempo, entre el aislado clínico B52 y la cepa Towne, sugiriendo diferencias en las vías que son activadas por cada virus (Figura 5.3.4.)

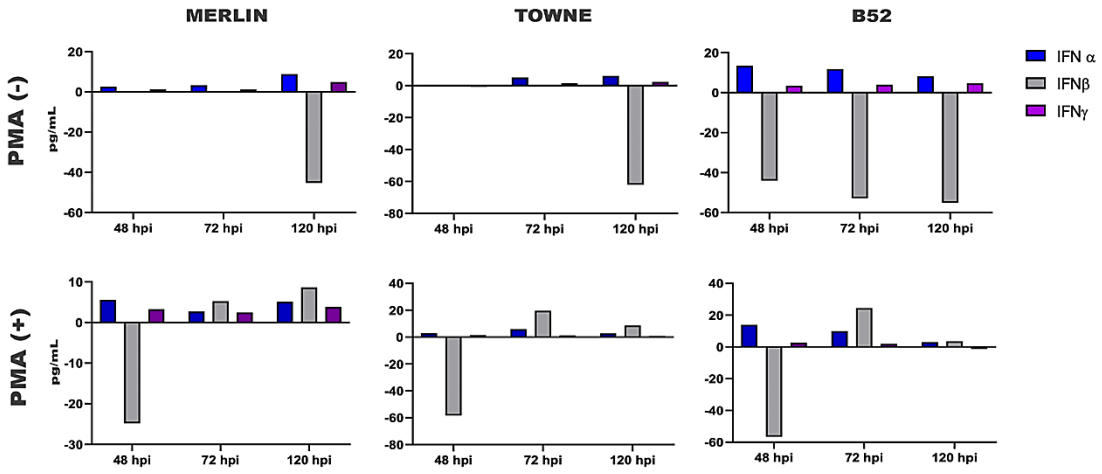
En cuanto a la determinación de las concentraciones en los sobrenadantes, el IFNβ tuvo una evidente regulación a la baja a las 48 hpi., con resultados comparables entre el aislado y las cepas de referencia en las células tratadas con PMA (+); B52 disminuyó la concentración de IFNβ a 43,5 pg/mL en las células PMA (-), mientras que no se observaron cambios en células infectadas con Merlin o Towne. A las 72 hpi. comenzó a observarse una regulación a la baja del IFNβ en las células infectadas con B52 y Towne en células PMA (+) y PMA (-), que se mantuvo hasta las 120 hpi. (Tabla 5.3.5. y Figura 5.3.5.)

Se evaluó el efecto de las distintas condiciones de infección y tratamiento en las concentraciones de IFNγ, encontrando valores entre 6 y 14 pg/mL, este último en las células infectadas con la cepa Merlin, tratadas con PMA, a las 120 hpi.

Tabla 5.3.5. Regulación de la expresión relativa y concentraciones de IFNβ por la infección con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, respecto a las células no infectadas, en tres periodos de tiempo.

RT-qPCR= *fold change*.		**LUMINEX pg/mL**	**Mock**		**U.V.**	**Merlin**		**Towne**		**B52**	
			PMA (-)	**PMA (+)**	**PMA (-)**	**PMA (-)**	**PMA (+)**	**PMA (-)**	**PMA (+)**	**PMA (-)**	**PMA (+)**
IFNβ	**48 hpi.**	**RT-qPCR**	**1**	**1,27**	**0**	**0,89**	**0,32**	**1,21**	**5,78**	**2,33**	**2,77**
		LUMINEX	87,5	87,5	87,5	87,5	62,7	87,5	29,11	43,5	30,93
	72 hpi.	**RT-qPCR**	**1**	**1,04**	**1,03**	**0,45**	**0,74**	**1,85**	**0,74**	**0,58**	**2,5**
		LUMINEX	87,5	13,11	87,5	87,5	18,37	87,5	32,75	35,72	37,54
	120 hpi.	**RT-qPCR**	**1**	**3,08**	**1,54**	**0,38**	**0,71**	**1,78**	**4,28**	**1,51**	**1,31**
		LUMINEX	87,5	18,38	87,5	42,19	27,02	25,43	27,02	32,4	21,89

Figura 5.3.5. Regulación de las concentraciones de Interferones, por la infección con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, respecto a las células no infectadas, en tres periodos de tiempo.



- **El efecto de B52 sobre la expresión y concentraciones de citocinas proinflamatorias FNTα e IL-8 fue temprano y se distanció del efecto inducido por las cepas de referencia**:

El comportamiento de la expresión relativa de los trascritos de estas dos citocinas proinflamatorias fue el siguiente. A las 48 hpi., FNTα aumentó su expresión de manera considerable (entre 13 y 19 veces) en las células infectadas con B52, independiente del tratamiento con PMA; este efecto se redujo a niveles de expresión similares al control a las 72 y 120 hpi. Interesantemente no se observó una elevación en la expresión relativa de FNTα por encima de 5 veces en las demás condiciones

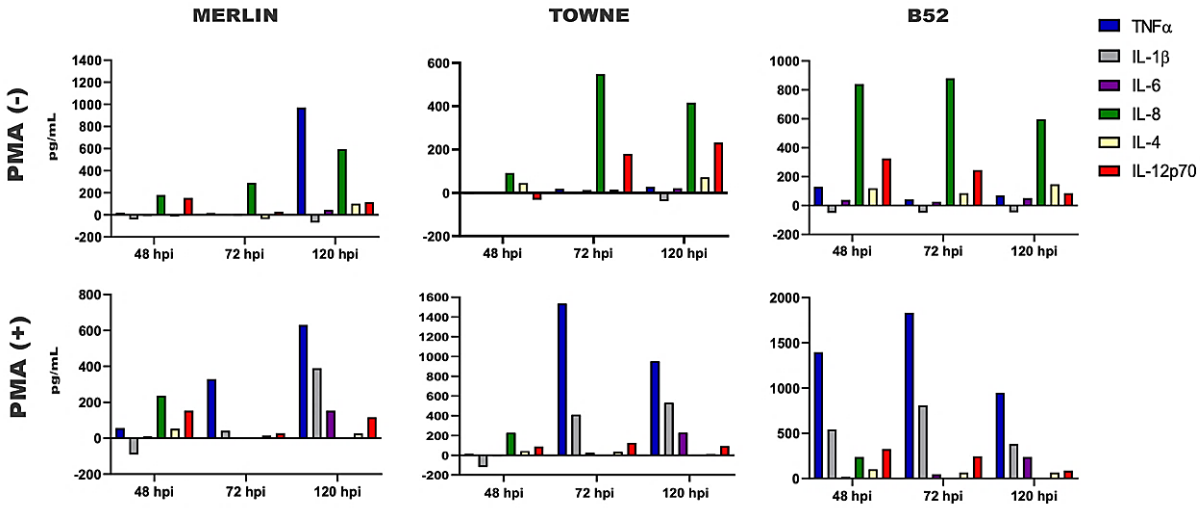
evaluadas; por ejemplo, las células infectadas con Towne y PMA (+) mostraron un ligero incremento sostenido, pero por debajo de 5, desde las 48 hpi., hasta las 120 hpi. (Figura 5.3.4.)
Desde las 48 hpi. el aislado B52 indujo un incremento de la concentración de FNTα en el sobrenadante, (Tabla 5.3.6.) efecto dependiente de la estimulación con PMA, llegando a 1445pg/mL, mientras que la infección con la cepa Merlin en presencia de PMA indujo un leve incremento llegando 104,8pg/mL. A las 72 hpi., se observó un notable aumento de la concentración de esta citocina proinflamatoria en las células PMA (+) inducida especialmente por la cepa Towne llegando a 1962pg/mL, mientras que en el sobrenadante de las células infectadas con B52 la concentración alcanzó valores de 2260pg/mL. A las 72 hpi., la concentración del FNTα aumentó en las células infectadas con Merlin y tratadas con PMA a 745 pg/mL, en las células infectadas con la cepa Towne llegó a 1962 y con B52 llegó a 2260 pg/mL La cepa Merlin mostró un aumento notorio del FNTα a las 120 hpi. en las células PMA (+), pero sin alcanzar los niveles inducidos por Towne (2263 pg/mL) o B52 en este mismo periodo de tiempo. (Figura 5.3.6.)

Tabla 5.3.6. Regulación de la expresión relativa y concentraciones de FNTα por la infección con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, respecto a las células no infectadas, en tres periodos de tiempo.

RT-qPCR= *fold change*		**LUMINEX pg/mL**	**Mock**		**U.V.**	**Merlin**		**Towne**		**B52**	
			PMA (-)	**PMA (+)**	**PMA (-)**	**PMA (-)**	**PMA (+)**	**PMA (-)**	**PMA (+)**	**PMA (-)**	**PMA (+)**
FNTα	**48 hpi.**	**RT-qPCR**	**1**	**2,5**	**0**	**3,62**	**1,23**	**1,9**	**3,35**	**13,94**	**19,86**
		LUMINEX	33,3	47,4	41,86	54,75	104,8	27,49	62,12	163,01	1445,3
	72 hpi.	**RT-qPCR**	**1**	**1,1**	**3,23**	**0,81**	**0,92**	**0,68**	**4,01**	**0,38**	**3,95**
		LUMINEX	26,59	425,29	39,6	45,2	745,7	45,5	1962,1	69,18	2260
	120 hpi.	**RT-qPCR**	**1**	**1,77**	**0,78**	**0,68**	**4,32**	**0,81**	**5,34**	**0,68**	**1,9**
		LUMINEX	43,56	1311,3	52,68	101,5	1942,67	70,8	2263,2	113,49	2260

La expresión relativa de la quimiocina proinflamatoria IL-8, se elevó en las células infectadas con B52 y tratadas (+) con PMA desde las 48 hpi., periodo en el que se encontró que esa expresión relativa fue 47 veces mayor respecto al control, hasta detectar un aumento de 118 veces a las 120 hpi. En las células infectadas con Merlin, el efecto fue evidente desde las 72 hpi., con un incremento de 33 veces hasta llegar a 115 veces a las 120 hpi. Towne por su parte indujo un incremento de 107 veces en la expresión relativa de IL8 a las 72 hpi., disminuyendo a 90 veces a las 120 hpi., respecto al control. Interesantemente la expresión de IL-8 en las células infectadas y no tratadas (-) con PMA no superó más de 10 veces su expresión, respecto al control (Figura 5.3.4.)

Figura 5.3.6. Regulación de las concentraciones de citocinas proinflamatorias, por la infección con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, respecto a las células no infectadas, en tres periodos de tiempo.



La concentración de IL-8 respecto al Mock (-), se incrementó desde las 48 hpi. por la infección con el aislado B52 y las cepas Merlin y Towne en las células PMA (+), llegando a 1050 pg/mL, nivel que se mantuvo a las 72 horas y 120 hpi.; este fue el mismo nivel que se detectó para las células Mock (+). Para las células PMA (-) B52 indujo siempre concentraciones elevadas, se encontró una regulación a la baja en las células infectadas con Towne. en las células infectadas con Merlin la concentración fue de 434,7 pg/mL y a las 120 hpi. llegó a 1050pg /mL. La concentración de IL-8 en las células infectadas con B52 y las cepas de referencia a las 120 hpi. fue 1050 pg/mL. (Figura 5.3.6. y Tabla 5.3.7.) El hallazgo de valores similares para distintas condiciones de infección y tratamiento se explica por haber alcanzado el nivel máximo de detección de la concentración de IL-8 con la técnica empleada.

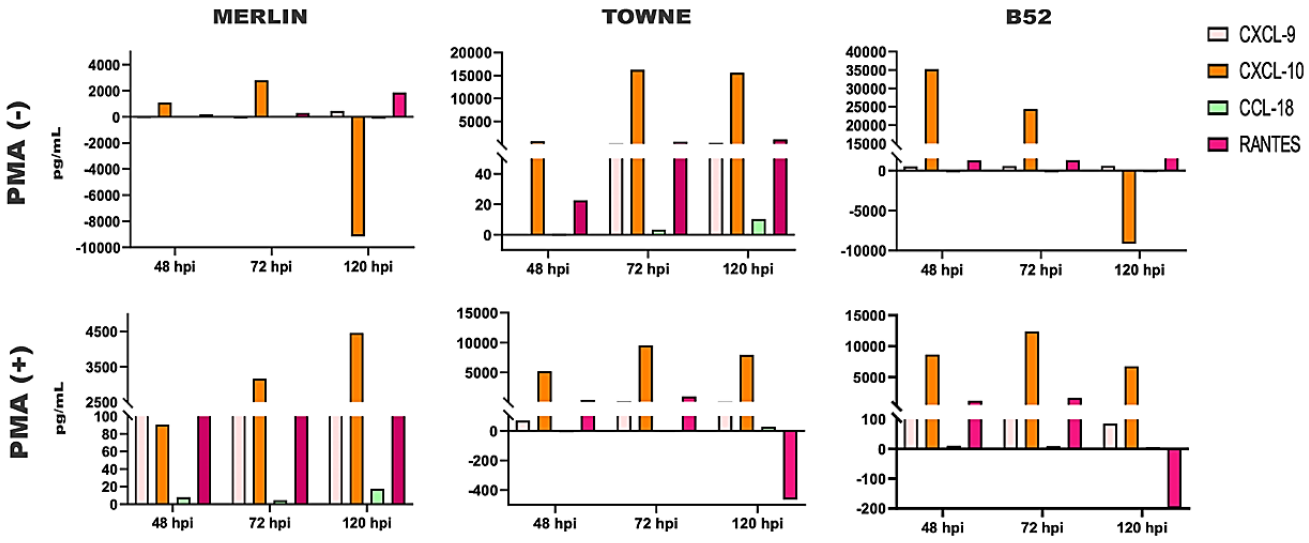
Tabla 5.3.7. Regulación de la expresión relativa y concentraciones de IL-8 por la infección con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, respecto a las células no infectadas, en tres periodos de tiempo.

RT-qPCR= *fold change*.		**LUMINEX pg/Ml**	**Mock**		**U.V.**	**Merlin**		**Towne**		**B52**	
			PMA (-)	**PMA (+)**	**PMA (-)**	**PMA (-)**	**PMA (+)**	**PMA (-)**	**PMA (+)**	**PMA (-)**	**PMA (+)**
IL-8	**48 hpi.**	**RT-qPCR**	**1**	**1,72**	**0**	**1,47**	**1,15**	**0,85**	**10,99**	**10,57**	**47,17**
		LUMINEX	210,64	813,25	715,32	390,86	1050	118,52	1040,89	1050	1050
	72 hpi.	**RT-qPCR**	**1**	**22,23**	**1,76**	**2,4**	**33,72**	**2,9**	**107,75**	**4,04**	**113,94**
		LUMINEX	145,26	1050	613,15	434,7	1050	693,05	1050	1024,97	1050
	120 hpi.	**RT-qPCR**	**1**	**8,02**	**2,89**	**1,54**	**115,11**	**1,27**	**90,07**	**2,28**	**118,7**
		LUMINEX	453,16	1050	384,6	1050	1050	869,13	1050	1050	1050

- **El aislado B52 elevó tempranamente la quimiocina CXCL-10:**

La expresión relativa de trascritos de CXCL-10 se aumentó de manera importante entre 25 y 30 veces a las 48 hpi., en las células infectadas con B52 e independiente de la presencia de PMA, con un efecto semejante en las células infectadas con la cepa Towne y PMA (+) y disminuyó a valores similares al control en otros periodos de tiempo evaluados. En las demás condiciones no se observaron diferencias respecto al control (Figura 5.3.4.). Las concentraciones de esta quimiocina proinflamatoria se elevaron a 35.349,8 pg/mL por efecto de la infección con B52 en células PMA (-) a las 48 hpi., disminuyendo a 24.385,5 pg/mL a las 72 hpi., pero con una reducción drástica a las 120 hpi., mientras que el Mock (-) fue en aumento hasta llegar a 9471,45 pg/mL a las 120 hpi. La cepa Towne por su parte indujo el aumento en la concentración de CXCL-10 hasta 25.077,4 pg/mL en células PMA (+) a las 120 hpi.; la concentración más alta de CXCL-10 estimulada por la cepa Merlin se encontró a las 120 hpi. en las células PMA (+), 4846,72 pg/mL. (Figura 5.3.7. y Tabla 5.3.8.)

Figura 5.3.7. Regulación de las concentraciones de quimiocinas proinflamatorias, por la infección con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, respecto a las células no infectadas, en tres periodos de tiempo.



- **B52 también moduló otras citoquinas proinflamatorias:**

Fue notorio que la expresión relativa de la IL-1β, se incrementó entre 75 y 85 veces en las células infectadas con B52 y tratadas con PMA entre las 48 y las 72 hpi. A las 120 hpi. el incremento fue relevante (hasta 560 veces), en las células infectadas con B52 y tratadas con PMA (+), llegando a ser de 360 veces en las células PMA (+) e infectadas con Merlin y 183 veces en las células tratadas con PMA e infectadas con Towne. (Figura 5.3.4.)

Tabla 5.3.8. Regulación de la expresión relativa y concentraciones de CXCL-10 por la infección con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, respecto a las células no infectadas, en tres periodos de tiempo.

RT-qPCR= *fold change*.		LUMINEX pg/mL	Mock		U.V.	Merlin		Towne		B52	
			PMA (-)	PMA (+)	PMA (-)	PMA (-)	PMA (+)	PMA (-)	PMA (+)	PMA (-)	PMA (+)
CXCL-10	48 hpi.	RT-qPCR	1	2,2	0	3,73	2,22	1,15	29,3	26,89	21,18
		LUMINEX	117,49	51	47,03	1215,08	956,6	764,6	5234,91	35349,8	8686,36
	72 hpi.	RT-qPCR	1	1,57	0,82	0,89	0,59	0,75	0,53	1	1,26
		LUMINEX	286,72	165,73	6069,57	3094,55	3330,07	16529,5	9696,37	24671,5	12561,9
	120 hpi.	RT-qPCR	1	1,07	0,59	1,79	1,52	1,53	3,64	1,07	0,85
		LUMINEX	9471,45	386,72	849,33	310	4846,72	25077,4	8336,09	310	7130,56

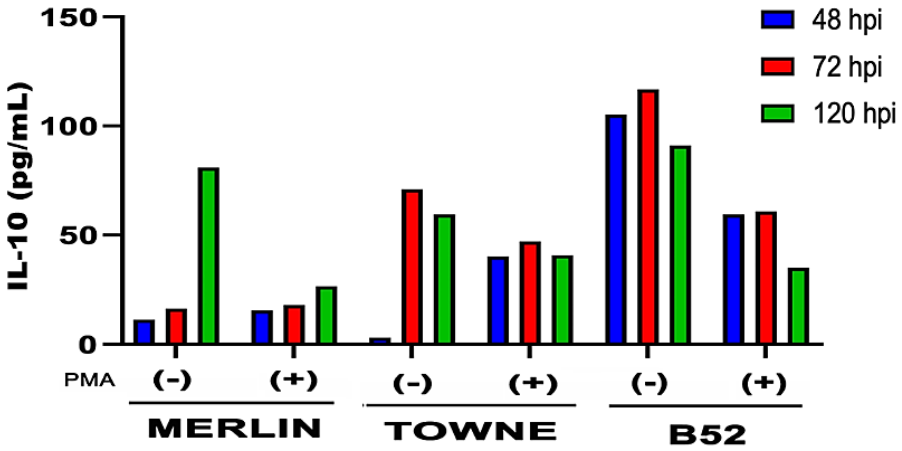
Respecto a las concentraciones de IL-1β en el sobrenadante, los resultados fueron divergentes entre el aislado B52 y las cepas de referencia, ya que a las 48 hpi. la cepa Merlin y la cepa Towne mostraron concentraciones por debajo del Mock (-) en las células PMA (+), mientras que el aislado indujo aumento en la concentración de IL-1β, llegando a 692pg/mL. Luego, a las 72 hpi., se encontró la concentración más alta para esta citocina en las células infectadas con B52 y PMA (+), llegando a 882,29 pg/mL. A las 120 hpi. las concentraciones en las células PMA (+) infectadas con Merlin y Towne se elevaron, mientras que en las infectadas con B52 la concentración disminuyó. (Figura 5.3.6. y Tabla 5.3.9.)

Tabla 5.3.9. Regulación de la expresión relativa y concentraciones de IL-1β por la infección con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, respecto a las células no infectadas, en tres periodos de tiempo.

RT-qPCR= *fold change*		LUMINEX pg/mL	Mock		U.V.	Merlin		Towne		B52	
			PMA (-)	PMA (+)	PMA (-)	PMA (-)	PMA (+)	PMA (-)	PMA (+)	PMA (-)	PMA (+)
IL-1β	48 hpi.	RT-qPCR	1	7,56	0	1,38	2,26774	1,43	4,05	7,43	78,81
		LUMINEX	150,31	150,31	150,31	110,18	60,25	150,31	31,44	99,68	692,19
	72 hpi.	RT-qPCR	1	30,65	7,9	1,12	22,7773	0,96	40,18	0,78	83,4
		LUMINEX	150,31	73,89	150,31	150,31	116,16	150,31	483,48	100,36	882,29
	120 hpi.	RT-qPCR	1	102,1	1,17	2,13	360,62	5,68	183,21	3,99	566,27
		LUMINEX	150,31	207,21	150,31	80,98	596,47	112,12	738,98	103,76	588,03

- **La expresión del transcrito de la IL-10 y su concentración fueron reguladas diferencialmente por el aislado B52, en los periodos tempranos de infección, independiente del tratamiento con PMA:**

Figura 5.3.8. Regulación de las concentraciones de IL-10, por la infección con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, respecto a las células no infectadas, en tres periodos de tiempo.



La expresión relativa del gen de la citocina inmunosupresora IL-10 mostró a las 48 hpi. un incrementó entre 11 y 20 veces respecto al control en las células infectadas con B52 con y sin el tratamiento con PMA. La cepa Towne también indujo en este mismo tiempo la sobreregulación de la citoquina en 10 veces en células tratadas con PMA (+). Por su parte la expresión relativa de IL-10 disminuyó en los periodos posteriores (72 y 120 hpi.), y esta se mantuvo en todas condiciones evaluadas con valores de expresión de 6 veces respecto al control (Figura 5.3.4)

Finalmente, la concentración de la IL-10 en el sobrenadante de las células THP-1 infectadas con B52 estuvo por encima de los niveles alcanzados en las células infectadas con las cepas de referencia, independiente del virus, tratamiento con PMA y tiempos evaluados. (Figura 5.3.8.)
De este modo, se observó que la concentración a las 48 hpi. fue de 110,97 pg/mL y alcanzó su nivel más alto a las 120 hpi. (155pg/mL). En las células no infectadas tratadas o no con PMA, las concentraciones se elevaron desde las 48 hasta las 120 hpi. llegando a 64pg/mL en las células Mock (-). (Figura 5.3.8. y Tabla 5.3.10.)

Tabla 5.3.10. Regulación de la expresión relativa y concentraciones de IL-10 por la infección con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, respecto a las células no infectadas, en tres periodos de tiempo.

RT-qPCR= *fold change*.		LUMINEX pg/mL	Mock		U.V.	Merlin		Towne		B52	
			PMA (-)	PMA (+)	PMA (-)	PMA (-)	PMA (+)	PMA (-)	PMA (+)	PMA (-)	PMA (+)
IL-10	48 hpi.	RT-qPCR	1	1,62	0	4,67	2,06	2,82	9,34	19,32	11,96
		LUMINEX	5,74	7,27	5,74	16,91	22,86	8,8	47,4	110,97	66,73
	72 hpi.	RT-qPCR	1	0,81	0,66	2,29	0,88	5,33	3,99	4,52	1,56
		LUMINEX	16,22	24,36	49,77	32,49	42,28	87,18	71,4	132,95	85,2
	120 hpi.	RT-qPCR	1	0,99	1,8	5,52	1,9	3	4,1	3,37	1,14
		LUMINEX	64,48	27,68	13,57	145,43	54,28	123,92	68,51	155,53	62,68

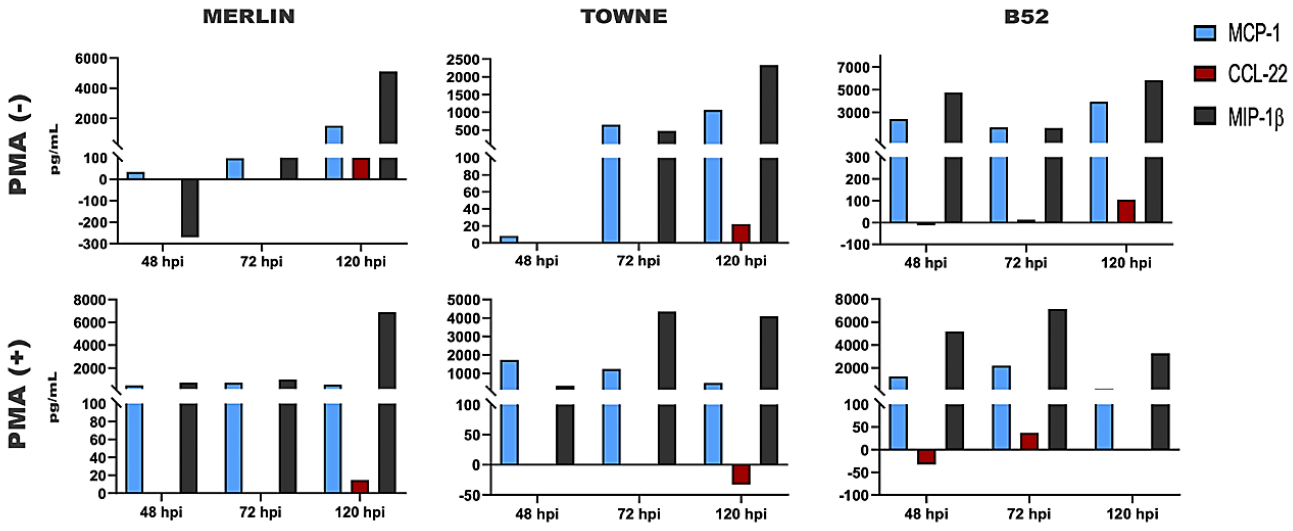
- **Concentraciones de quimiocinas y factores de activación y movilización celular CXCL-9, RANTES, MCP-1, CCL-22 y MIP-1β, en los sobrenadantes de las células THP-1:**

En cuanto a estas quimiocinas, las concentraciones de RANTES en células expuestas al Mock PMA (-) y PMA (+) fueron aumentado desde las 48 hasta las 120 hpi; el comportamiento en las células infectadas con Merlin fue semejante y lo mismo en las células infectadas con B52 y Towne en las células PMA (-). Ya en las células infectadas con Towne y B52 tratadas con PMA y a las 120 hpi. la concentración de RANTES cayó a niveles por debajo de los encontrados para las células Mock (+). En general se observó incremento de las concentraciones de MIP-1β y MCP-1 en las distintas condiciones de infección, respecto al Mock (-), excepto en las células infectadas con Merlin, sin tratamiento con PMA a las 48 hpi. en las que la concentración de MIP-1β estuvo por debajo de la encontrada para las células Mock (-) (Figura 5.3.7. y Figura 5.3.9.)

- **Efecto diferencial del aislado clínico B52 en células THP-1 sobre la concentración de factores de crecimiento, en relación con las cepas de referencia:**

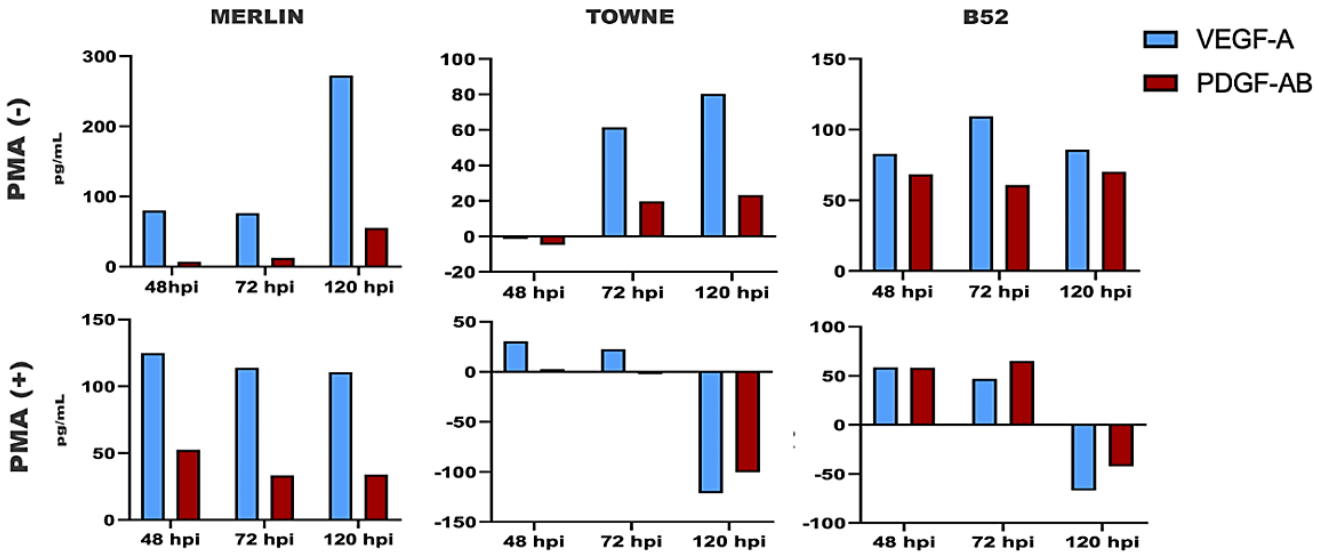
B52 incrementó las concentraciones de los factores de crecimiento evaluados (VEGF-A y PDGF-AB). Para el VEGF-A la concentración fue 126,35 pg/mL a las 48 hpi y 236,82 pg/mL a las 120 hpi., en las células no tratadas con PMA; por el contrario, en las células tratadas con PMA, a las 120 hpi el efecto fue de regulación a la baja. La cepa Towne a las 120 hpi indujo un aumento en las concentraciones de los factores de crecimiento en los sobrenadantes, sobre todo para el VEGF-A.

Figura 5.3.9. Regulación de las concentraciones de factores de activación y movilización, por la infección con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, respecto a las células no infectadas, en tres periodos de tiempo.



Por su parte la cepa Merlin y en células PMA (+) indujo un aumento en las concentraciones de los factores principalmente para el VEGF-A, en todos los periodos de tiempo; mientras que en las células PMA (-) se observó un incremento de la concentración de este factor a las 120 hpi. Para el PDGF-AB en células infectadas con B52 el comportamiento fue semejante. (Figura 5.3.10.)

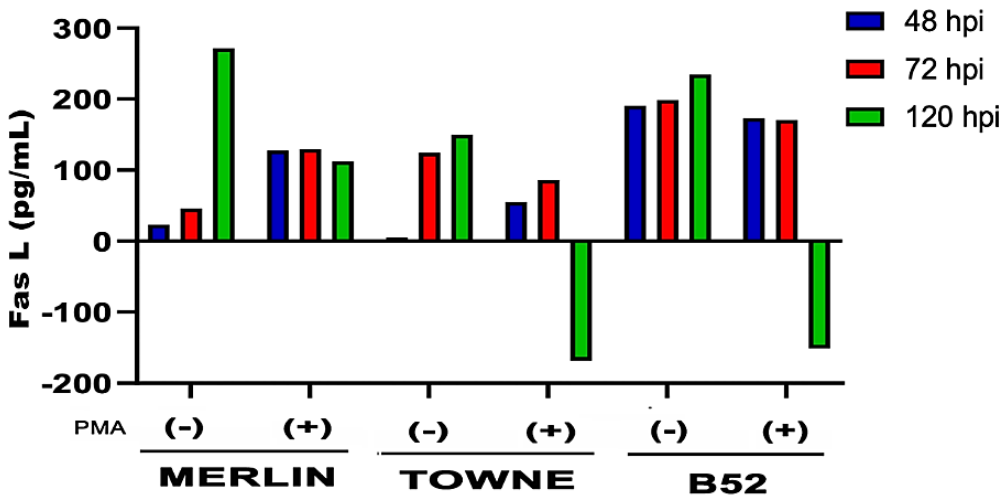
Figura 5.3.10. Regulación de las concentraciones de factores de crecimiento, por la infección con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, respecto a las células no infectadas, en tres periodos de tiempo.



- **El aislado clínico B52 eleva las concentraciones de Fas-L a las 48 hpi., en células THP-1:**

Desde las 48 hpi., B52 indujo elevación de la concentración de Fas-L, por encima de los niveles observados en las células infectadas con las cepas de referencia, independientemente del tratamiento con PMA.
En este tiempo, la concentración de Fas-L en células PMA (-) fue 247,51 pg/mL y a las 120 hpi., 384 pg/mL. Ya en las células PMA (-) infectadas con Merlin a las 120 hpi., la concentración fue 420,84 y en células PMA (+) 456,05 pg/mL. En las células infectadas con B52 y PMA (+) se observó una regulación a la baja, igual a la inducida por la cepa Towne. (Figura 5.3.11.)

Figura 5.3.11. Regulación de las concentraciones de Fas-L, por la infección con el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, respecto a las células no infectadas, en tres periodos de tiempo.



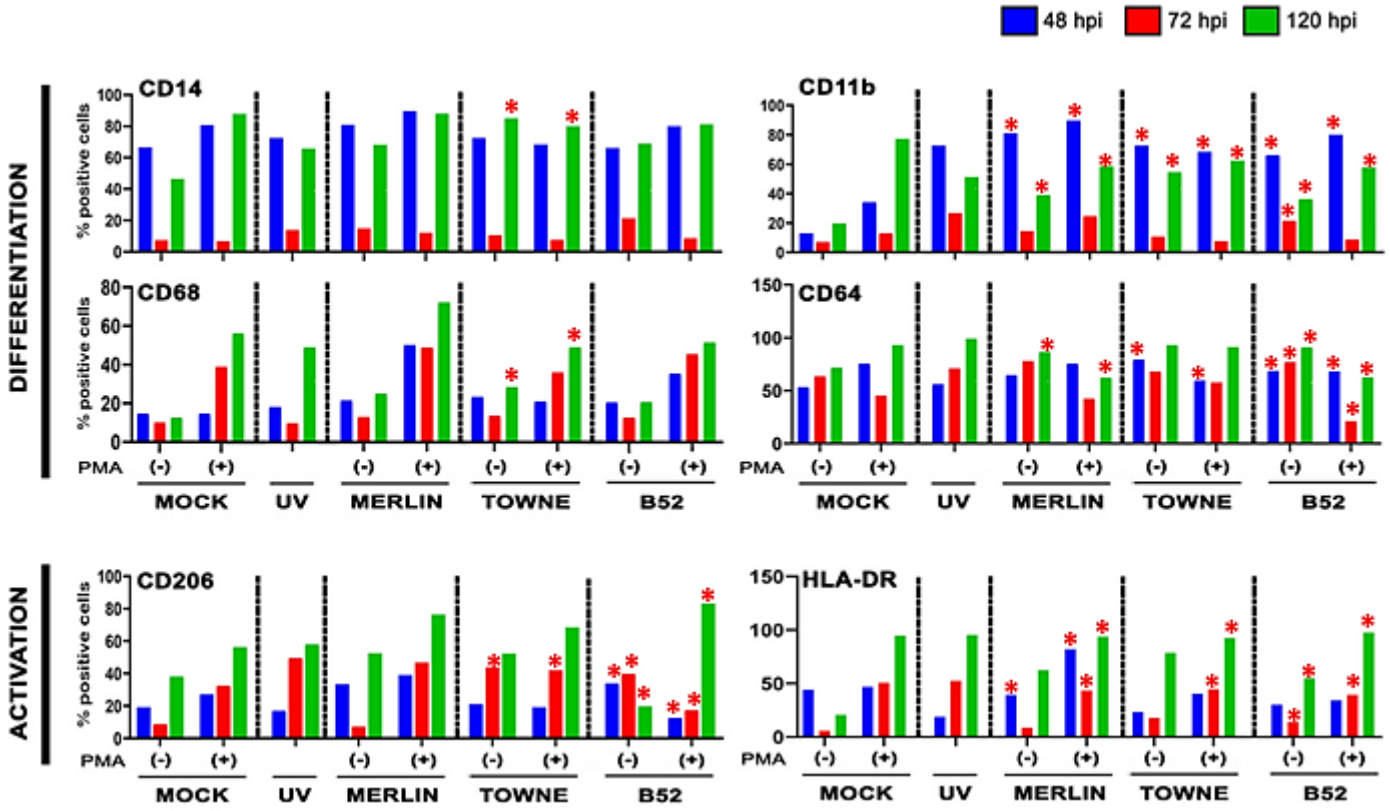
- **La infección por el aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne indujo la expresión de marcadores de diferenciación al fenotipo de macrófago inflamatorio:**

Sin importar la cepa o aislado con el que se hizo la infección, se observó un incremento de las células positivas para los marcadores CD14, CD11b, CD68 y CD64, con algunas diferencias entre las células tratadas o no con PMA. En general, se evidenció la elevación de la expresión de los cuatro marcadores a las 48 hpi, su reducción a las 72 hpi., y un aumento de nuevo de su expresión a las 120 hpi.

Para el análisis estadístico Chi2, se tomó el resultado del porcentaje de positividad para las células sin infección y sin tratamiento con PMA (Mock -), en cada periodo de tiempo; en este análisis se resaltan las diferencias significativas, en los

porcentajes de células positivas para CD14 asociados a la infección con la cepa Towne a las 120 hpi., tanto en las células tratadas y no tratadas con PMA. El marcador CD11b presentó diferencias en el porcentaje de células positivas a las 48 hpi y 120 hpi, en todas las condiciones de infección y en las células con o sin tratamiento con PMA; también se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD11b a las 72 hpi., respecto a las células Mock (-) positivas que fueron el 6.9%; mientras que en las células infectadas con B52, 21.4 en células PMA (-) Vs. 8.7% en células PMA (+). (Figura 5.3.12.)

Figura 5.3.12. Expresión de marcadores de superficie para diferenciación celular CD14, CD11b, CD68 y CD64 y marcadores de activación celular CD206 y HLA-DR, evaluados por citometría de flujo, en células THP-1 infectadas con el aislado clínico B52, las cepas de referencia Merlin y Towne, en tres periodos de tiempo. Las diferencias estadísticamente significativas se señalan con el asterisco *



En cuanto a la expresión superficial del marcador CD68, las diferencias estadísticamente significativas en la proporción de células positivas se observaron en las células infectadas con la cepa Towne, 27.4% sin PMA y el 47.3% de las células PMA (+) fueron positivas a las 120 hpi. mientras que las células Mock (-) positivas para CD68 fueron el 12.5%.

La expresión de CD64 se aumentó durante la infección con B52 en todos los tiempos e independientemente del tratamiento con PMA. Por su parte, en las células infectadas con Towne, estas diferencias se observaron a las 48 hpi., y con Merlin las diferencias estadísticamente significativas se observaron a las 120 hpi. (figura 5.3.12.)

Se concluye que la infección viral indujo la expresión de estos marcadores de superficie, que indican la diferenciación de las células monocíticas a un fenotipo de macrófago predominantemente M1, proinflamatorio, desde las 48 hpi., sin diferencias importantes entre el aislado clínico y las cepas de referencia. (Figura 5.3.12.)

- **El aislado clínico B52 indujo un efecto diferencial en la expresión de marcadores de activación CD206 y HLA-DR, respecto a las cepas Merlin y Towne.**

El marcador CD206 mostró diferencias significativas durante la infección con el aislado B52, independiente del tratamiento con PMA y tiempo postinfección respecto a las células tratadas con el Mock y PMA (-); estas diferencias fueron mayores a las 48 y 72 hpi., en células PMA (-). Lo opuesto se observó en las células PMA (+), las cuales presentaron un aumento significativo a las 120 hpi. La infección con Towne indujo un aumento de la expresión de CD206 a las 72 hpi., con diferencias significativas respecto al control, en células tratadas y sin tratamiento con PMA. Por su parte, las células infectadas con Merlin mostraron un patrón de expresión similar a las células sin infectar (Mock -). (Figura 5.3.12.)

HLA-DR disminuyó su expresión a las 48 hpi con el aislado B52 o con Towne, respecto al control; interesantemente a las 72 hpi., el nivel de expresión del marcador fue más bajo incluso en las células expuestas al Mock. En las células PMA (+) e infectadas con B52 o Towne se observó un incremento de la expresión de HLA-DR desde las 48 hasta las 120 hpi.; con diferencias estadísticamente significativas. La cepa Merlin indujo un patrón de expresión de HLA-DR algo diferente en las células PMA (+), ya que indujo su disminución a las 72 hpi., y su elevación a las 120 hpi. (Figura 5.3.12.)

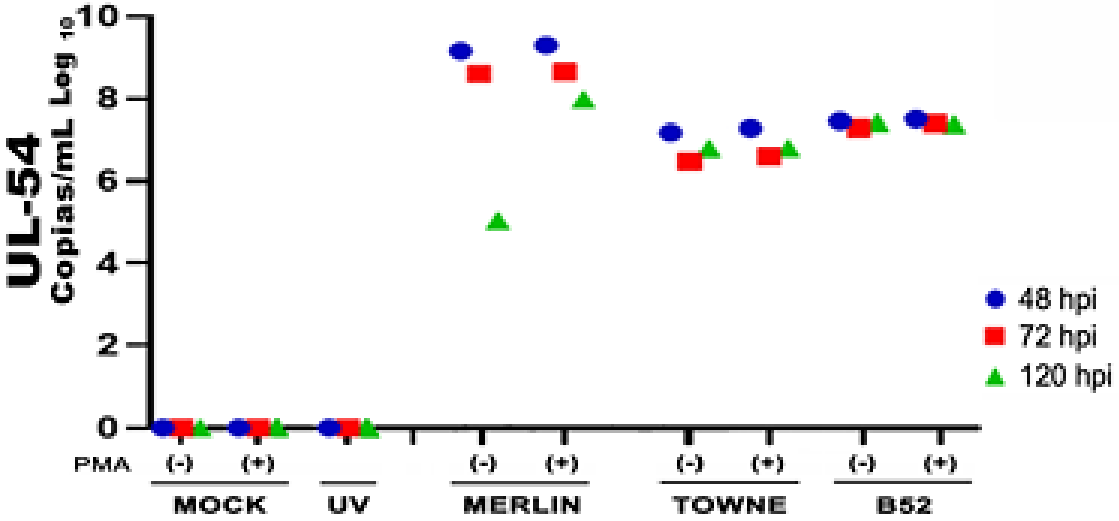
Finalmente podemos decir que el aislado B52 indujo la expresión temprana de CD206, en células PMA (-), sin embargo, este marcador se aumentó en más del 80% de positividad en las células expuestas a PMA (+) a las 120 hpi. La expresión de HLA-DR tuvo un comportamiento con claras diferencias entre las condiciones de infección, pero que evidentemente alcanzó los más altos niveles a las 120 hpi. en las células PMA (+). (Figura 5.3.12.)

- **En los sobrenadantes de las células infectadas con la cepa Merlin o Towne se encontraron los valores más altos al cuantificar el gen UL54 o las partículas virales:**

El número de copias de UL54, el gen que codifica para la ADN polimerasa de HCMV, se observó constante en cada uno de los virus evaluados, tiempos posinfección e independiente del tratamiento con PMA. Sin embargo, los niveles de DNA viral más altos se detectaron a las 48 hpi. Por ejemplo, en las células PMA (+) la infección con la cepa Merlin presentaron valores de expresión de $3x10^{9,}$ mientras que las células infectadas con Towne presentaron valores de expresión de $2x10^{7}$. Interesantemente B52 alcanzó valores de $3{,}3x10^{7}$. (Figura 5.3.13.)

Por otra parte, al evaluar la producción y capacidad infecciosa de B52, Towne y Merlin a partir de los sobrenadantes de las células THP-1, se encontró que las dos cepas de referencia produjeron niveles similares de virus con títulos infectantes de $2.2x10^{6}$ UFP/mL, mientras que B52 produjo un título de $3.2X10^{5}$ UFP/mL. La detección de partículas infecciosas en los sobrenadantes de las células THP-1, confirma los resultados obtenidos en la cuantificación absoluta de copias por mL, para las cepas de referencia; por su parte, el aislado B52 con un título inferior, indica una menor capacidad replicativa en las células THP-1, independiente del tratamiento con PMA.

Figura 5.3.13. Cuantificación del número de copias del gen UL-54 de HCMV, por PCR en tiempo real, luego de la infección de células THP-1, por el aislado B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, en tres periodos de tiempo.



5.3.4. DISCUSIÓN

Luego de evaluar *in vitro* la actividad del aislado clínico B52 y las cepas de referencia Merlin y Towne, nuestro modelo mostró las marcadas diferencias del efecto que estos tres virus indujeron sobre las células THP-1 en términos de la infección, replicación y regulación en la expresión y secreción de algunos marcadores y mediadores inflamatorios.

Retomando el concepto de cuellos de botella a los que se puede ver sometido el Citomegalovirus humano durante la infección *in vivo*, fue posible constatar las diferencias en el comportamiento de un virus que pasa rápidamente (dos pasajes) de los fibroblastos a otro tipo celular, las THP-1, mientras que las cepas de laboratorio han permanecido básicamente en las células fibroblásticas.

Aunque los tres virus infectaron las células y se inició el ciclo replicativo, se encontró que la modulación de la respuesta inmune en las células THP-1, no siempre se relacionó con la capacidad replicativa y liberación de virus infeccioso. Al respecto se encontró que el aislado clínico B52 produjo a las 48 hpi. cantidades bajas de virus infeccioso, sugiriendo una menor capacidad replicativa, comparado con lo observado con Towne y con la cepa Merlin, lo que sugiere que la alta producción viral puede estar relacionada con los cambios genómicos durante los pasajes en cultivo; por otro lado, el comportamiento descrito del aislado B52 refleja el de las denominadas cepas salvajes, el virus permanece asociado a las células. (12,13,14)

Parte de estas diferencias se deben a que las cepas altamente pasajeadas como Towne, AD169 y TB40/E sufren modificaciones genéticas consistentes con las bajas presiones de selección que tienen estos virus cada vez que son cosechados en un tipo de células como los fibroblastos que son altamente permisivas; esto provoca una regulación transcripcional o la pérdida de secuencias genómicas que pueden ser determinantes en el tropismo viral (RL13, locus UL128 y la región UL/b´) y probablemente en otros aspectos del ciclo biológico del virus, que aún no han sido determinados. Algunas estrategias técnicas para controlar esto, han llevado a la construcción de cromosomas bacterianos artificiales (BACs); algunos usan como base el genoma de la cepa Merlin que ha sido poco pasajeada, pero en la que se han determinado ya en pasajes muy tempranos, modificaciones como la sustitución de un nucleótido que trunca el gen UL128, (12) por lo que se puede concluir que aún los BACs no logran reparar completamente el genoma viral.

El uso de cepas de laboratorio o de los cromosomas bacterianos, es debida a las dificultades en la obtención de aislados clínicos que son dispendiosos y costosos de obtener por las características de HCMV en cultivo: el ciclo replicativo es lento, permanece asociado a las células y el número de partículas virales recuperadas en el sobrenadante es bajo. Continúa siendo necesario estudiar y comparar el efecto que tienen las cepas frente al virus salvaje con el ánimo de comprender mejor en los modelos *in vitro* la infección y patogenia causada por el HCMV para extrapolarlos o explicar con más fiabilidad las consecuencias de la infección en los pacientes. Es por ello por lo que el estudio de la capacidad patogénica del HCMV debe ser cuidadoso y debe tenerse en cuanta qué cepa(s) ha(n) sido empleada(s) como AD169 o Towne al evaluar e intentar extrapolar resultados de investigaciones sobre el efecto de la infección de HCMV *in vitro*. (12,15,16)

Hasta la fecha, aunque a las modificaciones genotípicas de las cepas de HCMV se les atribuye los efectos en el tropismo y capacidad replicativa, no es muy claro si estas modificaciones en el genoma también afectan algunos genes que pueden estar involucrados en la actividad inmunomoduladora del virus. Esta situación nos llevó a obtener un aislado clínico -denominado B52-, y comparar el efecto en la actividad inmunomoduladora de este virus frente a la respuesta inducida por dos cepas de referencia, como un medio para lograr una mayor aproximación al efecto de la infección de HCMV en células monocíticas.

- **Confirmación de la Infección y de la ocurrencia del ciclo replicativo en las células THP-1:**

En su mayoría las células no infectadas (expuestas al Mock) independientemente del tratamiento con PMA mantuvieron la morfología redondeada y formaron clústeres, lo que descarta la diferenciación de las células al fenotipo de macrófago por condiciones del cultivo.
En los ensayos de infección con los diferentes virus con o sin tratamiento con PMA, encontramos la proteína viral IE1/2 en el núcleo de las células THP-1 desde las 48 hpi., con una marcación puntiforme similar a lo descrito en la infección en células MRC-5 desde las 2 hpi. (17), o con un patrón difuso en el núcleo, indicando posiblemente la disrupción y reorganización de los cuerpos nucleares como parte del ciclo lítico viral como también se ha visto en las células MRC-5. (17)
IE1/2 es codificada en los ORFs UL123 y UL122, su transcripción es controlada por el producto del gen MIEP (*Major Immediate Early Promoter*), y es considerada fundamental en el inicio del ciclo replicativo viral, (18,19,20,21), y al parecer la presencia de IE1/2 en monocitos puede verse influenciada por la cepa viral y la MOI utilizada como lo sugieren Noriega y cols. 2014 (22), quienes no detectaron la proteína en monocitos de sangre periférica infectados con TB40/E a una MOI de 3, entre las 24 hpi. y los 6 dpi. Los trascritos de IE1/2 y la proteína han sido demostrados en células THP-1 infectadas con la cepa TB40/E, a las 24 hpi., pero sin completar la replicación viral (21); y en monocitos CD14+ infectados con la cepa Fix en un modelo de latencia a largo plazo en el que se detectaron los trascritos de UL122, UL123 y UL54 desde las 24 hpi., con una disminución gradual hasta llegar a ser indetectables al 10 dpi. (23) Estos resultados aparentemente discrepantes, hablan de las diferencias en el comportamiento de las cepas virales, de la posible influencia de la MOI en los resultados y que, aunque la proteína no sea detectada es posible que la transcripción de los genes inmediatamente tempranos se mantenga más allá de las 24 hpi.
En nuestro modelo, detectamos la proteína IE1/2 desde las 48 hasta las 120 hpi en las células infectadas con B52 con una morfología compatible con la de los macrófagos, lo cual es un indicador de la capacidad del virus de inducir no solo su replicación en estas células si no su diferenciación, sin la influencia del PMA.

Adicionalmente, reportamos la capacidad replicativa y de producción de progenie viral del aislado y de las cepas de referencia en las células THP-1 a las 48 hpi., al detectar el gen Temprano (E), UL54 que codifica para la ADN polimerasa viral y

títulos virales diferentes medidos por $TCID_{50,}$ contrario a lo reportado por Collins-McMillen (21) quienes resaltan que solo detectaron partículas virales hasta después del tratamiento con PMA, lo que también se observó en un modelo de latencia a largo plazo en monocitos CD14+. (23)
Es evidente que el modelo propuesto, permitió el ciclo replicativo viral completo de B52 y de las cepas Merlin y Towne, pero la detección de IE1/2 en todos los periodos de tiempo parece sugerir el inicio del ciclo replicativo en distintos momentos ya que no todas las células eran positivas.
Sin embargo, las células infectadas con la cepa Merlin, además de presentar positividad para IE1/2 en todos los periodos de tiempo evaluados, presentaron altos los valores de copias de UL54 y títulos virales a las 48 hpi., sin inducir cambios morfológicos notorios respecto a los estimulados por B52 y Towne; estos resultados sugieren diferencias en la inducción de la diferenciación al fenotipo de macrófago entre las cepas y en la capacidad de regular negativamente el ciclo replicativo, de acuerdo con el número de pasajes en cultivo celular. Es posible que estas variaciones se deban a la des-represión de MIEP por estímulos inflamatorios activados por la vía del NF-ƙB, o que algunos transactivadores del ciclo lítico como iP1 e iP2, indujeran la iniciación de toda la actividad replicativa, evidenciada por la detección de IE1/2, entre otros, que como se ha visto en células monocíticas sucede por efecto de la infección con HCMV. (21,24,25) Sin embargo, algunos de estos eventos no los podemos confirmar ni descartar en nuestro modelo.

- **El aislado clínico B52 presentó efectos diferenciados sobre la expresión de genes de citocinas y mediadores solubles, respecto a las cepas de laboratorio Merlin y Towne, con un efecto proinflamatorio, al tiempo que incrementa la IL-10 celular:**

Las infecciones virales son prontamente reconocidas por los distintos Receptores de Reconocimiento de Patrones, activando vías asociadas a STING y NF-ƙB entre otras; las cuales llevan a la producción de citocinas como IL-6 e IL-8 y los Interferones α y β, generando un estado antiviral. Evolutivamente, los virus han generado mecanismos para contrarrestar esa respuesta, y en particular HCMV ha desarrollado una amplia gama de mecanismos reguladores negativos. (Figura 3.1.).
Al evaluar en nuestro modelo la expresión de genes de Interferones y otras citocinas proinflamatorias fue evidente un efecto diferencial inducido por el aislado B52 frente a las dos cepas de referencia. B52 incrementó la expresión del transcrito para IFNα desde las 48 hpi., por encima del efecto causado por Merlin y Towne y ejerció un efecto temprano, independiente de PMA.
Yew y colaboradores (26) previamente demostraron un incremento en la expresión de IFN α y β en células THP-1 infectadas con la cepa Toledo -que se considera de bajo número de pasajes-, y Paijo y cols, (27) obtuvieron el mismo efecto, utilizando la cepa TB40/E, y demostrando que esta estimulación ocurrió por vías diferentes a las del NF-ƙB. Esto sugiere que el efecto de HCMV sobre la expresión de genes de citocinas -al parecer- depende del tipo celular y cepa empleada. Es probable que en las THP-1, como se ha descrito en fibroblastos humanos de prepucio, las proteínas

pp65 y UL31 de HCMV inhiban las vías de señalización IRF3 y STING y disminuyan la expresión del gen de IFNβ, (28,29) pero si las proteínas virales no afectan la vía mediada por NF-ƙB, se mantiene una expresión constante pero baja del IFNβ. (Las vías de señalización se pueden apreciar en la Figura 3.1.)

En cuanto a la proteína liberada, las concentraciones de IFNα fueron un reflejo de la transcripción, encontrando una elevación de la proteína en las células infectadas; en algunos casos se encontró que este aumento fue independiente de PMA y en otros casos fue aditivo al PMA. El efecto de B52 ocurrió más tempranamente, contrario a las cepas de referencia, principalmente Towne, en las que el incremento fue gradual hacia las 120 hpi. Un efecto semejante se describió luego de la infección de monocitos de sangre periférica con la cepa TB40/E a una MOI de 3; en este caso la concentración del IFNα fue en aumento desde las 24 hpi. hasta los 6 dpi. (22) Por lo tanto, parece que la vía por la que se estimula el efecto descrito sobre la expresión de los Interferones, como el momento y la intensidad de esta expresión, pueden depender de la cepa viral y la MOI empleada.

Interesantemente tanto el aislado como las cepas de referencia, indujeron de manera similar la expresión del transcrito para IFNβ, pero esto no incrementó la citocina en el sobrenadante; por el contrario, se observó una regulación a la baja temprana o tardía, sugiriendo que la infección indujo retención o destrucción intracelular de la proteína. Las consecuencias de esta regulación sobre el IFNβ podrían observarse en la respuesta de estas mismas células o las células en la proximidad a estímulos inflamatorios, dado que al parecer la infección con HCMV disminuye la activación dependiente de esta citocina. (30,31)

El aislado B52 estimuló notoriamente la expresión del gen del FNTα a las 48 hpi., respecto a las células expuestas al Mock, o las células infectadas con las cepas de referencia, en presencia o ausencia de PMA. Esta estimulación al parecer permitió mantener concentraciones de FNTα elevadas en el sobrenadante hasta las 120 hpi. y PMA (+). Al comparar esta cinética del FNTα con el efecto de la infección con la cepa de laboratorio TB40/E en monocitos CD14+ se observa un incremento gradual de las concentraciones extracelulares desde las 24 hpi., hasta el 6 dpi. (22) Estos resultados indican un efecto proinflamatorio temprano, diferenciado, de un virus aislado de un fluido y con sólo dos pasajes en cultivo celular, al compararlo con las cepas de referencia.

Por su parte, la expresión del transcrito para IL-1β en las células THP-1 infectadas, pareció ser dependiente del estímulo con PMA y fue mayor a las 120 hpi., siendo de nuevo el aislado B52 el que indujo el mayor efecto; sin embargo, la proteína se detectó elevada en los sobrenadantes desde las 48 hpi. Nuestros resultados difieren respecto a lo reportado previamente en modelos de infección con la cepa AD169 en células THP-1 y tratadas con PMA, donde se estableció la degradación del inflamasoma y la subsecuente disminución del clivaje de los precursores para caspasa 1 e IL-1β debido a la interacción de la proteína viral pp65 (gen UL83) con la proteína celular AIM2 (32) También se ha reportado que el producto del gen IE86 regula la transcripción del gen de la IL-1β e induce la degradación del precursor, (33), aparentemente llevando a la disminución de esta citocina proinflamatoria en los sobrenadantes. Este efecto podría explicarse porque B52 ejerce su efecto por vías diferentes a las citadas para las cepas de referencia, pero no podemos afirmarlo en las condiciones en la que obtuvimos este resultado; pareció ocurrir una

recuperación de la transcripción del gen de la IL-1β en periodos avanzados de la infección.
B52 también indujo la expresión de la IL-8 desde las 48 hpi.; sin embargo, en los sobrenadantes los niveles más altos de esta citocina se detectaron en las células no tratadas con PMA. Atribuimos este efecto a que el HCMV activa las vías de señalización como la del NF-ƙB, que promueven la transcripción del gen de la IL-8, pero, proteínas virales como pp65 y UL83 pueden inhibir esta vía posteriormente (Figura 3.1.), afectando la transcripción del gen de esta citocina. Estos resultados sugieren que hay una producción basal en los monocitos no diferenciados, que mantiene la liberación de IL-8, pero parece claro que B52 incrementa la liberación de la IL-8 en mayor nivel que las cepas de referencia.
Sobre las quimiocinas proinflamatorias B52 indujo un aumento en la transcripción del gen y sobre las concentraciones de CXCL-10, independientemente del efecto de PMA a las 48 hpi. y disminuyó en los tiempos posteriores, sin embargo, las concentraciones de la quimiocina se mantuvieron elevadas en el sobrenadante. Previamente se reportó que en monocitos CD14+ infectados con la cepa TB40/E, la concentración de esta quimiocina se fue elevando desde el primer día hasta 6 dpi. (22)
En general, la infección con el aislado y las cepas de referencia indujo aumento de las concentraciones de los factores de activación y movilización MCP-1 y MIP-1β, lo que sugiere que las células THP-1 fueron activadas por la infección como por el inductor de diferenciación PMA y produjeron de manera constante estas quimiocinas con el fin de atraer nuevas células leucocitarias como linfocitos T, linfocitos *Natural Killer* (NK) y monocitos al foco de infección viral; también pueden contribuir en la activación de las células endoteliales. Por lo tanto, al aumentar las concentraciones de estas quimiocinas, HCMV puede promover o intensificar el estado proinflamatorio asociado a la infección y también la posibilidad de infectar nuevas células, contribuyendo de este modo en la patogenia de la infección en pacientes como los receptores de trasplante renal. (34)
Por otra parte, en nuestro modelo encontramos diferencias claras respecto al efecto de las cepas con bajos pasajes incluido el aislado B52 frente a Towne. La cepa Merlin incrementó solamente las concentraciones de VEGF-A desde las 48 hpi., mientras que B52 indujo un aumento tanto de VEGF-A y PDGF-AB desde las 48 hpi., independientemente del tratamiento con PMA con algunas variaciones en el tiempo. Esto demuestra el efecto diferencial de las cepas de bajo o alto número de pasajes frente al aislado clínico B52. Estos factores de crecimiento producidos por las células THP-1, pueden asociarse al fenotipo de Macrófago M2, específicamente M2d. (35), el cual se relaciona con actividades antiinflamatorias y que promueven la reparación tisular, con producción de IL-10, IL-12 y Factor de Crecimiento Transformante beta (FCT-β). (35) Lo que sugiere nuevamente que el número de pasajes en cultivo celular del virus empleado influencia el resultado de la infección de las células monocíticas.
Finalmente, sobre la cIL-10 en las células infectadas con el aislado B52, tanto la expresión del gen como la concentración de esta en el sobrenadante se incrementaron notablemente desde las 48 hpi., principalmente en ausencia del PMA con una asociación entre la expresión del gen y la concentración a través del tiempo. IL-10 es una citocina inmunosupresora e inmunoreguladora, reconocida por suprimir

la producción de IFNγ e IL-2 en linfocitos T *helper* 1 y disminuir la capacidad de presentación antigénica en macrófagos y células dendríticas. Como se dijo anteriormente, su producción se asocia con un perfil de macrófago M2. (35,36) Sin embargo, en nuestro modelo la producción de cIL-10 al tiempo con citocinas y proteínas proinflamatorias parece contradictoria, lo que nos lleva a proponer que HCMV regula la activación inmunológica principalmente contra las células infectadas al tiempo que está activando y movilizando nuevas células al sitio de la infección. De otra parte, el efecto no solamente sería contra la infección viral sino contra otros patógenos, lo que puede resultar en infecciones diseminadas sobre todo en pacientes con supresión inmunológica. (37)

Una visión panorámica al efecto inflamatorio entre B52 y las cepas de referencia, muestra como el aislado tiene un efecto proinflamatorio temprano, no dependiente del tratamiento con PMA y que es distinto del que se reporta para monocitos CD14 de sangre periférica infectados con cepas de referencia. En estas células el efecto descrito se va intensificando con el tiempo, pero B52 en algunos casos va disminuyendo el efecto tanto a nivel de la transcripción como la liberación de la proteína. Se conoce ya el efecto de HCMV sobre la cIL-10, pero en este trabajo hemos visto las diferencias entre B52 y las cepas de referencia, con un estímulo temprano y de mayor intensidad no dependiente del efecto con el inductor de diferenciación PMA.

Finalmente se puede decir que el aislado B52 tiene un efecto proinflamatorio e inmunomodulador; con regulación diferencial y temprana de mediadores, no dependiente del tratamiento con PMA ni de la replicación viral, mientras que el efecto de las cepas Merlin y Towne es tardío.

- **El aislado B52 induce un fenotipo versátil en los macrófagos, entre el perfil M1 y M2.**

Al evaluar el efecto de la infección por HCMV en la expresión de marcadores de superficie no se observaron diferencias importantes entre las distintas condiciones y tiempos post infección; sin embargo, fue evidente la disminución generalizada de los marcadores a las 72 hpi, indicando tal vez una detención en la activación celular, que se reactivó y fue evidente a las 120 hpi.

En general nuestros resultados muestran que la infección con el aislado B52 y las cepas Merlin y Towne estimuló la expresión de marcadores de superficie de activación y diferenciación la cual se ha asociado con la diferenciación celular, la maduración y la movilización desde la médula ósea a la circulación sanguínea y luego a los tejidos. (38)

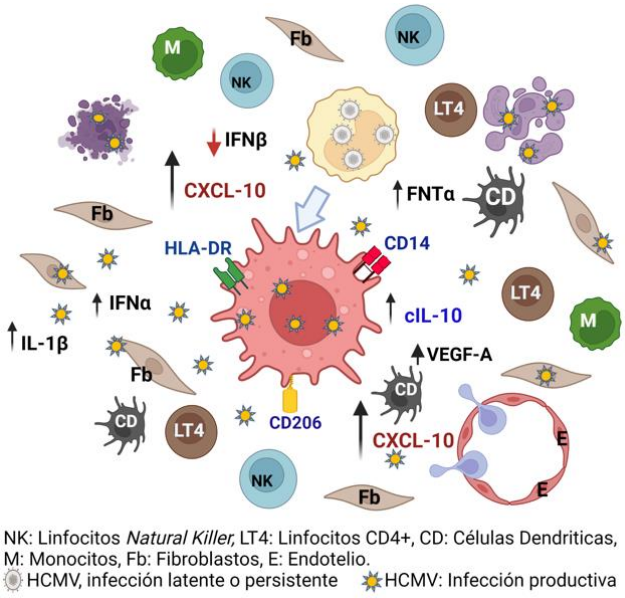
CD14 es una proteína que aparece en la membrana de los monocitos y se intensifica en los macrófagos dada su función en el reconocimiento de patrones asociados a patógenos. (39) Es común observar el aumento de células positivas en contextos inflamatorios e infecciosos, aunque en nuestro modelo no se observó un aumento significativo de células positivas para CD14 en las distintas condiciones de infección que se aplicaron; al parecer, el tratamiento con PMA tampoco indujo un efecto importante. En modelos que utilizan monocitos de sangre periférica CD14+ se ha evaluado el comportamiento de este marcador hasta 25 días en cultivo celular sin

infección y sin inducir diferenciación, demostrando leves cambios a través del tiempo (23), compatibles con lo que encontramos a las 72 hpi., aunque no describen diferencias tan notorias como en nuestro trabajo.
En modelos de infección en monocitos CD14+ con la cepa TB40/E, se encontró una disminución del marcador de progenitores mieloides CD33 luego de la infección, indicando la diferenciación celular; además en este modelo la infección aumentó aparentemente la expresión medida por la intensidad media de la fluorescencia (IMF) de CD14 desde el día 1 hasta el 6 dpi., con diferencias respecto al Mock. (22) En nuestro caso, referimos el porcentaje de células positivas, lo que puede explicar las discrepancias en el modelo previamente reportado, en ese sentido no encontramos diferencias notorias respecto al Mock. Esta disparidad al comparar modelos sobre monocitos de sangre periférica con el empleo de células THP-1, no se puede atribuir al tratamiento con PMA (6,7); por lo tanto, las diferencias se deben atribuir a la cepa viral, ya que en nuestro trabajo el comportamiento del marcador CD14 que más se asemejó al modelo de infección de monocitos de sangre periférica fue el de las células infectadas con la cepa Towne.
CD206 es el receptor de manosa, miembro de la familia de receptores de reconocimiento de patrones, que funciona en la internalización de las proteínas con alto contenido de carbohidratos, para el procesamiento antigénico. Se considera que su expresión es baja en monocitos y se estimula durante la diferenciación a macrófagos o células dendríticas y es uno de los marcadores que ayuda a definir un perfil M2. No es frecuente la evaluación de este marcador en las infecciones por HMCV en monocitos, y en este trabajo observamos que B52 indujo su expresión desde las 48 hpi., con diferencias según el tratamiento con PMA, ya que las células PMA (-) a las 120 hpi, disminuyeron su expresión mientras que las células tratadas la incrementaron. Sugiriendo que en las primeras hpi., la infección únicamente con el B52 induce su expresión y en periodos posteriores la diferenciación inducida con PMA sumada a la infección con B52 mantienen o incrementan la positividad de CD206.
Similar a lo observado con CD14, el marcador HLA-DR se encontró mayoritariamente en las células infectadas en las distintas condiciones y tiempos evaluados, respecto al control. Algo similar también fue descrito en los monocitos de sangre periférica, infectados con la TB40/E, en donde a las 24 hpi., los niveles del marcador fueron similares en las células infectadas y no infectadas, sin embargo, al 6 dpi., se observó aumento de la IMF en células infectadas. En nuestro estudio, las células infectadas con B52 no tratadas con PMA tuvieron una disminución en el número de células positivas para HLA-DR a las 24 hpi., y un aumento en su expresión a las 120 hpi., con diferencias estadísticamente significativas. Algo similar se reportó en monocitos CD14+ infectados con la cepa Fix, donde se observó una disminución respecto al control a las 48 hpi., sin embargo, este nivel de expresión estuvo por debajo respecto al Mock hasta el 20 dpi. (23) Estos resultados muestran un efecto proinflamatorio compatible con lo descrito para las citocinas proinflamatorias en la expresión de los marcadores, sobre todo CD14, pero con expresión de marcadores que se han asociado con un macrófago que regula la respuesta inflamatoria.
En cuanto al efecto de las cepas Merlin y Towne sobre la expresión de marcadores de superficie se encontraron algunas diferencias respecto a B52, ya que la cepa

Merlin estimuló la expresión de HL-DR, sobre todo en las células PMA (+) en todos los periodos de tiempo, con diferencias significativas y la cepa Towne mostró un efecto significativo a las 120 hpi.; estos hallazgos evidencian el efecto diferencial entre el aislado B52 y las cepas Merlin y Towne.
Fue claro entonces que la infección con HCMV induce diferenciación de las células THP-1 a un fenotipo de macrófago M1 y con una leve tendencia hacia un fenotipo M2, evidenciando cierta plasticidad en esta inducción y corroborando lo anteriormente dicho sobre un efecto proinflamatorio temprano del aislado al tiempo con un efecto inmunoregulador, diferente al inducido por las cepas de referencia Merlin y Towne.

Finalmente, en la Figura 5.3.14. proponemos un modelo de modulación de la respuesta inflamatoria e inmunológica del aislado B52 en las células THP-1, a las 48 hpi. Si se piensa en la influencia sobre la respuesta inmunológica, fue el aislado B52 el que demostró un efecto proinflamatorio más temprano y de mayor intensidad, con la expresión génica y secreción de IFNα, TNFα, IL-1β, IL-8, CXCL-10, además de regular a la baja la secreción de IFNβ; características compatibles con lo que se reconoce como el fenotipo del macrófago M1, que tiene mayor expresión de marcadores como CD14, CD11b y CD68. Pero al mismo tiempo, llevó a la expresión de IL-10 celular, secreción de factores de crecimiento especialmente el VEGF-A, expresión de CD206 que fue inducida por B52, desde las 48 hasta las 120 hpi., todo lo cual se considera del perfil M2 de un macrófago que está regulando una respuesta inflamatoria y promoviendo la reparación tisular. Por lo que se puede hablar de una activación de las células monocíticas, llevándolas a diferenciarse a macrófagos, con un perfil que no puede encasillarse como M1 o M2, más bien reflejando la versatilidad de estas células dependiendo del estímulo.
En los pacientes Receptores de Trasplante de Precursores Hematopoyéticos, se ha establecido que luego del injerto de células precursoras es frecuente la infección con Citomegalovirus humano o la reactivación. (40) De acuerdo con nuestros resultados, en las primeras 48 horas la infección de los monocitos de sangre periférica llevaría a la activación de estas células, promoviendo su migración fuera de los vasos sanguíneos y su diferenciación a macrófagos. Se iniciaría un ciclo replicativo que traería como consecuencia la infección de nuevas células en el entorno celular y tisular en el que este virus se encuentra, incrementando la respuesta inflamatoria; así, este proceso podría intensificar el daño celular o la infección con HCMV provocaría la enfermedad de órgano terminal, la neumonía o la gastroenteritis. (41,42,43)
La llegada de células atraídas por los mediadores inflamatorios secretados por los monocitos acentuaría el ambiente inflamatorio, pero la secreción de la IL-10 por los monocitos o macrófagos infectados disminuiría el reconocimiento de las células infectadas, e indirectamente la respuesta ante otros agentes infecciosos, contribuyendo al desarrollo de infecciones oportunistas, además de condiciones como la EICH. (41,42,43)

Figura 5.3.14. Esquema del efecto de la infección con el aislado B52 en las células THP-1, a las 48 hpi.



NK: Linfocitos *Natural Killer,* LT4: Linfocitos CD4+, CD: Células Dendriticas, M: Monocitos, Fb: Fibroblastos, E: Endotelio.
HCMV, infección latente o persistente HCMV: Infección productiva

A las 48 hpi., B52 incrementó la expresión y liberación de IFNα, FNTα, CXCL10, IL-10, VEGF-A. disminuyó las concentraciones de IFNβ y moduló la expresión de los marcadores de superficie CD14, CD206 y HLA-DR; ejerciendo una estimulación inflamatoria, promoviendo activación y movilización leucocitaria y de células dendríticas, células NK y endoteliales. Elaborada con BIorender.

5.3.5. CONCLUSIÓN

En nuestro modelo de latencia – reactivación, en las células THP-1, se demostró el efecto proinflamatorio e inmunomodulador diferencial y temprano ejercido por el aislado B52, sobre la expresión génica y liberación de interferones, citocinas proinflamatorias como el FNTα, al tiempo que ejerce un efecto inmunosupresor con expresión y liberación de cIL-10, por encima de lo inducido por las cepas de laboratorio. Observamos cambios en las células infectadas que demuestran una diferenciación de las células monocíticas a macrófagos, que soportan la replicación viral y con características fenotípicas tanto de M1 como de M2.
Las diferencias observadas entre el aislado clínico y las cepas de referencia, respecto a los reportes en la literatura también parecen depender de la MOI que se emplea, por lo que se sugiere tomar en consideración este factor a la hora de evaluar los resultados de estudios *in vitro*.

5.3.6. REFERENCIAS BILBIOGRÁFICAS

1. Cannon M.J., Schmid D.S., Hyde T.B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. Rev Med Virol. 2010 Jul;20(4):202-13. doi: 10.1002/rmv.655.

2. Zuhair M., Smit G.S.A., Wallis G., Jabbar F., et al. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. Rev Med Virol. 2019 May;29(3):e2034. doi: 10.1002/rmv.2034.
3. Abbas A. Lichtman A.Pillai S. Inmunología celular y molecular. Novena Edición Copyright © 2018 Elsevier España, S.L.U. https://www-clinicalkey-com.ezproxy.unbosque.edu.co/student/content/book/3-s2.0-B978849113275200016X#hl0000884
4. Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). Int J Cancer. 1980; 26(2):171-6. doi: 10.1002/ijc.2910260208.
5. Tsuchiya S., Kobayashi Y., Goto Y., Okumura H., et al. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. Cancer Res. 1982; 42(4):1530-6.
6. Daigneault M., Preston J.A., Marriott H.M., Whyte M.K., Dockrell D.H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. PLoS One. 2010; 5(1):e8668. doi: 10.1371/journal.pone.0008668.
7. Starr T., Bauler T.J., Malik-Kale P., Steele-Mortimer O. The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with Salmonella Typhimurium. PLoS One. 2018; 13(3):e0193601. doi: 10.1371/journal.pone.0193601.
8. Arcangeletti M.C., Germini D., Rodighiero I., Mirandola P., et al. Toll-like receptor 4 is involved in the cell cycle modulation and required for effective human cytomegalovirus infection in THP-1 macrophages. Virology. 2013; 440(1):19-30. doi: 10.1016/j.virol.2013.01.021.
9. Moon M.S, Lee G.C., Kim J.H., Yi H.A., Bae Y.S., Lee C.H. Human cytomegalovirus induces apoptosis in promonocyte THP-1 cells but not in promyeloid HL-60 cells. Virus Res. 2003;94(2):67-77.
10. Ioudinkova E., Arcangeletti M.C., Rynditch A., De Conto F., et al. Control of human cytomegalovirus gene expression by differential histone modifications during lytic and latent infection of a monocytic cell line. Gene. 2006.384:120-8.
11. Arcangeletti MC, Vasile Simone R, Rodighiero I, De Conto F, Medici MC, Maccari C, Chezzi C, Calderaro A. Human cytomegalovirus reactivation from latency: validation of a "switch" model in vitro. Virol J. 2016 Oct 22;13(1):179.
12. Wilkinson G.W., Davison A.J., Tomasec P., Fielding C.A., et al. Human cytomegalovirus: taking the strain. Med Microbiol Immunol. 2015; 204(3):273-84. doi: 10.1007/s00430-015-0411-4.
13. Fortunato EA. Using Diploid Human Fibroblasts as a Model System to Culture, Grow, and Study Human Cytomegalovirus Infection. Methods Mol Biol. 2021;2244:39-50.
14. Frascaroli G, Sinzger C. Distinct Properties of Human Cytomegalovirus Strains and the Appropriate Choice of Strains for Particular Studies. Methods Mol Biol. 2021;2244:19-38.
15. Cha TA TE, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete RR. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. J Virol. 1996;70(1):78-83.

16. Stern-Ginossar N., Weisburd B., Michalski A., Le V.T., Hein MY, et al. Decoding human cytomegalovirus. Science. 2012; 338(6110):1088-93. doi: 10.1126/science.1227919.
17. Ahn J.H., Hayward G.S. The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. J Virol. 1997; 71(6):4599-613. doi: 10.1128/JVI.71.6.4599-4613.1997.
18. Stenberg R.M., Witte P.R., Stinski M.F. Multiple spliced and unspliced transcripts from human cytomegalovirus immediate-early region 2 and evidence for a common initiation site within immediate-early region 1. J Virol. 1985; 56(3):665-75. doi: 10.1128/JVI.56.3.665-675.1985.
19. Stenberg R.M., Depto A.S., Fortney J., Nelson J.A. Regulated expression of early and late RNAs and proteins from the human cytomegalovirus immediate-early gene region. J Virol. 1989; 63(6):2699-708. doi: 10.1128/JVI.63.6.2699-2708.1989.
20. Scherer M., Klingl S., Sevvana M., Otto V., et al. Crystal structure of cytomegalovirus IE1 protein reveals targeting of TRIM family member PML via coiled-coil interactions. PLoS Pathog. 2014; 10(11):e1004512. doi: 10.1371/journal.ppat.1004512.
21. Collins-McMillen D., Rak M., Buehler J.C., Igarashi-Hayes S., et al. Alternative promoters drive human cytomegalovirus reactivation from latency. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019; 116(35):17492-17497. doi: 10.1073/pnas.1900783116.
22. Noriega V.M., Haye K.K., Kraus T.A., Kowalsky S.R., et al. Human cytomegalovirus modulates monocyte-mediated innate immune responses during short-term experimental latency in vitro. J Virol. 2014; 88(16):9391-405. doi: 10.1128/JVI.00934-14.
23. Hargett D., Shenk T.E. Experimental human cytomegalovirus latency in CD14+ monocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107(46):20039-44. doi: 10.1073/pnas.1014509107.
24. Hargett D., Shenk T.E. Experimental human cytomegalovirus latency in CD14+ monocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107(46):20039-44. doi: 10.1073/pnas.1014509107.
25. Biolatti M., Gugliesi F., Dell'Oste V., Landolfo S. Modulation of the innate immune response by human cytomegalovirus. Infect Genet Evol. 2018; 64:105-114. doi: 10.1016/j.meegid.2018.06.025.
26. Yew K.H., Carsten B., Harrison C. Scavenger receptor A1 is required for sensing HCMV by endosomal TLR-3/-9 in monocytic THP-1 cells. Mol Immunol. 2010; 47(4):883-93. doi: 10.1016/j.molimm.2009.10.009.
27. Paijo J., Döring M., Spanier J., Grabski E., et al. cGAS Senses Human Cytomegalovirus and Induces Type I Interferon Responses in Human Monocyte-Derived Cells. PLoS Pathog. 2016; 12(4):e1005546. doi: 10.1371/journal.ppat.1005546.
28. Abate D.A., Watanabe S., Mocarski E.S. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. J Virol. 2004; 78(20):10995-1006. doi: 10.1128/JVI.78.20.10995-11006.2004.
29. Biolatti M, Dell'Oste V, Pautasso S, Gugliesi F, et al. Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp65 (pUL83) Dampens Type I Interferon Production by

Inactivating the DNA Sensor cGAS without Affecting STING. J Virol. 2018; 92(6):e01774-17. doi: 10.1128/JVI.01774-17.
30. Prada-Arismendy J., Castellanos J. Genes de susceptibilidad/resistencia a flavivirus, implicaciones en la severidad de la infección. Acta biol. Colomb. 2006; 11(2): 21-30.
31. Goodwin C.M., Ciesla J.H., Munger J. Who's Driving? Human Cytomegalovirus, Interferon, and NFκB Signaling. Viruses. 2018; 10(9):447. doi: 10.3390/v10090447.
32. Huang Y., Ma D., Huang H., Lu Y., et al. Interaction between HCMV pUL83 and human AIM2 disrupts the activation of the AIM2 inflammasome. Virol J. 2017; 14(1):34. doi: 10.1186/s12985-016-0673-5.
33. Botto S., Abraham J., Mizuno N., Pryke K., et al. Human Cytomegalovirus Immediate Early 86-kDa Protein Blocks Transcription and Induces Degradation of the Immature Interleukin-1β Protein during Virion-Mediated Activation of the AIM2 Inflammasome. mBio. 2019; 10(1):e02510-18. doi: 10.1128/mBio.02510-18.
34. Nordøy I., Müller F., Nordal K.P., Rollag H., et al. Chemokines and soluble adhesion molecules in renal transplant recipients with cytomegalovirus infection. Clin Exp Immunol. 2000; 120(2):333-7. doi: 10.1046/j.1365-2249.2000.01221.x.
35. Rőszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. Mediators Inflamm. 2015;2015:816460.
36. Mosser D.M., Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. Immunol Rev. 2008; 226:205-18. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x.
37. Quan H., Kim J., Na Y.R., Kim J.H., et al. Human Cytomegalovirus-Induced Interleukin-10 Production Promotes the Proliferation of *Mycobacterium massiliense* in Macrophages. Front Immunol. 2020; 11:518605. doi: 10.3389/fimmu.2020.518605.
38. Morrison S.J., Uchida N., Weissman I.L. The biology of hematopoietic stem cells. Annu Rev Cell Dev Biol. 1995; 11:35-71. doi: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000343.
39. Wu Z., Zhang Z., Lei Z., Lei P. CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. Cytokine Growth Factor Rev. 2019; 48:24-31. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.06.003.
40. Hill J.A., Mayer B.T., Xie H., Leisenring W.M., et al. The cumulative burden of double-stranded DNA virus detection after allogeneic HCT is associated with increased mortality. Blood. 2017; 129(16):2316-2325. doi: 10.1182/blood-2016-10-748426.
41. Griffiths P., Reeves M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. Nat Rev Microbiol. 2021; 19(12):759-773. doi: 10.1038/s41579-021-00582-z.
42. Stern L., Withers B., Avdic S., Gottlieb D., et al. Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. Front Microbiol. 2019; 10:1186. doi: 10.3389/fmicb.2019.01186.
43. Freeman R.B. Jr. The 'indirect' effects of cytomegalovirus infection. Am J Transplant. 2009; 9(11):2453-8. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02824.x.

VI. CONCLUSIÓN GENERAL

Este trabajo se propuso abordar integralmente el estudio de HCMV, mediante la detección en saliva, su genotipificación y obtención de un aislado, a partir de fluidos corporales; con la modificación de estrategias metodológicas se demostró que es posible lograrlo. Se estableció el genotipo gB1 a partir de la saliva de pacientes receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos. Se obtuvo el aislado clínico B52, cuyo comportamiento no solo confirmó la capacidad inmunomoduladora de este virus, sino que también hizo evidentes las diferencias con el comportamiento de las cepas de referencia que se emplean habitualmente en los modelos reportados, por lo que se puede decir que para entender las implicaciones de la infección / reactivación de HCMV, a través de los estudios *in vitro*, es necesario emplear aislados clínicos.

Este es el primer estudio sobre genotipificación de HCMV en Colombia y demuestra que la saliva, un fluido que se obtiene de forma fácil y segura, puede emplearse para detectar y genotipificar HCMV en los pacientes inmunosuprimidos en los que la reactivación viral puede tener consecuencias importantes. Por otro lado, en el grupo evaluado se encontró exclusivamente el gB1 y no se identificó una relación entre este y el curso clínico; sin embargo, se resalta la importancia de complementar el diagnóstico con la genotipificación, considerando también que las coinfecciones se asocian con cargas virales más altas y difíciles de controlar.

Luego, para alcanzar el segundo objetivo específico partimos de las muestras de saliva obtenidas para el cumplimiento del primer objetivo, intentando el aislamiento de Citomegalovirus humano con las modificaciones técnicas a los protocolos que se encontraban disponibles en la literatura, como el Shell-vial y el lisado y sonicación de las células. La saliva demostró ser una muestra apta para la detección y genotipificación, pero no para el aislamiento de HCMV. A partir de otro tipo de muestras como el Lavado Broncoalveolar, la orina y el plasma se continuó con el aislamiento hasta lograrlo en una muestra de lavado broncoalveolar; este aislado clínico denominado B52, presentó títulos virales adecuados para trabajos *in vitro* en el pasaje dos de cultivo y se determinó que el genotipo es genotipo gB1; además se descartó la presencia de virus contaminantes en las cosechas de B52.

Las cepas de laboratorio de HCMV, como Towne y Merlin, se siguen empleando rutinariamente a pesar del reconocimiento de los cambios genéticos que tienen que ver con el tropismo, establecimiento de latencia y probablemente evasión de la respuesta inmune.

La inmunomodulación ejercida por HCMV facilita el establecimiento de latencia y la persistencia de la infección en un hospedero sano, con reactivaciones periódicas que llevan a las descargas virales asintomáticas. Los monocitos de sangre periférica portan el genoma de HCMV que es capaz de inducir la síntesis de mediadores inflamatorios que llevan a la activación y diferenciación celular. En este trabajo se demostró el efecto diferencial y temprano ejercido por el aislado B52, comparado con las cepas de referencia, cuyo comportamiento puede reflejar algunos cambios genéticos todavía sin identificar pero que se sabe que pueden ocurrir por el pasaje en cultivo celular. Al ser la inmunomodulación un atributo fundamental en la patogénesis de la enfermedad por HCMV, es crucial utilizar en los estudios aislados

clínicos como B52, cuya actividad proinflamatoria e inmunoreguladora temprana refleja de mejor manera el comportamiento más aproximado al de HCMV *in vivo.*
Las diferencias observadas en el comportamiento de un aislado clínico de HCMV contra cepas de laboratorio, deben tenerse en cuenta en el estudio *in vitro* de la patogénesis de la infección y la enfermedad causada por este virus, especialmente al evaluar la capacidad inmunomoduladora.

VII. PERSPECTIVAS

Luego de finalizar este trabajo y con miras a futuros proyectos de investigación que podrían profundizar y ampliar el alcance de este estudio, dejamos las siguientes propuestas:

- Es necesario llevar a cabo una comparación de la detección y carga viral de Citomegalovirus humano en saliva y sangre, que en lo posible incluya un grupo de individuos sanos. De esta forma se podrá establecer con mayor precisión la ocurrencia de las reactivaciones virales que se encuentran en la saliva y la magnitud de estas en relación con lo que puede estar ocurriendo en otros compartimientos anatómicos.
- De acuerdo con la revisión de la literatura y al comportamiento observado para el aislado clínico de HCMV, al que denominamos B52 y que se obtuvo de un Lavado Broncoalveolar, es deseable aislar este virus de otros fluidos corporales como la orina, comparar el comportamiento replicativo en distintos tipos celulares y la estabilidad genotípica en el paso por el cultivo celular.
- Aunque durante la estandarización de los periodos de tiempo que fueron evaluados en este trabajo no se encontraron cambios significativos a las 24 hpi., es importante establecer una cinética del comportamiento del aislado viral en las primeras 12 hpi., periodo que puede ser crítico en el desarrollo de las complicaciones clínicas como consecuencia de la infección/reactivación de Citomegalovirus.
- Durante la revisión de literatura fue evidente que la infección de otros tipos celulares como las células endoteliales, de sistema nervioso y de la retina, tiene un papel importante en el curso de las complicaciones, por lo que es deseable evaluar el efecto de la infección con los aislados clínicos en estas células.
- Actualmente se están desarrollando trabajos empleando los organoides; en el caso de HCMV la evaluación de la dinámica de infección, replicación y modulación sobre estos organoides puede ser una aproximación muy valiosa para la compresión del efecto de este virus en distintos compartimientos anatómicos o celulares.