

25  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

PARTICIPACION DE LAS CELULAS NK EN EL  
CONTROL DE LA INFECCION POR  
CITOMEGALOVIRUS HUMANO

**T E S I S**

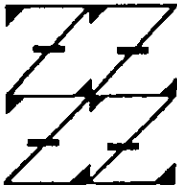
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P R E S E N T A :

**GIL PEREZ JOSE ANTONIO**

UNAM  
FES  
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE

DE NUESTRA REFLEXION

ASESOR: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA  
DIRECTOR: M. en C. PEDRO SANCHEZ CRUZ

MEXICO D. F.

277979

1998.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# CONTENIDO

ABREVIATURAS.	3
ÍNDICE DE FIGURAS.	4
I. INTRODUCCIÓN.	5
II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.	6
A. Respuesta inmune hacia virus.	6
A.1. Inmunidad natural.	6
A.2. Inmunidad adquirida.	6
A.3. Respuesta inmune hacia HCMV.	8
B. Células NK.	9
B.1. Origen y fenotipo.	9
B.2. Función biológica de las células NK.	10
B.2.1. Regulación de la hematopoyesis.	10
B.2.2. Actividad antitumoral.	11
B.2.3. Actividad antiviral.	11
B.3. Receptores de NK para el reconocimiento de la células blanco.	12
B.3.1. Inhibidores.	12
B.3.2. Activadores.	14
B.3.3. Especificidad.	15
B.4. Mecanismo de citotoxicidad.	17
C. El citomegalovirus humano.	18
C.1. Características biológicas.	18
C.1.1. Estructura del virión.	18
C.1.2. Ciclo infectivo.	19
C.1.3. Epidemiología.	21
C.1.4. Patogenia.	21
C.2. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por HCMV.	22
C.2.1. Ocultación viral.	22
C.2.2. Inmunosupresión.	22
C.2.3. Bloqueo de los mecanismos efectores de la respuesta inmune.	22
C.2.3.1. Bloqueo de la actividad del complemento.	23
C.2.3.2. Disminución de la expresión de moléculas MHC.	23
C.2.3.3. Bloqueo de la actividad de células NK.	23
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	24
IV. OBJETIVOS.	25
V. HIPÓTESIS.	26

<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	27
<b>A. Material biológico.</b>	27
<b>A.1. Hibridomas.</b>	27
<b>A.2. Líneas celulares.</b>	27
<b>A.3. Obtención de la población enriquecida de NK.</b>	27
<b>A.4. Virus.</b>	27
<b>B. Equipo.</b>	28
<b>C. Métodos.</b>	28
<b>C.1. Obtención y purificación de anticuerpos monoclonales.</b>	28
<b>C.2. Cultivo de líneas celulares.</b>	28
<b>C.3. Determinación del título viral.</b>	28
<b>C.4. Infección viral.</b>	29
<b>C.5. Cinéticas de infección.</b>	29
<b>C.6. Enriquecimiento de la población de células NK.</b>	29
<b>C.7. Extracción de DNA.</b>	30
<b>C.8. Reacción en cadena de la polimerasa.</b>	30
<b>C.9. Inmunofluorescencia directa, indirecta y citofluorometría de flujo.</b>	31
<b>C.10. Evaluación de la citotoxicidad mediada por células NK.</b>	31
<b>VII. TIPO DE ESTUDIO.</b>	32
<b>VIII. POBLACIÓN.</b>	32
<b>IX. RESULTADOS.</b>	33
<b>A. Las líneas celulares MRC-5 y U-937 se infectarán por el HCMV.</b>	33
<b>B. La infección por HCMV en fibroblastos MRC-5 y monocitos U-937 disminuye la expresión de las moléculas MHC-I.</b>	33
<b>C. Estandarización del número de células blanco K-562, U-937 y MRC-5 para los ensayos de citotoxicidad.</b>	36
<b>D. Obtención de la población enriquecida de células NK a partir de sangre periférica.</b>	37
<b>E. La población enriquecida de las células NK mostró actividad citotóxica sobre la línea celular K-562.</b>	40
<b>F. La población enriquecida de células NK posee baja o nula actividad citotóxica sobre células MRC-5 y U-937 infectadas por HCMV.</b>	40
<b>G. Mayores tiempos de infección por HCMV sobre fibroblastos MRC-5, incrementa la disminución de las moléculas MHC I y aumenta la actividad lítica mediada por NK en el donador 8.</b>	42
<b>H. El estado serológico contra el HCMV no posee participación sobre la actividad citotóxica de NK.</b>	46
<b>X. DISCUSIÓN.</b>	47
<b>XI. CONCLUSIONES.</b>	52
<b>XII. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES.</b>	53
<b>XIII. ANEXOS.</b>	54
<b>XIV. REFERENCIAS.</b>	56

### ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.
CTLs	Linfocitos T citotóxicos CD8 <sup>+</sup> .
E	Gen temprano del HCMV.
Eo	Eosinófilo.
FACS	Clasificador de células activadas por fluorescencia. Del inglés: Fluorescence activated cell sorter.
GCR	Globulos rojos de camero.
HCMV	Citomegalovirus humano.
IE	Gen inmediato temprano del HCMV.
IFN $\gamma$	Interferón gamma.
ITAM	Motivo de activación basado en el inmunoreceptor de tirosina.
ITIM	Motivo de inhibición basado en el inmunoreceptor de tirosina.
KAR	Receptor activador de las células NK.
KIR	Receptor inhibidor de las células NK.
KIR-2D	Receptor inhibidor de las células NK con dos dominios extracelulares.
KIR-3D	Receptor inhibidor de las células NK con tres dominios extracelulares.
L	Gen tardío del HCMV.
MHC-I	Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I.
MHC-II	Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II.
Mn	Monocito.
Mn/M $\phi$	Monocito/Macrófago.
MOI	Multiplicidad de infección. Del inglés: Multiplicity of infection.
MRC-5	Línea celular de fibroblastos de pulmón fetal humano.
N	Neutrófilo.
NK	Linfocitos NK. Del inglés: Natural killer.
NKC	Complejo de genes de las NK.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
RE	Retículo endoplásmico.
TAP	Transportador asociado al procesamiento del antígeno.
TCR	Receptor de células T.

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Figura.

1.	El sistema inmune.	7
2.	Linaje hematopoyetico.	10
3.	Receptores de las células NK y sus ligandos.	14
4.	Clonas de células NK.	16
5.	Mecanismo de citotoxicidad.	17
6.	Morfología del HCMV.	18
7.	Ciclo infectivo del HCMV.	20
8.	Identificación del gen IE-1 por PCR en DNA de fibroblastos MRC-5 y monocitos U-937 infectados por HCMV.	34
9.	Detección por FACS de la proteína IE-1 del HCMV en monocitos U-937 infectados por HCMV.	35
10.	Disminución de las moléculas MHC-I de los fibroblastos MRC-5 y monocitos U-937 infectados por el HCMV.	35
11.	Determinación del número óptimo de células K-562, U-937 y MRC-5 para ser utilizadas como blanco en los ensayos de citotoxicidad.	36
12.	Determinación por FACS del porcentaje de eliminación por adherencia y columna de nylon de monocitos y linfocitos B.	38
13a.	Determinación por FACS del porcentaje de eliminación por formación de rosetas de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> .	39
13b.	Porcentaje de eliminación de la población de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD5 <sup>+</sup> .	39
14.	Determinación por FACS del enriquecimiento de la población celular NK CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> obtenida por selección negativa.	41
15.	Actividad citotóxica de la población enriquecida de NK sobre la línea celular K-562.	41
16.	Actividad citotóxica de la población enriquecida de NK del donador 2 sobre monocitos U-937 infectados por HCMV.	43
17.	Ensayos de la actividad citotóxica de la población enriquecida de NK de los donadores 1-5 sobre monocitos U-937 infectados por HCMV.	43
18.	Actividad citotóxica de la población enriquecida de NK de los donadores 6-9 sobre fibroblastos MRC-5 infectados por HCMV.	44
19.	Disminución de las moléculas MHC-I sobre fibroblastos MRC-5 a 96 y 288 hs post-infección con el HCMV.	45
20.	Actividad citotóxica de la población enriquecida de NK de los donadores 8 y 9 realizados sobre fibroblastos MRC-5 a 96 y 288 hs post-infección.	45
21.	Resumen de los ensayos de la actividad citotóxica de la población enriquecida de NK y el estado serológico de los donadores.	46

## I. INTRODUCCIÓN

El citomegalovirus humano (HCMV) es un patógeno humano ubicuo que pertenece al subgrupo beta de la familia *herpesviridae*. Las infecciones por el HCMV cursan asintomáticas en personas inmunocompetentes, sin embargo, son la principal causa de morbilidad y mortalidad en individuos inmunosuprimidos. Los principales grupos de riesgo son: a) los neonatos; b) los individuos que reciben transplantes de órganos y c) los pacientes con SIDA.

El HCMV, ha desarrollado múltiples estrategias de evasión de la respuesta inmune, destacando la disminución de la expresión de las moléculas de MHC clase I. Lo que limita la participación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el control de la infección. Sin embargo, dicho evento teóricamente hace susceptible a la célula infectada de actividad de NK. Considerando esto, es posible que el virus también halla desarrollado un mecanismo de inhibición de la actividad citotóxica de las NK. Estudios realizados *in vitro* transfectando el gen viral UL-18, han demostrado bloqueo de la actividad de NK, Reyburn y col. (1997) indican que al parecer el virus evade la actividad lítica de NK mediante la proteína UL-18 (homóloga a clase I), que es presentada en la superficie de la célula infectada y se une al receptor inhibitor CD94 de las células NK inactivándolas; por otra parte, Cosman y col. (1997) describen otro ligando para la UL-18, es decir, que la inactivación de las células NK es por unión del homólogo de clase I al receptor inhibitor LIR-1.

No obstante, debido a lo artificial del sistema es necesario estudiar la participación de las células NK en una infección natural por el HCMV.

## II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### A. RESPUESTA INMUNE A VIRUS.

Los virus han desarrollado mecanismos para infectar al hombre ocasionándole en muchos casos enfermedad. Para protegerse, el ser humano ha evolucionado su defensa: el sistema inmune; el cual le permite combatir las infecciones no solo virales, sino también por bacterias, hongos y parásitos. Para su estudio, el sistema inmune se ha dividido en respuesta inmune natural y adquirida, las cuales además pueden ser mediadas por factores humorales y/o celulares. Para las infecciones virales los mecanismos involucrados son los siguientes:

#### A.1. Inmunidad natural.

La respuesta inmune natural (innata) está constituida por: barreras físicas (piel y mucosas); células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos) y células NK, además de factores humorales (complemento y citocinas). Las barreras físicas evitan la entrada del virus al huésped, sin embargo, cuando son superadas los virus son eliminados por células fagocíticas o las células infectadas son lisadas por NK. Los factores humorales ejercen su función solos o en conjunto; por ejemplo, la vía alterna del complemento puede activarse por la envoltura de algunos virus provocando su lisis, u opsonizar dichos virus para favorecer la fagocitosis mediada por los macrófagos, en el caso de los interferones, estos inhiben la replicación viral o activan a los macrófagos para incrementar su actividad fagocítica.<sup>1,2,3</sup>

#### A.2. Inmunidad adquirida.

Después de la respuesta inmune innata, prosigue la activación de la respuesta inmune adquirida, iniciada por el procesamiento y presentación del antígeno viral realizado por las células profesionales presentadoras de antígeno (macrófagos y células dendríticas). Los péptidos antigénicos cargados en el contexto de las moléculas MHC de clase I y II, son reconocidos por los linfocitos T, los cuales se activan y ejercen funciones características de cada subpoblación. Los linfocitos TCD4<sup>+</sup> tienen funciones activadoras a través de la secreción de citocinas que estimulan a NK, macrófagos, linfocitos T CD8<sup>+</sup> y linfocitos B. Los macrófagos y las células NK aumentan su actividad fagocítica y citotóxica respectivamente.



Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> también incrementan su actividad citotóxica y actúan lisando células que expresan antígenos en el contexto de moléculas de clase I. Los linfocitos B son diferenciados a células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos al virus, los cuales tienen diferentes funciones, entre los que se encuentran, la neutralización del virus para evitar que éste se una a su receptor, además provocar la destrucción tanto de virus como de células infectadas activando al complemento o vía ADCC.<sup>1,4,5</sup>

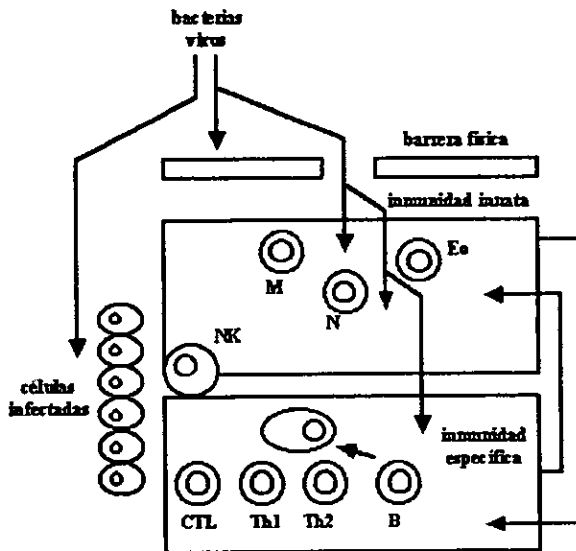


Figura 1. El sistema inmune. M, monocitos; N, neutrófilos; Eo, eosinófilos; NK células asesinas naturales; CTL, células T citotóxicas; Th1, células T inflamatorias; Th2, células T cooperadoras; B, linfocitos B. Durante una infección viral, ejercen su función diferentes linajes celulares que componen el sistema inmune innato encargadas de iniciar una respuesta inmune inespecífica, seguida por las células que componen la inmunidad adaptativa que son las encargadas de montar una respuesta inmune específica hacia el reconocimiento del agente infectante. Tomado de: Ploegh HL, 1998.

#### A.4 Respuesta inmune hacia HCMV.

En el control de la infección causada por HCMV en huéspedes inmunocompetentes se ha establecido la participación de la respuesta inmune celular y humoral. En la respuesta inmune mediada por células, se ha observado un papel directo de los linfocitos T en la resolución de la infección en pacientes en el período post-transplante, observándose la misma respuesta en recién nacidos infectados *in útero* lográndose controlar la viremia cuando se establece la respuesta inmune mediada por linfocitos T. Las proteínas del virus que son reconocidas por los linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) vía MHC-I son: pp72 (IE-1 o UL123), pp65 (UL83), pp71 (UL82), pp150 (UL32), y gB (UL55), sugiriéndose que la respuesta por CTL es hacia los productos inmediatos tempranos y tardíos del virus. Por otra parte, también se han identificado proteínas virales que activan a linfocitos TCD4<sup>+</sup>, entre las cuales se encuentran: pp65 (UL83), pp28 (UL99), pp72 (IE-1), pp86 (IE-2 o UL122), pp71 (UL82), UL81 y gB (UL55). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> proliferan en respuesta a la presentación de estos péptidos. Participan en la activación de CTLs y el desarrollo de células plasmáticas productoras de IgG anti-HCMV, además, producen citocinas con actividad antiviral como el IFN- $\gamma$  y TNF, las cuales se ha demostrado que poseen un efecto sinérgico de protección contra la infección *in vitro* por el HCMV.<sup>6,7,8</sup>

Los infantes prematuros de madres seropositivas, sufren una infección menos severa en comparación de los productos de las madres seronegativas, debido a que los primeros son protegidos transplacentariamente. Esto demuestra el papel protector de los anticuerpos. Aunque los anticuerpos no evitan la infección, sí disminuyen la mortalidad. Al parecer la respuesta inmune humoral no genera un estado de protección contra la infección por el virus, debido a que son muy pocas las proteínas del HCMV que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, a pesar de que los anticuerpos séricos generalmente van dirigidos contra glicoproteínas de envoltura (gB y gH) y la glicoproteína gp65.<sup>6,9</sup>

La participación de las células NK en el control de la infección es fundamental, pues se ha observado que pacientes deficientes en esta población no controlan la infección, sin embargo los mecanismos aún no se conocen.<sup>10</sup>

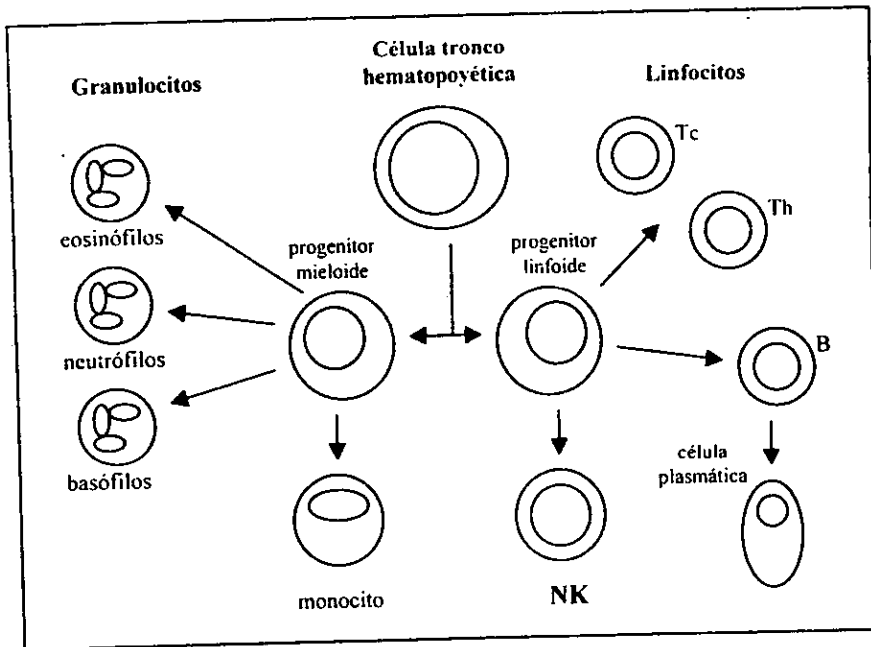
## B. CÉLULAS NK.

Las células NK (del inglés natural killer), son una subpoblación pequeña de linfocitos con actividad citotóxica, que en contraste con los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, son capaces de eliminar células infectadas o tumorales sin previa estimulación; poseen por lo tanto, actividad citotóxica espontánea. Inicialmente se nombraron como "células null" y después por su morfología se denominaron linfocitos granulares grandes (LGG).<sup>11,12</sup>

### B.1 Origen y fenotipo

Las células NK se originan y diferencian en médula ósea, comprenden entre 5 a 15% de los linfocitos de sangre periférica y aproximadamente 5% de células de bazo, se encuentran en menor cantidad en médula ósea, intestinos y otros órganos corporales. Son más grandes que las células T o B, miden de 12 a 15 µm de diámetro. Las características principales de éstas células son el núcleo en forma de riñón y abundante citoplasma, el cual contiene numerosos gránulos azurófilos similares a los que se observan en los basófilos, principalmente cuando la célula se ha activado por acción de las linfocinas o durante su actividad citotóxica.<sup>11,12,13</sup>

Fenotípicamente las células NK se distinguen por la presencia de las moléculas de superficie CD16 (FcγRIIIA) expresada por más de 95% de las células NK y CD56 (NCAM, leu 19) aproximadamente en un 90% de las células NK. Es necesario que ambas moléculas se expresen simultáneamente, ya que también se encuentran en otras estirpes celulares, por ejemplo, el heterodímero CD56 (135 a 220 KD) es una isoforma de las moléculas de adhesión de células neurales. En el caso del CD16 es expresado en los neutrófilos. Considerando estos marcadores, el 90% de las células NK son fenotípicamente CD16<sup>+</sup>-CD56<sup>inactivado</sup>, el porcentaje restante de las células son CD16<sup>-</sup>-CD56<sup>activado</sup> o CD16<sup>-</sup>-CD56<sup>-</sup>, que probablemente constituyen células NK precursoras e inmaduras. Otros marcadores de superficie que no se expresan uniformemente en éstas células incluyen CD2 (70-90%), CD8 (30-40%), CD11b (80-90%) y CD15 (menor de 5%).<sup>12,14</sup>



**Figura 2.** Linaje hematopoyético. Las células involucradas en la respuesta inmune, se derivan de una célula tronco pluripotencial que dará origen a dos diferentes linajes: a)mieloide, compuesto por granulocitos (eosinófilos, neutrófilos, basófilos), células mastocitos y monocitos/macrófagos y b)linfóide, de donde derivan los linfocitos T y B que se diferencian dependiendo del microambiente en el que se alojen, y las células NK que se diferencian y maduran en médula ósea. Tomado de: Roit I, 1996.

## B.2. Función biológica de las células NK.

Las principales funciones de las células NK son: la regulación de la hematopoyesis, actividad antiviral y antitumoral.

**B.2.1. Regulación de la hematopoyesis.** Aunque las células NK se originan y diferencian en médula ósea, algunos estudios sugieren que funcionan inhibiendo tanto células de médula ósea autólogas como alogénicas, los primeros indicios de esta función se propusieron al realizar un trasplante parenteral de médula ósea en ratones F1 irradiados letalmente para evitar la actividad celular de linfocitos T. Éstos trasplantes se inhibieron y se sugirió que se debe a la participación de las células NK. Cuando éstas células se estimulan previamente con citocinas,

tales como interleucina 2 (IL-2), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral (TNF), se inhiben las unidades formadoras de colonias. Resultados contrarios se encuentran cuando las células NK no son tratadas con interleucinas, esto es, activan las unidades formadoras de colonias. En otros muchos resultados se han encontrado discrepancias en cuanto a dicha función, pero se propone que tal activación e inhibición depende del estímulo y de las condiciones requeridas para su propagación y diferenciación de las clonas de células NK.<sup>11,12</sup>

**B.2.2. Actividad antitumoral.** Algunas investigaciones han enfatizado que las células NK, más que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> median la destrucción de células tumorales. Se describe que las células NK son capaces de eliminar aislados frescos de células tumorales, células linfoides alogénicas normales, células endoteliales y monocitos/macrófagos.

La implicación de las células NK en el control de la metástasis, se confirmó cuando se trataron ratones con una dosis inmunosupresora de ciclofosfamida y al inyectarlos posteriormente con células cancerosas, se volvieron susceptibles a éstas, pero la sensibilidad se revierte cuando les son transferidas células NK. Apoyando este resultado se demostró que en esplenocitos que contienen a las células NK, desarrollan una resistencia a metástasis pulmonar en ratones tratados con el mismo inmunosupresor, mientras que por el contrario, si a los ratones se les inyectaban esplenocitos tratados para la eliminación de la población NK, no mostraban dicha resistencia.<sup>11,12</sup>

Datos más recientes realizados *in vitro*, demuestran que las células tumorales pueden eliminarse por dos vías: por Fas-ligando, o por perforinas/granzimas, dependiendo de la línea celular tumoral. Dicha actividad también depende del fenotipo de las células NK.<sup>15,16,17</sup>

**B.2.3. Actividad antiviral.** Actualmente, se estudia la participación central de las células NK en la defensa contra las infecciones virales en humanos. Pero en pacientes con el síndrome de Chédiak-Higashi o con deficiencia en adhesión leucocitaria muestran daño en la función de NK y tienen predisposición a las infecciones virales.<sup>11,12</sup>

Para demostrar este papel fundamental de las células NK, se cuenta con modelos murinos, de donde se sabe que sus células NK expresan el glicolípidio ganglio-n-

tetraosilceramida (asialo GM1) sobre su superficie. Empleando anticuerpos dirigidos contra ésta molécula, se eliminaron *in vivo* a las NK y se observó que los ratones al ser inoculados con una cepa pancreotrópica del virus coxsackie B4, manifestaban un incremento de la actividad viral en comparación con los ratones no tratados con el anticuerpo. Tal protección se confirmó en estudios similares con dos enterovirus, el CVB3 y una variedad del virus de la encefalomiocarditis D, así como, con el Herpes simplex tipo 1.

En otras investigaciones, también eliminan a las NK con anti-asialo GM1 en ratones infectados por citomegalovirus murino, virus de la vaccinia y con el virus de la hepatitis murina y se observan títulos virales altos en hígado y bazo, además de grandes daños histopatológicos en el hígado, en comparación con los ratones controles.<sup>13,18,19</sup>

Por otro lado, la eliminación de las células NK no afecta el título viral en infección aguda o persistente con el virus de la coriomeningitis linfocitaria, pero se propone que el papel de las células NK en esta infección es la producción de citocinas y quimiocinas que reclutan otras estirpes celulares hacia el lugar de la infección.<sup>11,13</sup>

### **B.3. Receptores de NK para el reconocimiento de la célula blanco.**

En la hipótesis "missing-self" se propone que las células NK reconocen moléculas MHC-I sobre células autólogas a través de un receptor inhibitorio, el cual libera una señal negativa y previene la actividad citolítica mediada por las células NK. La pérdida o desregulación de la expresión de las moléculas MHC-I sobre la célula blanco suprime la inhibición, de modo que la lisis de las células blanco queda a cargo de las células NK.<sup>20</sup>

**B.3.1. Receptores inhibitorios.** En las células NK existen dos tipos de receptores inhibitorios (KIR); los primeros son glicoproteínas de membrana tipo I pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, codificadas por una familia de multigenes sobre el cromosoma 19q13.4 humano. Estos receptores son expresados en subpoblaciones de células NK y también en linfocitos T. Con base en su expresión o la presencia de sus dominios extracelulares se pueden dividir en: a) el receptor específico para dos grupos de alelos HLA-C, el cual se identificó como una glicoproteína de 58 KD (p58) que posee dos dominios extracelulares, agrupados como KIR-2D y b) los que poseen tres dominios extracelulares como KIR-3D en el que se

incluye la glicoproteína de 70 KD (p70) que reconocen alelos HLA-B. Estos receptores comparten homología con la región extracelular del receptor Fc $\alpha$  y gp49 en los ratones, que se caracterizan por la longitud de su dominio intracitoplásmico de 76 a 84 aminoácidos, conformados por los pares de la secuencia tirosina-xx-leucina (V/IXYXXL/V) separadas por 26 aa que constituyen la región de inhibición basado en el inmunoreceptor de tirosina (ITIM).<sup>21,22</sup>

El otro tipo de receptores de superficie de membrana de tipo II son las glicoproteínas que pertenecen a la superfamilia de las lectinas de tipo C. En ratones el receptor Ly-49 es codificado por una familia de multigenes encontrados sobre el cromosoma 6 y en ratas se encontró ubicado en el cromosoma 4. La glicoproteína codificada por los genes Ly-49 se expresa en la superficie celular de linfocitos NK y T; generalmente está formando por homodímeros unidos por enlaces disulfuro. En los humanos el receptor inhibidor de tipo lectina es la molécula CD94 codificada por un gen del cromosoma 12. Ly-49 y CD94 no se relacionan estructuralmente, pero ambos pertenecen al complejo de genes de NK (NKC), en los cuales también están incluidos: NKR-PI, NK1.1, CD69 en ratones y NKG2 y hNKR-PIA en humanos. Al igual que los KIR-2D y KIR-3D, el receptor inhibidor Ly-49 posee un tallo citoplásmico largo con la secuencia de aminoácidos característica de los ITIM (V/IXYXXL/V) muy importante para la inhibición de la citotoxicidad mediada por las células NK.<sup>14,21</sup>

CD94 al contrario de los KIR y Ly-49, funciona como receptor inhibidor únicamente cuando está formando dímeros con una proteína de 43 KD codificada por los genes NKG2 y que posee en su tallo intracitoplásmico secuencias ITIM.<sup>22</sup>

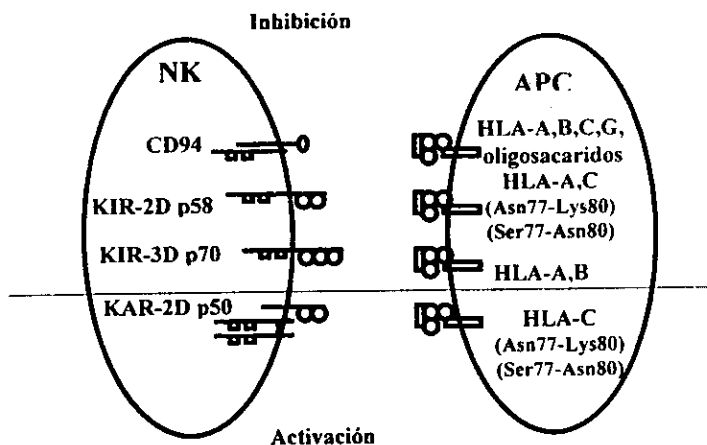


Figura 3. Receptores de las células NK y sus ligandos. Los receptores de las células NK poseen su ligando MHC-I específico y el mismo ligando puede reconocerse tanto por los KIR como los KAR. Tomado de: Leyner LL, 1998.

**B.3.2. Receptores activadores.** Cuando la célula blanco ha perdido la capacidad de expresar las moléculas MHC-I, es reconocida por una proteína llamada p50 encargada de liberar una señal positiva que provoca su lisis. A dichos receptores activadores (KAR) se les había agrupado dentro de los KIR-2D por poseer dos dominios extracelulares, pero a diferencia de ellos, estos receptores carecen de un tallo intracitoplásmico largo. Sin embargo, están cargados de un residuo aminoacídico (lisina en su dominio transmembranal) similar a los receptores de superficie tales como  $TCR\alpha\beta/\gamma\delta$ ,  $Fc\gamma RIII\alpha$ ,  $Fc\epsilon R\alpha$  que están asociados con polipéptidos que contienen regiones de activación basados en el inmunoreceptor de tirosina (ITAM) que activa a las células NK.<sup>21,23</sup>

Resultados recientes indican que los KAR están formando un complejo multimérico asociados a proteínas denominadas fosfoKARAP (proteínas asociadas a KAR) con PM de 12, 14, y 16 KD, posiblemente debido a que representan distintas isoformas y diferentes niveles de fosforilación de un polipéptido único.<sup>24</sup> Dichas proteínas de membrana de tipo I existen en forma de dímeros unidos por enlaces disulfuro llamados DAP12, conteniendo 14 aa en el dominio extracelular, 24 aa de la parte transmembranal y 48 aa de la región intracitoplásmica,



la cual contiene una secuencia ESPYQELQGQRSDVYSDL (D/EXXYXXL/I-X<sub>6-8</sub>-YXXL/I) característica de los ITAMs.<sup>25</sup>

**B.3.3. Especificidad.** El análisis del reconocimiento de los alotipos HLA de clase I de las células NK humanas revela que estas células reconocen epítopos conservados y compartidos por grupos de alotipos de clase I, más que alotipos individuales. Resultados actuales muestran poblaciones policlonales que fueron inhibidas por moléculas HLA-A y HLA-B que comparten un residuo de Asp en la posición 74. Similarmente se encontraron 2 tipos de clonas que reconocen dos grupos de alelos HLA-C que comparten Asn77-Lys80 y Ser77-Asn80; que además están localizados en el extremo carboxilo terminal del dominio  $\alpha_1$  de la cadena pesada de clase I. Otro tipo de clonas se inhibió especialmente por el alelo HLA-BW4, en particular por los aminoácidos localizados en posición 77-83 a semejanza de los alelos HLA-C. En la figura 4 se presentan clonas de células NK y sus ligandos.<sup>23</sup>

Otros alelos que protegen contra las clonas NK1 y NK2, son los presentados por trofoblastos y pertenecen a los alelos HLA-G, se piensa deben jugar un papel muy importante en la protección de la placenta contra el ataque de las células NK.<sup>26,27</sup>

Una propuesta para el reconocimiento de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I, indica que la muerte mediada por las células NK se inhibe por la secuencia de aminoácidos del péptido enlazado al complejo MHC-I, como sucede en el reconocimiento mediado por el TCR. Las moléculas KIR de tipo I reconocen un segmento poco polimórfico de la cadena  $\alpha$  de clase I entre el residuo 77-83, que se encuentra localizado cerca del residuo 86 de glicosilación, aunque los carbohidratos no están involucrados en el enlace a estos tipos de KIR. Algunos residuos de aminoácidos mencionados además de estos incluyen los próximos a la ranura de enlace al péptido, lo que aumenta la posibilidad de que los péptidos puedan ser reconocidos por los receptores de las células NK. No obstante, cuando las moléculas HLA-C que no cargan péptidos se expresaban sobre la superficie de células RMA-S que son deficientes de TAP-1 son capaces de inhibir la citotoxicidad mediada por las células NK, lo cual resultó contradictorio a lo planeado. Resultados que apoyan tal propuesta se observaron cuando se transfectaron células T2 con B\*2705, dicha línea celular es incapaz de presentar péptidos endógenos, por lo que se le estimuló a cargar péptidos exógenos y al

utilizarse como células blanco. en este sistema sólo uno de cuatro de los péptidos cargados a B\*2705 inhiben eficientemente la lisis mediada por NK. El mismo efecto se logra visualizar en transecciones del alelo HLA-B\*0702, donde la mutación tanto en el péptido enlazado como en el residuo  $\alpha$  hélice accesible al solvente, significa un incremento en la muerte mediada por células NK, sugiriendo que al ser reemplazado el péptido propio de la célula blanco por un péptido extraño, dicha célula se vuelve más susceptible a la acción citotóxica mediada por las células NK. Más aún se han encontrado péptidos con capacidad inhibitoria en comparación con los que no inhiben que difieren en su posición 7 y 8; posteriormente se demostró que dichos residuos contribuyen a la formación del epitopo Bw4 sobre la molécula HLA-Bw4. Estos resultados apoyan a que el efecto que causa el péptido extraño cargado sobre las moléculas del MHC I, no se relaciona con la especificidad y que origina un cambio conformacional necesario para unirse a los KIRs.<sup>28,29</sup>

Receptor	Dominios Ig	Motivo	Clona	Ligando	Función
p58.1 KIR	2	ITIMs	c.42 NKAT1	HLA-Cw4 (Asn77-lys80)	Inhibición
p58.2 KIR	2	ITIMs	c.6, c.43 NKAT2	HLA-Cw3 (Ser77-Asn80)	Inhibición
p70 p140 KIR	3	ITIMs	c.5, NKAT4 17.1C, AMC5	HLA-A3,-A11	Inhibición
p70/NKB1 KIR	3	ITIMs	cNKT3/c.11 NKB1/c.1	HLA-B(Bw4+)	Inhibición
p50.1	2	ITAMs	EB6-act1	HLA-Cw4 (Asn77-Lys80)	Activación
p50.2	2	ITAMs	c.49, NKAT5 183-act1	HLA-Cw3 (Ser77-Asn80)?	Activación
p50.3	2	ITAMs	NKAT8 NKA3	?	Activación

Figura 4. Clonas de células NK. Los receptores de las células NK participan en el reconocimiento de moléculas HLA de clase I, reconociendo una secuencia específica en común. Tomado de: López BM, 1997.

#### B.4. Mecanismo de citotoxicidad.

Cuando una célula NK interacciona con la célula blanco a través de sus KAR y con la ayuda de coactivadores como el CD2, NKR-P1 y CD28, se inicia su actividad lítica. Sin embargo también puede inactivarse mediante el reconocimiento de los ligandos por los KIR. Ambos mecanismos se realizan a través de cascadas de fosforilación intracitoplásmica.<sup>30,31,32</sup>

Las NK tienen actividad citotóxica por inducción de apoptosis a través de la interacción CD95-CD95L y principalmente mediante el sistema perforinas/granzimas que son liberadas de los gránulos citoplasmáticos. La perforina es una proteína de 70 KD, su interacción inicial con la membrana de la célula blanco posiblemente involucra la fosforilcolina que actúa como receptor. Una vez unida la perforina mediante la acción de los iones calcio ( $Ca^{2+}$ ) sufre cambios conformacionales que le permiten internalizarse a la bicapa lipídica de la membrana citoplásmica. El tamaño del poro de perforina es de aproximadamente 5 a 20 nm a semejanza del originado por el complejo de ataque a la membrana de los componentes del complemento. El resultado de la formación del poro de perforina perturba la homeostasis intracelular que conducen a la muerte de la célula blanco por dos mecanismos: a) por incremento del estrés osmótico que conduce a una lisis coloidal osmótica, y b) por salida de un flujo potente de moléculas intracelulares.<sup>33,34,35</sup>

Al formarse el poro de perforina, la granzima penetra al citoplasma de la célula blanco y actúa sobre  $p33^{cd2}$  lo que desencadena la apoptosis, otra posibilidad es que la granzima actúe sobre un sustrato citoplásmico que permita la entrada de las DNAsas al núcleo y así causar la fragmentación del DNA.<sup>35,36,37</sup>

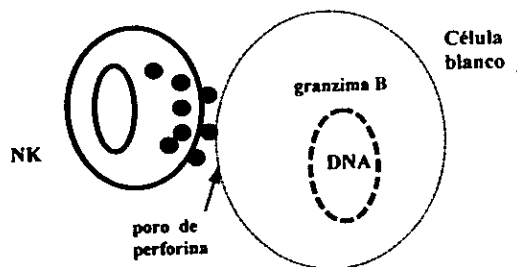


Figura 5. Mecanismo de citotoxicidad. Cuando el sistema perforinas/granzimas de las células NK se activa, la célula blanco sufre lisis coloidal por la formación del poro de perforina o es conducida a la apoptosis por la actividad de las granzimas.

## C. EL CITOMEGALOVIRUS HUMANO.

El citomegalovirus humano (HCMV) es un  $\beta$ -herpesvirus de distribución mundial. Su nombre se debe a las inclusiones citoplásmicas y nucleares presentadas en las células infectadas. Es un patógeno oportunista que representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunosuprimidos. La infección inicial en huéspedes inmunocompetentes es asintomática y logra controlarse, sin embargo, al igual que los virus del herpes simplex y la varicela zoster, el HCMV permanece en estado de latencia.

### C.1. Características biológicas.

**C.1.1. Estructura del virión.** El virión del HCMV es indistinguible de los demás *herpesvirus*. Está constituido por una cápside de 100 a 116 nm de diámetro, compuesta por 162 capsómeros, a su vez rodeada por el tegumento formado por 5 proteínas: las de alto peso molecular (UL47 de 110 KD y UL48 de 250 KD), fosfoproteínas básicas (UL32 de 113 KD), de matriz superior (UL82 de 62 KD) y de matriz inferior (UL88 de 63 KD). Finalmente, la envoltura formada por una bicapa lipídica de origen celular con proteínas virales incrustadas. El genoma del HCMV es una molécula de doble cadena de DNA de 235 kpb que contiene 208 marcos de lectura abiertos (ORF). Actualmente, se sabe que es el virus con el genoma más grande de todos los que infectan al hombre.<sup>38,42</sup>

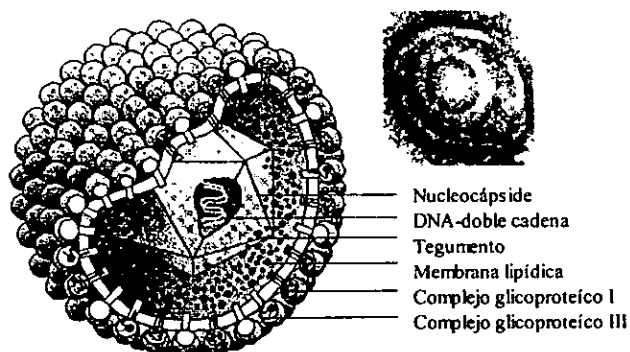


Figura 6. Morfología del HCMV.

**C.1.2. Ciclo infectivo.** La gran capacidad del HCMV para infectar *in vivo* diferentes linajes celulares, tales como, células endoteliales, epiteliales, neuronales, de la glia, monocitos/macrófagos y de músculo, demuestra que el virus utiliza un receptor que se encuentra comúnmente distribuido en la superficie de las células blanco, o bien que emplea diferentes mecanismos para poder penetrar a todos estos tipos de células.<sup>43</sup> Actualmente se conoce que la penetración se realiza mediante diferentes receptores y etapas:

a) Proceso inicial también llamado de baja afinidad, efectuándose cuando el virus reconoce los proteoglicanos heparán sulfatos (HPGS) mediante las glicoproteínas de envoltura gCII (UL100) y gB.

b) Unión de alta afinidad producido por el enlace a una proteína de 34 KD denominada anexina II, un miembro de la familia de las lipocortinas. En monocitos al receptor CD13.

c) Una vez que el virus se ha enlazado a la membrana celular ocurre una fusión de la envoltura del virus mediante las glicoproteínas gB y gH, de las cuales ésta última se une a una proteína de 92.5 KD.<sup>43-47</sup>

El otro tipo de mecanismo de infección se observa en células como los monocitos y macrófagos que poseen características fagocíticas, una vez fagocitado el virus puede fusionar su envoltura a la membrana del fagosoma y por cualquiera de los mecanismos mencionados la cápside se libera al citoplasma y viaja al núcleo, donde por mecanismos no conocidos el DNA es liberado para iniciar el ciclo viral.

La replicación del virus sucede en diferentes estadios de acuerdo a la expresión de sus genes y se han dividido en: inmediatos tempranos (IE ), tempranos (E), tardíos (L). La expresión de los productos de los genes inmediatos tempranos se efectúa desde las primeras horas post-infección identificándose principalmente las proteínas IE1<sub>491aa</sub> de 68 a 72 KD y la IE2<sub>579aa</sub> con PM de 80 a 86 KD. Esta familia de proteínas tienen un rol muy importante en la regulación de la expresión de los genes tempranos y tardíos. Los productos de los genes tempranos se detectan desde las 2 a las 20 hs participando activamente en la síntesis de DNA y finalmente en la expresión de los genes tardíos o estructurales efectuada desde las 15 a las 72 hs post-infección.<sup>48,49</sup>

El ensamblaje del HCMV ocurre en el núcleo, iniciando por la formación de la cápside que guardará al genoma viral. El siguiente paso es la obtención del tegumento que se asume se adquiere en una región de la membrana nuclear denominada tegusoma, localizada en el área perinuclear y el citoplasma. Por último, los viriones adquieren la envoltura de la membrana nuclear, utilizando un mecanismo de envoltura-desenvoltura para salir de la doble membrana del núcleo y que al viajar por el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, la envoltura final la obtenga de la membrana citoplásmica.<sup>50,51,52</sup>

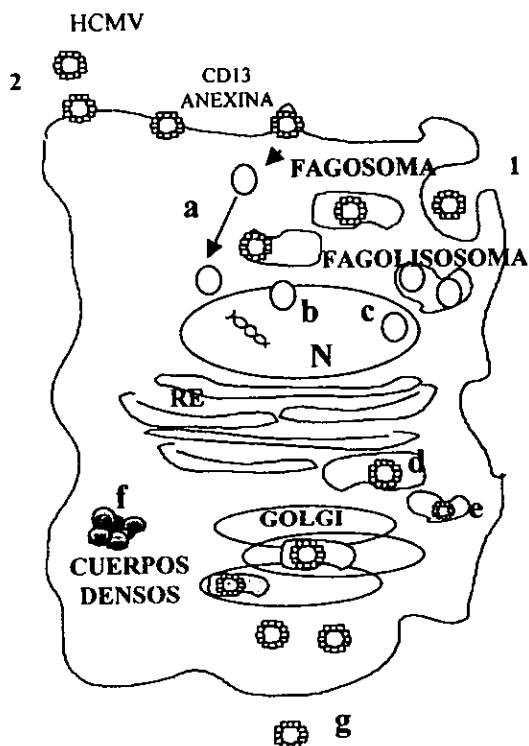


Figura 7. Ciclo infeccioso del HCMV. Los viriones penetran a las células a través de dos vías, por fagocitosis (1) o fusión a la membrana de la célula huésped (2). En el citoplasma, las cápsidas desnudas derivadas de los viriones procedentes de cualquiera de las vías mencionadas, viajan al núcleo (a) para replicarse (b). Las partículas recién formadas adquieren su envoltura del núcleo (c), viajan a través del aparato de Golgi (d) hacia los lisosomas (e), cuerpos densos (f) o finalmente son liberados extracelularmente (g).

**C.1.3. Epidemiología.** La infección del HCMV es endémica. Su forma de transmisión es efectuada de dos formas: a) horizontal, donde numerosos fluidos de un individuo infectado son altamente contagiosos (saliva, orina, sangre, secreciones cervicales, semen, leche materna, etc.) y b) vertical, efectuada generalmente por vía transplacentaria (intrauterina) o a través del canal del parto, además de transfusiones sanguíneas o de transplante de órganos. La facilidad de contagio explica los altos porcentajes de seropositividad en la población. Dichos valores se incrementan conforme aumenta la edad de la población estudiada.<sup>7,53,54</sup> En países avanzados la prevalencia es menor (40-80%) en comparación con los países en vías de desarrollo (hasta el 100%). En México se han realizado muy pocos estudios pero existen informes de que en la población adulta un 90% se encuentran infectados por el HCMV.<sup>55</sup>

**C.1.4. Patogenia.** La infección por HCMV generalmente se disemina a todos los órganos y tejidos del cuerpo, encontrándose por estudios ya realizados que las células que más comúnmente se encuentran infectadas son las epiteliales ductales en la superficie serosal y las paredes de la mucosa. Las células infectadas incrementan notablemente su tamaño con citoplasma limitado y un prominente núcleo central con la cromatina condensada, además pueden observarse numerosas inclusiones intracitoplásmicas llamados cuerpos densos.<sup>7,42</sup>

La infección primaria en pacientes inmunocompetentes cursa generalmente asintomática, debido a que el sistema inmune logra controlar la infección; sin embargo, como otros herpes virus, el virus no es eliminado del organismo estableciendo una infección latente o persistente.

La infección por HCMV es en la actualidad una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en huéspedes inmunosuprimidos, debido a que el virus en latencia, puede reactivarse endógenamente, o el individuo sufrir reinfección o infección con otro tipo de cepa del HCMV, los grupos de mayor riesgo son: a) los recién nacidos, donde dicha infección es la principal causa de infección congénita (en EUA 1-5% de los recién nacidos son seropositivos) y uno de cada 10,000 neonatos, sufren daños severos en el sistema nervioso central, donde las células neurales y de la glia pueden tener infección productiva ocasionando retraso mental (microcefalia), calcificación periventricular, además, ceguera, sordera, e incluso la muerte; b) los individuos que reciben transplante de médula ósea, corazón, pulmones y riñón (en

receptores de médula ósea el 35-50% sufren infección por el virus y en el 3-10% de los casos origina muerte por neumonitis), en los cuales el virus infecta principalmente el sistema respiratorio, dañándose el epitelio broncoalveolar que en condiciones agudas ocasiona disfunción pulmonar e incluso la muerte por neumonitis; otro de los daños es en riñón donde se presenta, glomerulitis que puede terminar con disfunción renal; y c) los pacientes con SIDA (al momento de morir el 72% de los individuos poseía infección por el virus), los cuales pueden sufrir infecciones a cualquier nivel del organismo, sin embargo, la infección más frecuente en ellos es en el tracto gastrointestinal, el colón es el sitio más comúnmente infectado seguido del esófago, recto y en menor frecuencia el intestino. En estos órganos durante la infección aguda existe la formación de ulceraciones y en condiciones graves se encuentran necrotizados.<sup>9,42,53,54</sup>

## **C.2. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por HCMV.**

En los últimos años la investigación sobre la infección por citomegalovirus humano se ha dirigido a la capacidad que posee este virus para evadir la respuesta inmune, para su estudio estos mecanismos se agrupan en:

**C.2.1. Ocultación viral.** Entre los mecanismos que el virus utiliza para permanecer oculto del sistema inmune se ha encontrado: sobreexpresión del FcR de la IgG en las células infectadas, infección en continuidad, latencia y variación antigénica (se conocen más de 100 cepas del virus).<sup>55-59</sup>

**C.2.2. Inmunosupresión.** Durante la infección por HCMV se disminuye la hematopoyesis y se sobreexpresa el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) que regula negativamente la respuesta inmune y estimula la replicación viral.<sup>60-64</sup> La inmunosupresión también se debe a la inducción de apoptosis sobre los linfocitos T.<sup>65-67</sup>

**C.2.3. Bloqueo de los mecanismos efectores de la respuesta inmune.** Quizá la manera más efectiva de evadir a la respuesta inmune, es bloqueando los mecanismos efectores: la



actividad del complemento, disminución de la expresión de moléculas del MHC y la actividad NK.

**C.2.3.1. Bloqueo de la actividad del complemento.** Durante la infección por HCMV se aumenta la expresión de las moléculas CD46 y CD55 las cuales son inhibidores naturales de la activación del complemento.<sup>68</sup>

**C.2.3.2. Disminución de la expresión de moléculas MHC.** El HCMV expresa al menos cuatro proteínas implicadas en la desregulación de la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase I.<sup>69-72</sup> Inicialmente la proteína US3 se encarga de la retención de las moléculas de clase I en el retículo endoplásmico,<sup>73-76</sup> subsecuente las proteínas US2 y US11 translocan la cadena pesada de la molécula de clase I fuera del retículo endoplásmico donde se degradada por acción de los proteasomas.<sup>76,77</sup> La glicoproteína US6 evita el transporte de los péptidos a través de los TAP's evitando el ensamblaje de la molécula de clase I.<sup>78</sup> El HCMV también disminuye la expresión de moléculas de clase II aunque los mecanismos implicados aún no se conocen.<sup>79</sup>

**C.2.3.3. Bloqueo de la actividad de células NK.** Aunque no se ha establecido la participación de las células NK en el control de la infección por HCMV, se sabe que individuos deficientes en ellas son más susceptibles de padecer infecciones severas.<sup>10</sup> Recientemente se identificó a la proteína UL-18 del HCMV, la cual es homóloga en aproximadamente 20 % con la cadena pesada del MHC-I. La UL-18 es una glicoproteína con 13 sitios potenciales de N-glicosilación, peso molecular de 67 KD y afinidad por la  $\beta 2m$ .<sup>80</sup> Además, se ha demostrado que carga péptidos y se expresa en la superficie celular.<sup>81</sup> Por otra parte, debido a que durante la infección por HCMV la expresión de MHC-I disminuye teóricamente la célula sería blanco de actividad NK. Se ha especulado que la función de UL-18 probablemente es la de unirse a receptores inhibidores de las NK (CD94 y LIR-1) para inactivarlas, evadiendo de esta manera la citotoxicidad por células NK.<sup>82-84</sup>

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El citomegalovirus humano es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en individuos inmunosuprimidos. En la resolución de la infección está involucrada la respuesta inmune celular. Los linfocitos T citotóxicos (CTLs) participan efectivamente en el control de la infección lisando células infectadas que les presentan péptidos virales en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I. Sin embargo, el virus ha desarrollado mecanismos que le permiten disminuir la expresión de dichas moléculas y evadir la acción de los CTLs. Este evento podría favorecer la función de las células NK que lisan células las cuales han perdido la expresión de moléculas del MHC-I. Estudiar la participación de las células NK en el control de la infección por citomegalovirus humano es difícil, pues no se cuenta con un modelo *in vitro* y existen dificultades experimentales y éticas para utilizar un modelo *in vivo*.

Por tal motivo se obtendrán células mononucleares enriquecidas de la población de NK, de donadores de sangre seropositivos y seronegativos al HCMV. La línea promonocítica U-937 y fibroblastos MRC-5 serán infectadas con el HCMV AD-169 y se determinará la disminución de la expresión de moléculas del MHC-I utilizando el mAb W6/32 mediante citometría de flujo. Después las células infectadas se pondrán en contacto con células NK y se determinará el porcentaje de citotoxicidad por medición de la actividad de la enzima LDH liberada de las células lisadas.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL.**

- Estudiar la participación de las células NK en el control de la infección por citomegalovirus humano.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- ⊗ Realizar la titulación del citomegalovirus humano cepa AD-169 por la técnica de formación de placas líticas.
- ⊗ Producir anticuerpos monoclonales de los hibridomas L-14, W6/32 por cultivo y/o por inducción de tumor productor de líquido de ascitis en ratones BALB/c.
- ⊗ Montar un modelo experimental de infección por citomegalovirus humano AD-169 de monocitos de sangre periférica y/o células U-937.
- ⊗ Determinar la citotoxicidad mediada por células NK de monocitos humanos infectados por citomegalovirus humano mediante actividad de la enzima LDH liberada de las células lisadas.

## V. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Si el citomegalovirus humano es capaz de inducir en las células que infecta una disminución de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), que le permite evadir la respuesta inmune mediada por linfocitos T citotóxicos, entonces este evento podría favorecer la acción citotóxica de las células NK que lisan células las cuales han perdido la expresión de moléculas del MHC-I.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

### A. MATERIAL BIOLÓGICO.

#### A.1. HIBRIDOMAS:

- L-14 ATCC HB-8554 Produce anticuerpos monoclonales anti-proteína inmediata temprana principal (IE-1 o UL123) de 72 KD del HCMV.
- W6/32 ATCC HB-95 Produce anticuerpos anti-determinante monomórfico de los HLA-A, B, C.

#### A.2. LÍNEAS CELULARES:

- K-562 ATCC CCL-243 Células de leucemia mielógena crónica humana.
- MRC-5 ATCC CCL-171 Fibroblastos de pulmón humano.
- U-937 ATCC CRL-1593 Células de linfoma histiocítico humano.

#### A.3. POBLACIÓN ENRIQUECIDA DE NK:

- Obtenidas por selección negativa de concentrados leucocitarios de donadores sanos del banco de sangre.

#### A.4. VIRUS:

- HCMV cepa AD-169 ATCC VR-538. Citomegalovirus humano propagado en células MRC-5.

### B. EQUIPO:

- FACSorter Becton-Dickinson, con el programa de cómputo Cell quest para el procesamiento de datos.
- Microplate autoreader EL-311; Bio-Tek Instruments.
- Termociclador Perkin Elmer.

## C. MÉTODOS.

### C.1. Obtención y purificación de anticuerpos monoclonales.

Los hibridomas L-14 y W6/32 se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, en medio D-MEM suplementado con 10% SFB, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 UI/mL. El sobrenadante de cultivo se clarificó por centrifugación (1500 g por 10 min) y los mAb se purificaron por precipitación con sulfato de amonio al 50%. El precipitado se dializó contra PBS 1X y finalmente los mAb se obtuvieron utilizando una columna de afinidad de proteína A-sefarosa. La levigación de la IgG unida se realizó empleando glicina-HCl 1 M a pH 2.4 y las fracciones de 1 mL se neutralizaron inmediatamente con 70 µL de TRIS 1 M. La concentración de mAb se determinó por la lectura de densidad óptica a 280 nm.

### C.2. Cultivo de líneas celulares.

Las líneas celulares K-562 y U-937 se cultivaron en medio RPMI 1640 y las células MRC-5 se cultivaron en medio D-MEM, ambos medios fueron suplementados con 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina, y L-glutamina 2 mM, y se incubaron bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. El cultivo de las células adherentes MRC-5 se realizó hasta la obtención de una monocapa celular confluyente y se realizaron subcultivos en una relación de pase 1:2, con previo proceso de tripsinización. Las células K-562 y U-937 fueron mantenidas a una concentración de 2 millones de células por mL.

### C.3. Determinación del título viral.

Monocapas confluentes de células MRC-5 en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> se lavaron dos veces con PBS 1X y se infectaron por adsorción durante 2 hs con diluciones seriadas (10<sup>0</sup> a 10<sup>-7</sup>) de una suspensión del HCMV. Posteriormente se adicionó agarosa al 0.6% en medio D-MEM 2% SFB, las células se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 7 días. Una segunda capa de agarosa 0.6% se adicionó sobre la primera; 7 días después la monocapa se fijó con paraformaldehído al 10%, y se tiñó con azul de bromofenol. El número de UFP fue determinado mediante la relación (número de placas) X (1/dilución), resultó de 10<sup>8</sup> UFP/mL.

Alicuotas del virus se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$  y el título permanece durante un tiempo aproximado de 6 meses.

#### **C.4. Infección viral.**

a) MRC-5. Las células en monocapa confluyente en botellas de cultivo de  $75\text{ cm}^2$  se lavaron dos veces con PBS 1X. La monocapa celular (aproximadamente  $5 \times 10^5$  células) se puso en contacto con el HCMV a dosis de 100 MOI, en medio D-MEM al 2% de SFB. Después de 2 hs de adsorción a  $37^{\circ}\text{C}$ , se retiró el inoculo y las células se lavaron dos veces con PBS 1X previo a la adición de medio de mantenimiento (D-MEM al 2% de SFB).

b) U-937.  $10^6$  células en suspensión se lavaron con PBS 1X centrifugando por 5 min a 1200 g. El proceso de adsorción viral se realizó en medio de cultivo RPMI al 2% de SFB, con el HCMV a dosis de 100 MOI, centrifugando a 1500 g durante 1 h a temperatura ambiente. El inoculo se retiró y las células se lavaron dos veces con PBS 1X antes de la adición de medio D-MEM al 10% de SFB.

#### **C.5. Cinéticas de infección.**

a) Las células MRC-5 y U-937 se infectaron con el HCMV a la dosis de 100 MOI como se describe en infección viral. El cultivo de las células infectadas se llevó a cabo a  $37^{\circ}\text{C}$  por tiempos definidos (0, 24, 72, 96 y 288 hs). Se cosecharon las células y se lavaron 2 veces con PBS-BSA 1%, centrifugando a 1200 g por 5 minutos. Finalmente, se resuspendieron en PBS-BSA 1% a una concentración de  $10^6/\text{mL}$  y en seguida se sometieron al marcaje con los diversos anticuerpos para su análisis por inmunofluorescencia indirecta.

#### **C.6. Enriquecimiento de la población de células NK.**

La población enriquecida de células NK se obtuvo por selección negativa de los concentrados leucocitarios de donadores sanos del banco de sangre, empleando las siguientes técnicas:

a) Gradiente por ficoll-hypaque: 40 mL del concentrado leucocitario se diluyeron con PBS 1X en relación 1:1 y se sometieron a un gradiente por ficoll-hypaque en una relación 10:3 centrifugando a 1500 rpm durante 30 minutos. Las células mononucleares se lavaron por centrifugación (8000 rpm/5 minutos) con 3 veces su volumen de PBS 1X.

b) Adherencia en caja de cultivo:  $120 \times 10^6$  células mononucleares se resuspendieron en 15 mL de medio D-MEM suplementado con 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina, y L-glutamina 2 mM, e incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por un tiempo de 24 h. Las células no adherentes se removieron utilizando D-MEM.

c) Columna de nylon: Las células no adherentes se cargaron en una columna de nylon previamente mantenida a 37°C y lavada con medio D-MEM al 10% de SFB. Se incubó por 1 h a 37°C. Se eluyó la columna pasando D-MEM al 10% de SFB a 37°C.

d) Formación de rosetas T: Por cada  $1 \times 10^7$  células obtenidas de la columna de nylon se adicionó 1 mL de suspensión al 4% de glóbulos rojos de carnero previamente sensibilizados con solución de AET por un tiempo de 20 min a 37°C, centrifugando a 800 rpm durante 5 minutos, e incubando 60 minutos en hielo. Al final de la incubación las rosetas se removieron por un gradiente de ficoll-hypaque como se menciona arriba. El exceso de GRC contenidos en los enriquecidos de NK se eliminaron con solución de cloruro de amonio y potasio.

e) En cada paso se realizó el monitoreo las poblaciones celulares mediante inmunofluorescencia directa, empleando conjugados dirigidos contra los marcadores: anti-CD14 (PE) para monocitos, anti-CD19 (FITC) para linfocitos B, anti-CD4 (FITC), CD5 (PE) y CD8 (PE) para linfocitos T y anti-CD16 (FITC), CD56 (PE) para las células NK.

### C.7. Extracción de DNA.

Se resuspendieron  $1 \times 10^6$  células en 500 µL de amortiguador de extracción y se adicionó proteinasa K a una concentración final 100 µg /mL, mezclando por 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se incubaron 25 minutos a 65°C. El DNA se obtuvo por la técnica de fenol-cloroformo y se precipitó con etanol en presencia de NaCl 3 M. Finalmente se disolvió en 50 µL de TE y se cuantificó a 260 nm para su posterior análisis por PCR.

### C.8. Reacción en cadena de la polimerasa.

En la detección del gen IE-1 se empleó la siguiente mezcla de reacción: 0.6 µM de los iniciadores C y D, 20 mM de Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 0,2 mM de dNTP, 1 U Taq, 2 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 µg de DNA, a un volumen final de 25 µL. La mezcla se incubó a 95°C 5 min, 92°C 30 seg., 53°C 30 seg., 72°C 30 seg., (repetiéndose 40 veces los tres últimos). Los productos de



la amplificación se corrieron sobre geles de agarosa al 2%. Específicamente se emplearon los siguientes iniciadores:

"C" = 5'-TGA-GGA-TAA-GCG-GGA-GAT-GT-3'

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

### C.9. Inmunofluorescencia directa, indirecta y citofluorometría de flujo.

La determinación del porcentaje de las poblaciones de las células mononucleares durante la obtención de células NK por selección negativa se realizó por inmunofluorescencia directa. Por cada  $1 \times 10^6$  células mononucleares, se adicionó 1  $\mu\text{g}$  de conjugado dirigido contra los marcadores: CD14 (PE) para monocitos, CD19 (FITC) para linfocitos B, CD4 (FITC), CD5 (PE) y CD8 (PE) para linfocitos T; y CD16 (FITC), CD56 (PE) para las células NK. En todos los casos se incubaron en hielo durante 30 minutos; transcurrido el tiempo se lavaron con PBS-BSA al 1% y se agregó para fijarlas 500  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído en PBS-BSA al 1%. Para el estudio de la densidad de las moléculas de MHC-I, y proteínas IE-1 viral, a los diferentes tiempos de infección,  $10^6$  células se pusieron en contacto con 10  $\mu\text{g}$  del mAb de interés (W 6/32, y L-14, respectivamente) durante 30 minutos a 4°C. Se realizaron 3 lavados con PBS-BSA al 1% (centrifugando a 1200 g por 5 minutos) entre cada incubación, y se utilizó como segundo anticuerpo 1  $\mu\text{g}$  del conjugado fluoresceinado (cabra anti cadenas H y L de la molécula de IgG de ratón) incubándose en obscuridad durante 30 minutos a 4°C. Finalmente se agregó 500  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído en PBS-BSA 1 %.

Se determinó la intensidad de fluorescencia de grupos de 5000 células, (marcadas con el mAb correspondiente como se describió) a través del citofluorómetro de flujo, analizando los resultados vía el programa de cómputo Cell Quest para el procesamiento de datos.

### C.10. Evaluación de la citotoxicidad mediada por células NK.

Se emplearon 7500 células (K-562 y U-937) y 3000 células MRC-5 como blanco a una relación efectora:blanco (E:B) 10:1, 30:1 y 60:1; determinando el control fundamental (LDH en el medio) de 200  $\mu\text{L}$  de medio de ensayo. El control bajo (LDH liberada espontáneamente) se obtuvo de las células blanco en ausencia de las efectoras. El control alto (LDH máxima) se determinó ocasionando la lisis de las células blanco por adición de medio de ensayo con 1% de

Tritón X-100. El control I es la medición de LDH liberada de la población enriquecida de células NK en ausencia de células blanco. Todas las determinaciones fueron colocadas en placa de 96 pozos y por triplicado. Posteriormente fue incubada por 6 h a 37°C a una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Consumado el tiempo, la placa se centrifugó a 250 g por 10 min y se retiraron 100 µL de sobrenadante, pasándolos a una nueva placa. Para la determinación de la actividad citotóxica, se cuantificó la cantidad de LDH liberada al medio, empleando un kit comercial de citotoxicidad que se fundamenta en la reducción de tetrazolio (color amarillo) a formazán (color rojo) por la producción de NADH + H<sup>+</sup> derivado de la acción catalítica de la LDH. La reacción fue bloqueada después de 30 minutos por adición de 50 µL de solución de HCl 1N. Y se midió la absorbancia de las muestras a 492 nm.

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad mediada por células, se calculó restando a todos las lecturas la absorbancia obtenida del control fundamental, y se substituyeron en la siguiente ecuación:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \frac{(\text{mezcla E:B - control I}) - \text{control bajo}}{\text{control alto - control bajo}} \times 100$$

## VII. TIPO DE ESTUDIO

La participación de las células NK en el control de la infección por HCMV es un estudio prospectivo, debido a que la información será recabada después de observar la actividad citotóxica de NK sobre las células infectadas por HCMV. Es descriptivo por que el estudio sólo involucra donadores sanos del banco de sangre. De acuerdo a su evolución es transversal ya que la actividad citotóxica sólo se mide una vez en cada donador. Y además, es observacional por sólo medir la actividad mediada por NK y no intervenir, ni modificar los factores que intervienen en ella.

## VIII. POBLACIÓN

Los criterios que se tomaron en cuenta para elegir a la población a estudiar fueron: se incluyeron a todos aquellos donadores sanos del banco de sangre que fueran seronegativos o positivos al HCMV, y se excluyeron a aquellos que no cumplieran las normas para ser donador.

Tritón X-100. El control I es la medición de LDH liberada de la población enriquecida de células NK en ausencia de células blanco. Todas las determinaciones fueron colocadas en placa de 96 pozos y por triplicado. Posteriormente fue incubada por 6 h a 37°C a una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Consumado el tiempo, la placa se centrifugó a 250 g por 10 min y se retiraron 100 µL de sobrenadante, pasándolos a una nueva placa. Para la determinación de la actividad citotóxica, se cuantificó la cantidad de LDH liberada al medio, empleando un kit comercial de citotoxicidad que se fundamenta en la reducción de tetrazolio (color amarillo) a formazán (color rojo) por la producción de NADH + H<sup>+</sup> derivado de la acción catalítica de la LDH. La reacción fue bloqueada después de 30 minutos por adición de 50 µL de solución de HCl 1N. Y se midió la absorbancia de las muestras a 492 nm.

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad mediada por células, se calculó restando a todos las lecturas la absorbancia obtenida del control fundamental, y se substituyeron en la siguiente ecuación:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \frac{(\text{mezcla E:B - control I}) - \text{control bajo}}{\text{control alto - control bajo}} \times 100$$

## VII. TIPO DE ESTUDIO

La participación de las células NK en el control de la infección por HCMV es un estudio prospectivo, debido a que la información será recabada después de observar la actividad citotóxica de NK sobre las células infectadas por HCMV. Es descriptivo por que el estudio sólo involucra donadores sanos del banco de sangre. De acuerdo a su evolución es transversal ya que la actividad citotóxica sólo se mide una vez en cada donador. Y además, es observacional por sólo medir la actividad mediada por NK y no intervenir, ni modificar los factores que intervienen en ella.

## VIII. POBLACIÓN

Los criterios que se tomaron en cuenta para elegir a la población a estudiar fueron: se incluyeron a todos aquellos donadores sanos del banco de sangre que fueran seronegativos o positivos al HCMV, y se excluyeron a aquellos que no cumplieran las normas para ser donador.

Tritón X-100. El control I es la medición de LDH liberada de la población enriquecida de células NK en ausencia de células blanco. Todas las determinaciones fueron colocadas en placa de 96 pozos y por triplicado. Posteriormente fue incubada por 6 h a 37°C a una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Consumado el tiempo, la placa se centrifugó a 250 g por 10 min y se retiraron 100 µL de sobrenadante, pasándolos a una nueva placa. Para la determinación de la actividad citotóxica, se cuantificó la cantidad de LDH liberada al medio, empleando un kit comercial de citotoxicidad que se fundamenta en la reducción de tetrazolio (color amarillo) a formazán (color rojo) por la producción de NADH + H<sup>+</sup> derivado de la acción catalítica de la LDH. La reacción fue bloqueada después de 30 minutos por adición de 50 µL de solución de HCl 1N. Y se midió la absorbancia de las muestras a 492 nm.

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad mediada por células, se calculó restando a todos las lecturas la absorbancia obtenida del control fundamental, y se substituyeron en la siguiente ecuación:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \frac{(\text{mezcla E:B} - \text{control I}) - \text{control bajo}}{\text{control alto} - \text{control bajo}} \times 100$$

## VII. TIPO DE ESTUDIO

La participación de las células NK en el control de la infección por HCMV es un estudio prospectivo, debido a que la información será recabada después de observar la actividad citotóxica de NK sobre las células infectadas por HCMV. Es descriptivo por que el estudio sólo involucra donadores sanos del banco de sangre. De acuerdo a su evolución es transversal ya que la actividad citotóxica sólo se mide una vez en cada donador. Y además, es observacional por sólo medir la actividad mediada por NK y no intervenir, ni modificar los factores que intervienen en ella.

## VIII. POBLACIÓN

Los criterios que se tomaron en cuenta para elegir a la población a estudiar fueron: se incluyeron a todos aquellos donadores sanos del banco de sangre que fueran seronegativos o positivos al HCMV, y se excluyeron a aquellos que no cumplieran las normas para ser donador.

## IX. RESULTADOS.

Previas investigaciones realizadas sobre el efecto de la infección por HCMV en la disminución de la expresión de moléculas MHC de clase I, han demostrado que protege contra la respuesta citotóxica mediada por CTLs. Sin embargo, teóricamente esto favorece la participación de las células NK, por sus propiedades de reconocer y eliminar células que han perdido la expresión de las moléculas de clase I. Para analizar este evento se obtuvieron poblaciones enriquecidas de células NK de donadores sanos seropositivos o seronegativos al HCMV y posteriormente se emplearon como células efectoras hacia células U-937 y MRC-5 en las cuales se ha demostrado que una infección por el HCMV es capaz de disminuir la expresión del MHC-I.

### A. Las líneas celulares MRC-5 y U-937 se infectarán por el HCMV.

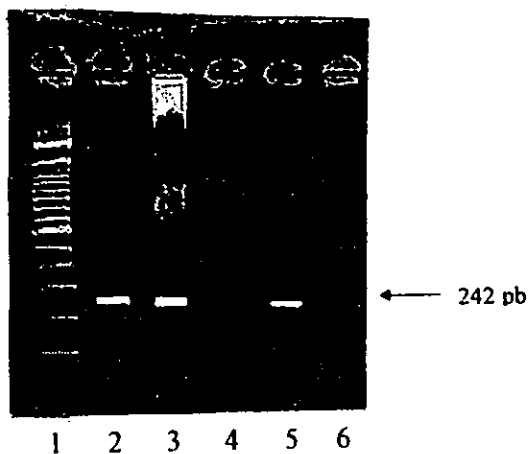
Los fibroblastos MRC-5 y los monocitos U-937 se infectaron con 100 MOI de HCMV. Para evidenciar la infección, se amplificó por PCR un fragmento del gen IE-1 del virus en el DNA de las células infectadas y se detectó su expresión por inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo con el anticuerpo monoclonal L-14. Células no infectadas se utilizaron como control. Los productos de amplificación, se visualizaron por corrimiento electroforético en geles de agarosa al 2 % (figura 8). En las muestras de células MRC-5 con 24 y 96 hs post-infección y monocitos U-937 a 24 hs post-infección, se encuentra una banda de aproximadamente 242 pb que corresponde al tamaño esperado del fragmento del gen IE-1.

La expresión de la proteína IE-1 en monocitos infectados se evidenció por FACS utilizando el mAb L-14 observándose un incremento en la fluorescencia de las células infectadas (figura 9).

### B. La infección por HCMV en fibroblastos MRC-5 y monocitos U-937 disminuye la expresión de las moléculas MHC-I.

Un paso fundamental para la realización de este trabajo, es verificar que la infección por HCMV disminuya la expresión del MHC-I en fibroblastos MRC-5 y monocitos U-937. Característica necesaria para ser reconocida como célula blanco por las células NK. Para lo cual se realizó una cinética de expresión de moléculas del MHC-I por citofluorometría de

flujo, a las 24, 48, 72 y 96 hs post-infección, empleando el mAb W6/32 y un conjugado anti-IgG de ratón fluoresceinado. En la figura 10 se puede observar la disminución de las moléculas de clase I desde las 24 hs post-infección y gradualmente conforme aumenta el tiempo de infección, hasta alcanzar más del 50 % de disminución a las 96 hs post-infección con relación a las células no infectadas del tiempo cero.



**Figura 8.** Identificación del gen IE-1 por PCR en DNA de fibroblastos MRC-5 y monocitos U-937 infectados por HCMV. Corrimiento electroforético de los productos de PCR en gel de agarosa al 2%. En el primer carril corresponde a los patrones de peso molecular de DNA (escala de 100 pb). Los carriles 2 y 3 representan fibroblastos MRC-5 a 24 y 96 hs post-infección con 100 MOI del HCMV; mientras que en el carril 5 se encuentra una muestra de monocitos U-937 a 100 MOI con un tiempo de infección de 24 hs. En el carril 4 se presenta el amplificado de una muestra de fibroblastos MRC-5 sin infectar, y el carril 6 los reactivos empleados para la realización de PCR sin muestra de DNA.

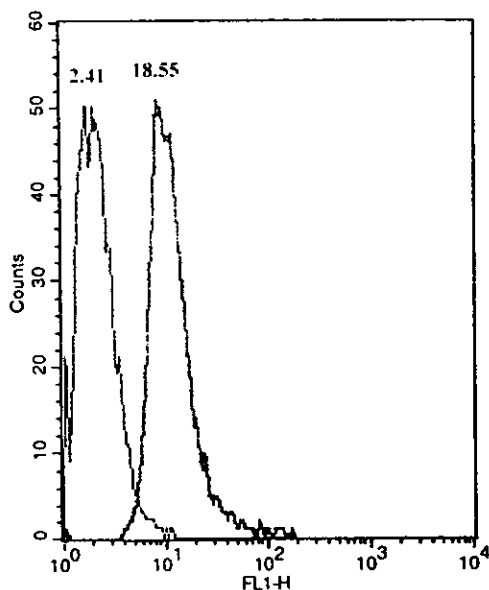


Figura 9. Detección por FACS de la proteína IE-1 del HCMV en monocitos U-937 infectados por HCMV. Los histogramas representan el análisis realizado por citofluorometría de flujo, empleando el mAb L-14 dirigido contra la proteína IE-1 del HCMV. En el histograma se observan la población de monocitos U-937 sin infectar con una intensidad de fluorescencia de 2.41, del cual se encuentra desplazado hacia la derecha la muestra de monocitos U-937 a 100 MOI del HCMV con una intensidad de fluorescencia de 18.55.

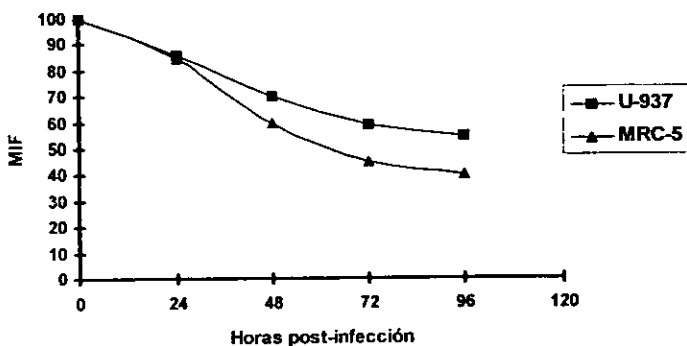


Figura 10. Disminución de las moléculas MHC-I de los fibroblastos MRC-5 y monocitos U-937 infectados por el HCMV. Las líneas celulares se infectaron o no por HCMV a 100 MOI durante 24, 48, 72, y 96 h. La determinación del MHC-I se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta, con el mAb W6/32 y un conjugado anti-IgG de ratón fluoresceinado. La gráfica representa las medidas de la intensidad de fluorescencia (MIF) contra el tiempo de infección.

### C. Estandarización del número de células blanco K-562, U-937 y MRC-5 para los ensayos de citotoxicidad.

La cantidad de células blanco utilizadas para los ensayos de citotoxicidad depende del tipo de línea celular, ya que cada una difiere en la cantidad de LDH que contiene intracelularmente y puede liberar al medio. Para establecer el número a utilizar en nuestros ensayos de citotoxicidad se realizó una curva con cada una de las líneas. Las células fueron incubadas por 6 hs y para obtener el máximo de liberación se lisaron con tritón. En la figura 11 se grafican la cantidad de LDH liberada espontáneamente y la máxima debida a la lisis por el tritón. Para las células K-562 y U-937, se eligió utilizar 7500 células por ser el punto en el que existe mayor separación entre la liberación máxima y la espontánea. Para los fibroblastos MRC-5 la cantidad óptima a emplear fué de 3000 células.

Una vez establecidas las condiciones de las células blanco a utilizar, se procedió a obtener las células efectoras de sangre periférica de donadores sanos.

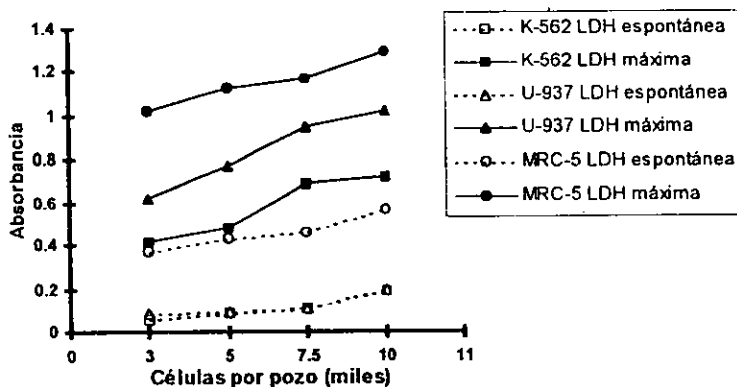


Figura 11. Determinación del número óptimo de células K-562, U-937 y MRC-5 para ser utilizadas como blanco en los ensayos de citotoxicidad.



#### **D. Obtención de la población enriquecida de células NK a partir de sangre periférica.**

Los concentrados leucocitarios de sangre periférica de donadores sanos, recibieron un tratamiento por gradiente de ficoll-hypaque, lo que permitió la eliminación de las células polimorfonucleares, los eritrocitos y las plaquetas. De la interface del gradiente formado, se obtuvo un paquete de células mononucleares, que fueron tratadas por diferentes técnicas para lograr el enriquecimiento del linaje de células NK.

**Monitoreo de eliminación de monocitos y linfocitos B.** La eliminación de los monocitos y linfocitos B se realizó por adherencia a las cajas de cultivo y columna de nylon como se describe en los métodos. En los resultados se observa que de las células mononucleares obtenidas del gradiente de Ficoll-Hypaque la cantidad de monocitos es de aproximadamente 0.04% (figura 12A) y para los linfocitos B es de 3.6% (figura 12C), al final del tratamiento 0.02% (figura 12B) y 1.69% (figura 12D) para Mn y linfocitos B respectivamente, los marcadores empleados para su detección fueron anticuerpos marcados con fluoresceína, dirigidos contra CD14 para Mn y el CD19 para linfocitos B.

**Porcentaje de linfocitos T durante el tratamiento.** La población de linfocitos T CD4 y CD8 se rastreó por inmunofluorescencia directa mediante el empleo de anticuerpos marcados dirigidos contra estos marcadores. Los porcentajes de linfocitos T para cada subpoblación antes del tratamiento de las células mononucleares (figura 13aA) son: 21.64% para CD8 y 52.38% para CD4; después de la adherencia (figura 13aB) son: para CD8 26.22% y para CD4 54.13%. Después del tratamiento de eliminación por columna de nylon la cantidad de la población de linfocitos T no se altera: 26.50% para CD8 y 54.69% para CD4 (figura 13aC). Finalmente después de la técnica de formación de rosetas, se logra observar que prácticamente la población CD4 ha sido eliminada (figura 13aD y figura 13bA), quedando sólo el 0.81%.

Al parecer la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> se ha enriquecido al final del tratamiento (figura 13aD) hasta en un 60.29%, sin embargo, el marcador CD8 también lo poseen las células NK en un 30-40% de la población. Por tal motivo, para comprobar la eliminación de los linfocitos T se utilizó otro mAb al no contarse con un anticuerpo contra el CD3, se empleó

el anticuerpo que reconoce el receptor CD5 el cual también es un Pan para la identificación de los linfocitos T. Se presenta el histograma B de la figura 13b, de donde se muestra que existían linfocitos T en un 73.62% y después del proceso de eliminación por rosetas quedan el 3.75% de ellos.

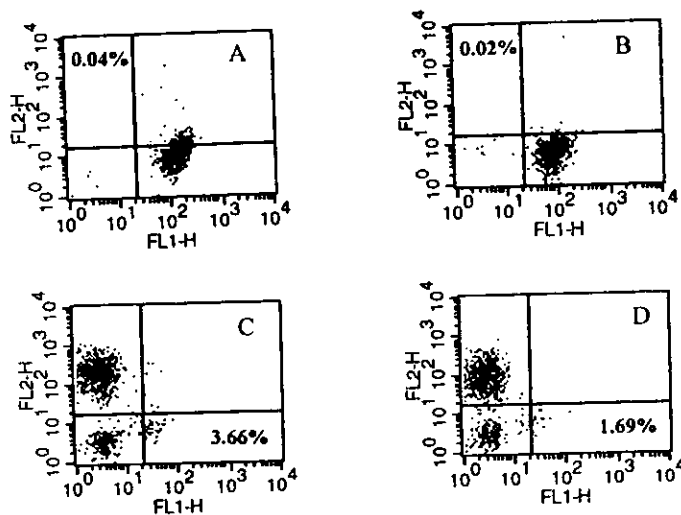


Figura 12. Determinación por FACS del porcentaje de eliminación por adherencia y columna de nylon de monocitos y linfocitos B. (A) es el porcentaje de Mn en las células mononucleares y (B) porcentaje de Mn después del tratamiento. (C) porcentaje de linfocitos B en las células mononucleares y (D) porcentaje de linfocitos B luego del tratamiento. Las poblaciones fueron identificadas por conjugados dirigidos contra sus marcadores de superficie: CD14 (Eje y) para Mn, y el CD19 (Eje x) para linfocitos B.

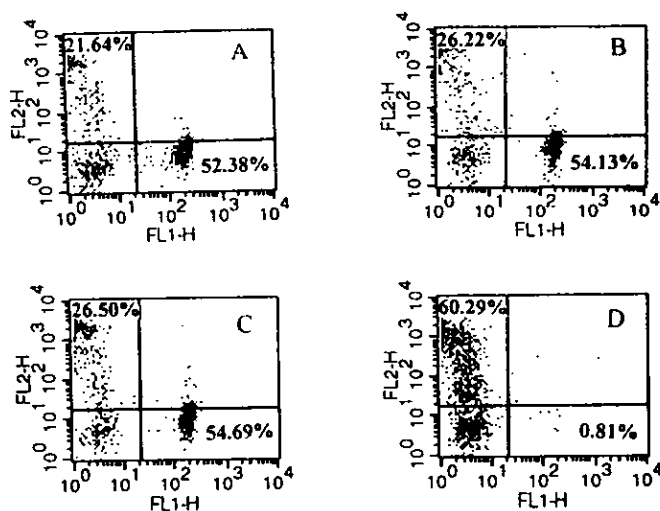


Figura 13a. Determinación por FACS del porcentaje de eliminación por formación de rosetas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T se determinaron empleando conjugados marcados con FITC para el receptor CD4<sup>+</sup> (Eje de las x) y PE para el receptor CD8<sup>+</sup> (Eje de las y). Los porcentajes son las lecturas de las subpoblaciones después de cada etapa, (A) células mononucleares después del gradiente de Ficoll-Hypaque, (B) después de la adherencia en placa, (C) después de columna de nylon, y (D) después de la formación de rosetas.

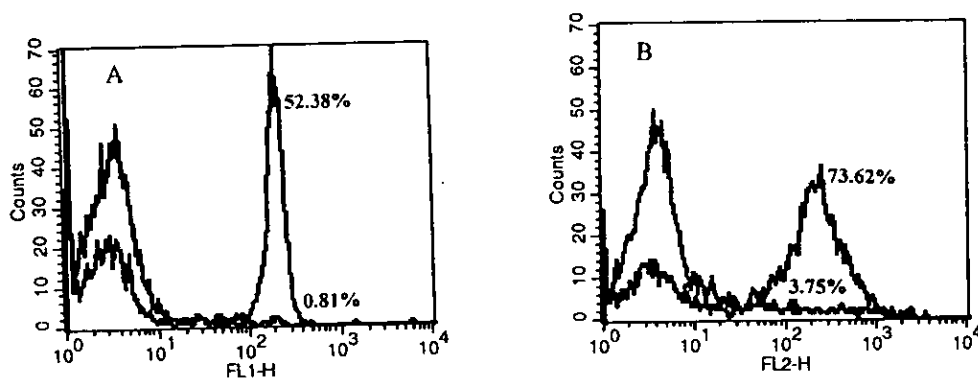


Figura 13b. Porcentaje de eliminación de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. El traslape de los histogramas son el monitoreo de los linfocitos T antes y después del tratamiento de las células mononucleares, representando la intensidad de fluorescencia que corresponde al número de células con el mismo marcador, se determinó por conjugados marcados con FITC para CD4<sup>+</sup> (figura A) y PE para CD8<sup>+</sup> (figura B).

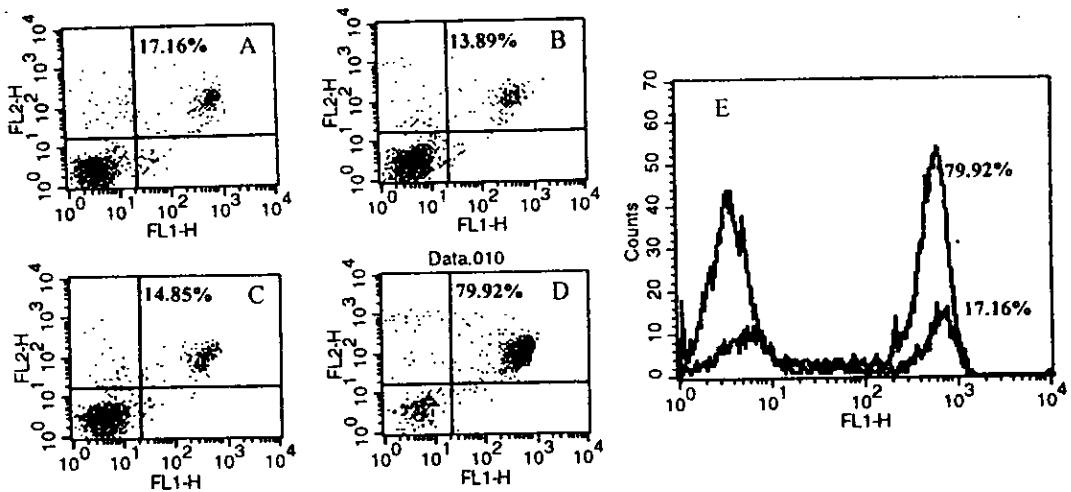
**Porcentaje de enriquecimiento de las células NK.** La población de células NK, se identificó a través de los marcadores fenotípicos CD16 y CD56 por citofluorometría de flujo directa. Antes de los tratamientos para eliminar monocitos, linfocitos B y T, el porcentaje de NK fué de 17.16 (figura 14A), después de la adherencia en caja de cultivo y en columna de nylon existen 13.89 % (figura 14B) y 14.85% (figura 14C) respectivamente. La técnica que fué fundamental para el obtener la población enriquecida de NK es la formación de rosetas T, ya que al final de ésta etapa se logró un enriquecimiento de un 79.92% de NK (figura 14D y 14E).

**E. La población enriquecida de las células NK mostró actividad citotóxica sobre la línea celular K-562.**

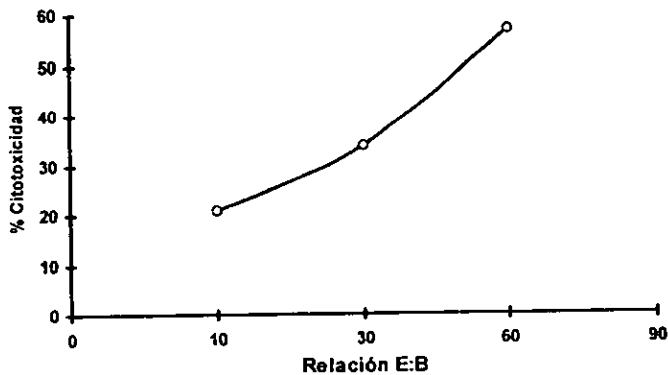
Una vez obtenida la población enriquecida células NK, fué necesario verificar su funcionalidad citotóxica para ser empleadas como células efectoras hacia las células MRC-5 y U-937 infectadas con el HCMV. Lo anterior se comprobó empleándose células K-562 (7500 células por pozo) las cuales son blancos conocidos de las células NK por carecer de moléculas MHC-I sobre su membrana citoplásmica. Los ensayos se realizaron a una relación efectora:blanco de 10:1, 30:1, y 60:1, durante un tiempo de incubación de 6 h, tiempo necesario para que las células NK ejerzan su actividad citotóxica. Los porcentajes presentados en la figura 15 nos indican que la población enriquecida de NK desarrolló actividad citotóxica hacia las células K-562, comprobada por la liberación de la enzima LDH al medio.

**F. La población enriquecida de células NK poseen baja o nula actividad citotóxica sobre células MRC-5 y U-937 infectadas por HCMV.**

Para estudiar el rol de las células NK durante la infección por HCMV, monocitos U-937 a 96 hs post-infección con 100 MOI del HCMV, se expusieron a la acción citotóxica de la población enriquecida de NK de 5 diferentes individuos, como se describe en los métodos.



**Figura 14.** Determinación por FACS del enriquecimiento de la población celular NK  $CD16^+CD56^+$  obtenida por selección negativa. El porcentaje de células NK se determinó eligiendo a la población doble positiva en los marcadores  $CD16^+$  (FITC) y  $CD56^+$  (PE) presentada en el cuadrante II de las figura (A) células mononucleares obtenidas del gradiente por Ficoll-Hypaque, (B) después de adherencia en placa, (C) después de columna de nylon y (D) después de la formación de rosetas. En el histograma de la figura (E) se encuentran los porcentajes la población doble positiva de células NK antes y después del tratamiento.



**Figura 15.** Actividad citotóxica de la población enriquecida de NK sobre la línea celular K-562. La actividad citotóxica mediada por NK fué medida incubando las células durante un tiempo de 6 hs, a una atmósfera de 0.5% de  $CO_2$  y  $37^\circ C$ , y midiendo la actividad de la enzima LDH liberada al medio.

Se observó que la disminución de las moléculas MHC-I fue alrededor del 50%. De estos ensayos, solo la población enriquecida de NK de los donadores 2 y 5 presentaron actividad citotóxica parcial hacia las células infectadas; siendo para el paciente 2 de 18.72% (figura 16) en una relación efectoras:blanco de 60:1; mientras que para el paciente 5 fue de 9.88% (figura 17). Para los donadores 1, 3, y 4 la actividad lítica mediada por las células NK es nula. En ningún ensayo se observó citotoxicidad hacia células no infectadas.

Para los fibroblastos MRC-5 infectados con 100 MOI de virus, se utilizaron 3000 células como blanco, realizándose los ensayos de citotoxicidad bajo las mismas condiciones que para las células U-937. Se estudiaron las poblaciones enriquecidas de 4 donadores (numerados 6, 7, 8 y 9), solamente el donador número 8 presentó actividad citotóxica de 19.22% en la relación 60:1 de efectoras:blanco (figura 18).

**G. Mayores tiempos de infección por HCMV sobre fibroblastos MRC-5, incrementa la disminución de las moléculas MHC I, y aumenta la actividad lítica mediada por NK en el donador 8.**

Debido a que de las moléculas del MHC-I disminuyen conforme aumenta el tiempo de infección, se efectuó la infección de los fibroblastos MRC-5 hasta un tiempo de 288 hs. En los resultados presentados sobre la figura 19 se observa que en las células MRC-5 no infectadas la cantidad de MHC-I representada por unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia es de 276 (100% de expresión), pero a las 96 hs post-infección, la fluorescencia es de 157 (equivalente a 56.88% de expresión) y a las 288 hs post-infección es de 89 (equivalente a 32.24% de expresión), por lo tanto, disminuyó hasta en un 43% y en un 68% para cada tiempo post-infección respectivamente. Los ensayos de citotoxicidad se aplicaron para estos tiempos con la población enriquecida de las células NK de los donadores 8 y 9 presentados en la figura 20, observándose que para el donador 8 entre más disminuyen las moléculas de clase I más aumenta la actividad citotóxica mediada por NK, en la relación efectoras:blanco de 60:1 a 96 hs post-infección es de 19.22% y a 288 hs post-infección resulta de 32.15%. Sin embargo para el donador 9 resultan nulos en ambos tiempos de infección.

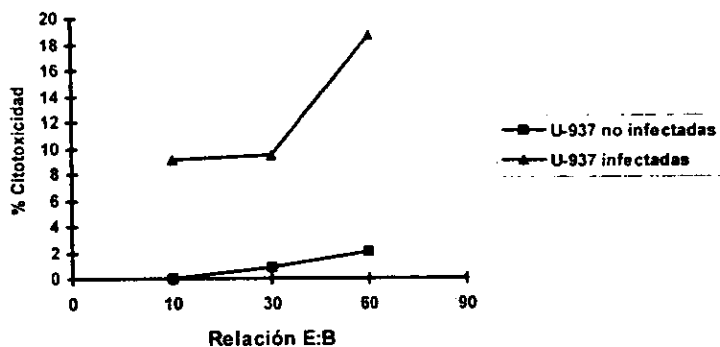


Figura 16. Actividad citotóxica de la población enriquecida de NK del donador 2 sobre monocitos U-937 infectados por HCMV. La actividad citotóxica se determinó después de 6 hs de incubación efectoras:blanco, midiendo la cantidad de la enzima LDH liberada al medio, las cuales se expresan en por ciento de citotoxicidad.

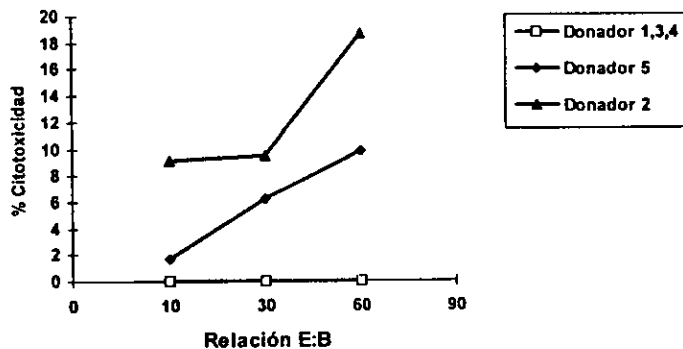


Figura 17. Ensayos de la actividad citotóxica de la población enriquecida de NK de los donadores 1-5 sobre monocitos U-937 infectados por HCMV. En todos los casos se expusieron células U-937 no infectadas e infectadas con 100 MOI del HCMV, en las condiciones que se mencionan en los métodos. Las curvas son la actividad citotóxica de la población enriquecida de NK sobre las células U-937 infectadas, la citotoxicidad sobre las células U-937 no infectadas es de cero.

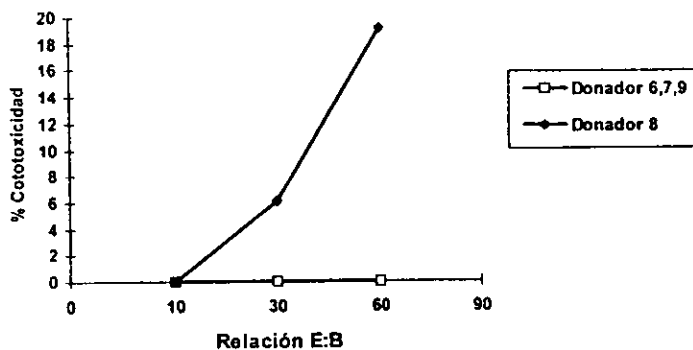


Figura 18. Actividad citotóxica de la población enriquecida de NK de los donadores 6-9 sobre fibroblastos MRC-5 infectados por HCMV. La actividad citotóxica de la población enriquecida de NK de estos donadores fue determinada después de 6 hs de incubación sobre fibroblastos MRC-5 con 96 hs de infección con 100 MOI del HCMV.



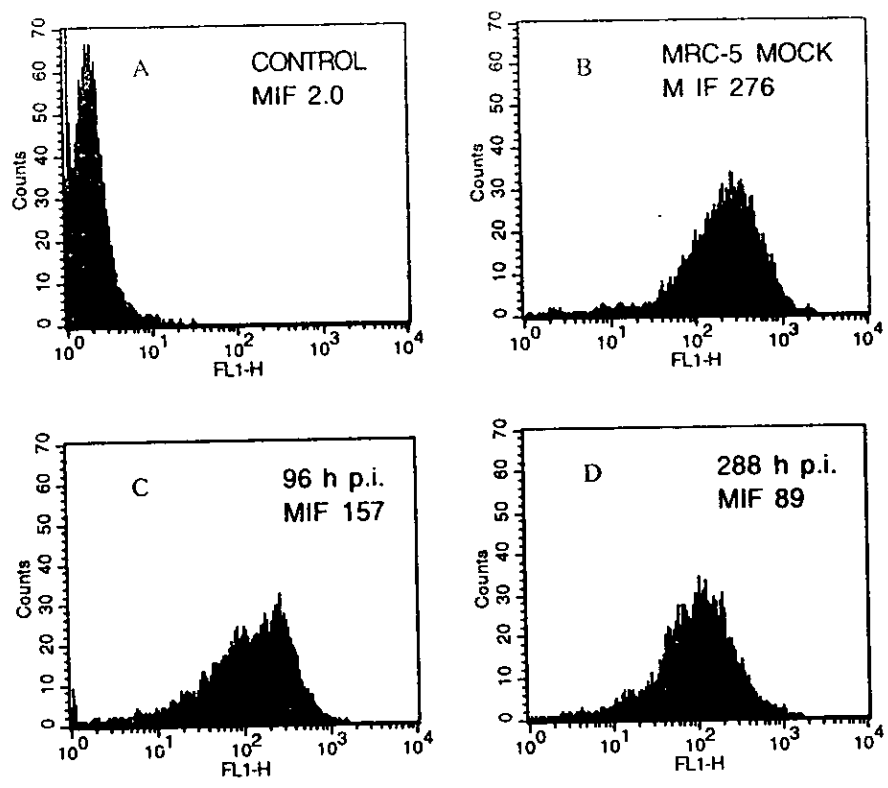


Figura 19. Disminución de las moléculas MHC-I sobre fibroblastos MRC-5 a 96 y 288 hs post-infección con el HCMV. Células MRC-5 infectadas y sin infectar se tiñeron con el mAb W6/32 y un conjugado fluoroseinado. (A) control negativo, (B) mock, (C) 96 hs post-infección y (D) 288 hs post-infección.

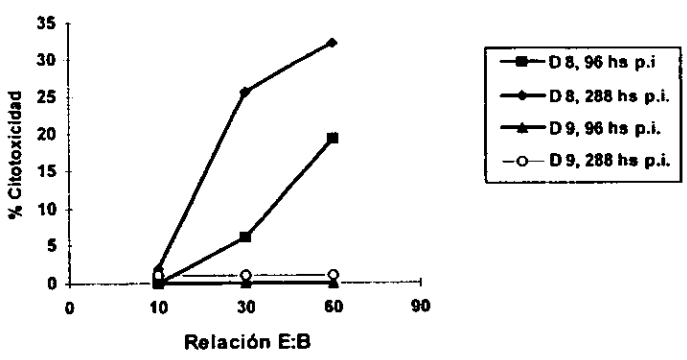


Figura 20. Actividad citotóxica de la población enriquecida de NK de los donadores 8 y 9 realizados sobre fibroblastos MRC-5 a 96 y 288 hs post-infección. La actividad citotóxica se realizó bajo las condiciones mencionadas en los métodos.

### H. El estado serológico contra el HCMV no posee participación sobre la actividad citotóxica de NK.

En la figura 21 se enlistan los 9 ensayos de citotoxicidad realizados sobre las líneas celulares U-937 y MRC-5, donde se enmarca el estado serológico de cada individuo. Para tal propósito, con el apoyo del Laboratorio Clínico del Hospital Central Militar se determinó la presencia sérica de IgG e IgM contra el virus por ELISA. Como se observa en la tabla, el estado serológico del individuo no se relaciona con una mayor actividad citotóxica mediada por las células NK. Así, se observa que algunos donadores seropositivos (1, 3 y 9) no desarrollaron citotoxicidad, mientras que en el donador 8 que fue seronegativo al HCMV, se observó actividad citotóxica contra las células infectadas por el HCMV.

Donador	% Citotoxicidad			T (h)	IgG	IgM
	10	30	60			
1	0.0	0.0	0.0	6	+	-
2	9.11	9.49	18.72	6	+	-
3	0.0	0.0	0.0	6	+	-
4	0.0	0.0	0.0	6	-	-
5	1.66	6.19	9.88	6	+	-
6	0.0	0.0	0.0	6	-	-
7	0.0	0.0	0.0	6	-	-
8	0.0	6.11	19.22	6	-	-
9	0.0	0.0	0.0	6	+	-

Figura 21. Resumen de los ensayos de la actividad citotóxica de la población enriquecida de NK y el estado serológico de los donadores. Se midió la actividad citotóxica de la población enriquecida de NK de los donadores 1-5 contra células U-937, y la de, los donadores 6-9 fue contra fibroblastos MRC-5. En todos los casos la infección de las células se realizó a 100 MOI con el HCMV. El estado serológico del donador se midió empleando un kit de ELISA específico para rastrear anticuerpos anti-HCMV.

## X. DISCUSIÓN.

En la resolución de las infecciones por virus, participan todas las estirpes celulares que conforman el sistema inmune. Primeramente, los Mn/M $\phi$  y PMN median la destrucción del virus por fagocitosis; las células profesionales presentadoras de antígenos procesan y presentan el antígeno a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, los cuales se activan e inician la respuesta inmune específica, participando en la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos, los cuales neutralizan a los virus, y los opsonizan para favorecer su fagocitosis. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> además producen citocinas con carácter antiviral (TNF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ ) y activan a los T CD8<sup>+</sup> para que lisen a las células infectadas por virus.<sup>1-5</sup> A pesar de todas las funciones antivirales de las células mencionadas, las células NK tienen una participación muy importante en el control de infecciones virales, pues individuos con deficiencias en esta subpoblación celular no controlan las infecciones.<sup>10</sup> Las células NK representan la primera línea de defensa en las infecciones virales por su característica de activarse sin previa sensibilización o reconocimiento del antígeno y además, por responder rápidamente al interferón activándose y dando origen a las células LAK con potenciadas propiedades antivirales.<sup>11-14</sup>

Aun cuando el hombre posee un sistema inmune que le permite controlar o eliminar las infecciones por virus, estos han desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune, al citomegalovirus humano se le han descrito el mayor número de estrategias de evasión. Uno de los principales mecanismos de evasión, es la disminución de las moléculas de histocompatibilidad de clase I,<sup>70-78</sup> evento que evita la lisis por linfocitos T CD8<sup>+</sup>, pero que hace blanco de actividad NK a la célula infectada.<sup>20</sup> En este trabajo se estudió la participación de la actividad citotóxica mediada por células NK en células infectadas por HCMV con disminución de la expresión de las moléculas del MHC-I.

Para estudiar la participación de las células NK en el control de la infección por el HCMV, se realizaron ensayos de citotoxicidad utilizando fibroblastos MRC-5 o monocitos U-937 infectados como células blanco y poblaciones enriquecidas de NK de donadores sanos como células efectoras. Se eligieron dos tipos de células blanco por presentar características

diferentes de infección, los fibroblastos MRC-5 que son permisivos (completan el ciclo infectivo) y los monocitos U-937 donde la infección es abortiva.<sup>55-59</sup> No obstante, en ambas líneas celulares se observa la disminución de las moléculas MHC-I desde las 24 hs post-infección, misma que se prolonga conforme pasa el tiempo de la infección, alcanzándose una disminución aproximadamente del 50% a las 96 hs post-infección. La infección se evidenció por la expresión del gen IE-1 en monocitos U-937 a las 24 hs post-infección medianter FACS y amplificación de un fragmento de 242 pb del gen IE-1 por PCR del DNA de las células infectadas.

La otra parte fundamental de este estudio, fue la obtención de células efectoras de sangre periférica de donadores sanos por un tratamiento secuencial de selección negativa. Inicialmente un gradiente de ficoll-hypaque permitió excluir a las células polimorfonucleares, eritrocitos y plaquetas, seguido de adherencia y paso por columna de nylon para la eliminación de Mn/M $\phi$  y linfocitos B. Finalmente, formación de rosetas para eliminar a los linfocitos T, lo cual resultó ser el paso decisivo, pues después de la eliminación de monocitos y linfocitos B el porcentaje de células NK se mantuvo prácticamente igual, sin embargo, después de las rosetas se obtuvo aproximadamente 80% de células NK, de 17% iniciales.

Los porcentajes de las poblaciones se determinaron utilizando anticuerpos monoclonales contra receptores de superficie característicos de cada subpoblación. Así, se utilizó CD19 para linfocitos B, CD14 para monocitos, CD5 para linfocitos T en los cuales además se determinaron las subpoblaciones CD4, CD8 y finalmente para NK CD16 y CD56. Es de resaltar que la población CD4<sup>+</sup> fue eliminada prácticamente, pero la de CD8<sup>+</sup> se incrementó hasta un 60 %. El receptor CD8<sup>+</sup> se presenta en linfocitos T citotóxicos y células NK, los primeros además son CD5<sup>+</sup>, dado que esta población fue eliminada casi completamente, el porcentaje aumentado de CD8<sup>+</sup> debe corresponder a las células NK (las cuales se aumentaron porcentualmente). Para verificar lo anterior se requiere de un doble marcaje con CD8 y CD16 ó CD56 lo cual fue técnicamente imposible, puesto que los anticuerpos están conjugados al mismo fluorocromo.

Por otra parte, la población enriquecida en NK resultó funcionalmente citotóxica, como lo demuestra la lisis observada de células K 562, las cuales son un blanco natural de NK por no expresar moléculas de histocompatibilidad de clase I en su superficie.

Para realizar los ensayos de citotoxicidad fue necesario determinar el número ideal de células blanco a ser utilizado, pues el estudio se basa en la liberación de la enzima LDH, la cual se encuentra en diferentes cantidades en los diferentes tipos de células.

De las nueve poblaciones enriquecidas de células NK, las de los donadores 1-5 se emplearon contra los monocitos U-937 y las de los donadores 6-9 sobre fibroblastos MRC-5. ambas líneas celulares infectadas a una dosis de alta multiplicidad de infección. De los ensayos realizados sobre los monocitos U-937, solo dos de cinco presentan actividad citotóxica parcial, pues se observaron valores bajos de citotoxicidad ( $<20$ ) y únicamente en la mayor relación de efectora/blanco (60:1). Para el caso de las MRC-5 se observaron resultados similares, pues sólo se observó citotoxicidad parcial en uno de cuatro donadores. Una posible explicación a esta baja citotoxicidad es la incompleta eliminación de la expresión de moléculas de histocompatibilidad, por tal motivo se realizaron ensayos adicionales utilizando como células blanco fibroblastos MRC-5 con mayor tiempo de infección (288 hs), en donde se observó un aumento en la disminución de moléculas de histocompatibilidad ( $\approx 70\%$ ). Bajo ninguna otra condición de infección se puede aumentar el porcentaje de disminución de moléculas de histocompatibilidad pues el virus no es capaz de eliminar completamente la expresión de dichas moléculas. No se utilizaron los monocitos U-937 infectados a 288 hs como blanco porque la infección en ellos es abortiva. En estas condiciones se realizaron dos ensayos, uno con población enriquecida de NK sin actividad lítica contra las células infectadas a las 96 hs, el resultado fue igual al de las 288 hs. El otro ensayo se realizó con la población celular del donador 8 que había mostrado un 19.22% de citotoxicidad sobre células blanco de 96 hs post-infección, observándose un incremento de la actividad lítica hasta de 32.15%. Es notable que aunque todos los ensayos se realizaron en las mismas condiciones, existen poblaciones enriquecidas de NK que presentan actividad citotóxica, mientras que otras no, lo que hace suponer que durante el reconocimiento de la célula blanco por las NK, pueden estar involucradas otras moléculas de la superficie de la célula blanco, además de la pérdida del MHC-I.

Por otra parte, se estudió el estado serológico contra el HCMV de los donadores, para determinar alguna infección previa del individuo. Ningún donador fue positivo a IgM lo que indica que nadie padecía de infección aguda por HCMV al momento del ensayo. En tanto que

5 de 9 fueron positivos a IgG, indicando que habían padecido infección previa por el virus. Sin embargo, como es de esperarse, dicho estado no se involucra directamente con la actividad citotóxica mediada por las NK, pues las poblaciones enriquecidas de NK de los donadores 2 y 5 (seropositivos) y 8 (seronegativo) presentaron actividad lítica contra las células infectadas. Mientras que los donadores 1, 3 y 9 (seropositivos) y 4, 6 y 7 (seronegativos) no presentan actividad citotóxica contra las células infectadas por el HCMV.

Aunque no se ha demostrado que el virus sea capaz de bloquear la actividad NK en una infección *in vivo*, estudios realizados *in vitro* por el Dr. Hugh T Reyburn indican que el bloqueo de la actividad NK, está mediado por la proteína UL-18 que participa uniéndose al receptor inhibitor CD94.<sup>82</sup> Sin embargo, resultados posteriores publicados por el Dr. David Cosman, proponen otro ligando para la proteína UL-18, el receptor inhibitor llamado LIR-1<sup>84</sup> el cual inhibe la actividad lítica de las células NK. Estas publicaciones hacen suponer que durante la infección por el HCMV, el virus evade la respuesta de los linfocitos TCD8<sup>+</sup> disminuyendo la expresión de las moléculas MHC-I, y que para evadir la respuesta citotóxica mediada por las células NK, se expresa la proteína UL18 que tiene homología con el MHC-I. Sin embargo, los estudios mencionados se realizaron transfectando el gen UL-18, lo que permite que la proteína se exprese mucho más de lo que naturalmente lo haría. Estudios posteriores, publicados por Grundy JE y col. (1998) y Leyner LL y col (1998), hacen controversial la posible inhibición de la actividad de NK mediada por HCMV, debido a que los primeros obtienen que la inhibición depende de la cepa de HCMV<sup>85</sup> y los segundos indican que el HCMV no es capaz de bloquear la actividad citotóxica de NK.<sup>86</sup> No obstante, ambos trabajos indican que no hay participación de la proteína UL-18 propuesta por Reyburn y Cosman. Leyner por su parte muestra que la proteína UL-18 se expresa a las 72 hs durante una infección *in vitro* y que al contrario de proteger a las células transfectadas con el gen UL-18 las hace más susceptibles de actividad citotóxica mediada por NK. A pesar de que ambos trabajos resultan un tanto contradictorios, los dos proponen que durante el reconocimiento de las células blanco por parte de las células NK, no sólo están involucrados los KIR y los KAR, sino que, para que se de un pleno reconocimiento y eliminación de la célula infectada están

involucradas otras moléculas de superficie tanto de las células blanco, como de la misma NK: entre ellas están las moléculas de adhesión.

Finalmente, nuestros resultados parecen indicar cierto bloqueo de la actividad lítica de las células NK por parte de las células infectadas. Dicho evento puede tener dos explicaciones: a) que las moléculas MHC-I que permanecen en la superficie de la membrana celular durante la infección, sean suficientes para inactivar a las células NK. Sin embargo, células que fueron resistentes a la citotoxicidad y susceptibles poseen valores semejantes de disminución de la expresión de moléculas del MHC-I y b) que el citomegalovirus humano posea alguna forma de evadir la respuesta inmune mediada por NK, en donde cabe la posibilidad de que la proteína viral UL-18 homóloga a la cadena pesada de clase I represente un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta inmune.

## XI. CONCLUSIONES.

1. El HCMV es capaz de disminuir la expresión de moléculas MHC-I, pero no evita la expresión en su totalidad.
2. En el proceso secuencial de selección negativa para enriquecer la población de células NK a partir de sangre periférica, el paso fundamental es la formación de rosetas para la eliminación de linfocitos T, lo que permite obtener porcentajes de enriquecimiento aproximados al 80 %.
3. El proceso de enriquecimiento de la población NK no altera su capacidad citotóxica pues se observó lisis de las células K-562.
4. Las células NK se obtuvieron de donadores sanos: 4 seronegativos y 5 seropositivos al HCMV. Observamos actividad lítica NK sobre células infectadas por HCMV en ambos, por lo que parece que el estado serológico del individuo no influye de manera directa en dicho evento.
5. La población enriquecida de NK posee parcial o nula actividad citotóxica sobre las células U-937 y MRC-5 infectadas por el HCMV.



## **XII. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES.**

En este trabajo, se ha observado que la actividad citotóxica de células NK es inhibida, lo que representaría un nuevo mecanismo de evasión del HCMV. Hasta ahora otros estudios sobre la inhibición de la actividad NK se mantiene controversial la posible participación de la proteína UL-18 como posible mecanismo para evadir la actividad citotóxica mediada por NK. Por lo tanto, es de gran interés continuar estos estudios para rastrear la proteína UL-18 durante el proceso natural de la infección y evaluar su posible función como inactivadora de células NK. Además, es de interés estudiar la participación de las moléculas de adhesión, las cuales se han considerado fundamentales para la actividad mediada por NK.

### XIII. ANEXOS.

#### REACTIVOS Y SOLUCIONES

##### 1. Kit de detección de citotoxicidad (LDH)

BOEHRINGER MANNHEIM.

Cat. No. 1 644 793.

Ensayo colorimétrico para la cuantificación de lisis celular, basado en la medición de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el sobrenadante debido al daño celular.

##### 2. Solución de Alsever:

Dextrosa	20,50 g
Citrato de sodio dihidratado	8,00 g
Ácido cítrico monohidratado	0,55 g
Cloruro de sodio	4,20 g
Agua destilada	1000,00 mL

La solución al aforarse debe estabilizarse a un pH final de 6.1 y ser esterilizada por membrana de filtración de 0.2  $\mu$ m. Esta solución es el medio de mantenimiento de los glóbulos rojos de carnero (GRC) en una proporción 1:1. Los GRC pueden mantenerse a 4°C por no más de cuatro semanas.

##### 3. Sensibilización de GRC con AET para rosetas.

Preparación del AET: Disolver 0,5 g de bromuro de 2-aminoetilisotiuronio (AET) en 12,5 mL de agua destilada. Ajustar a pH 9 con NaOH 4N. Esterilice por filtro 0,2  $\mu$ m. Prepárese el mismo día de su uso.

Sensibilización: Adicionar de 15 a 25 mL de GRC en un tubo de centrifuga de 50 mL y lavar con PBS 1X, 10 min/2100 rpm. Remover el sobrenadante y lavar de 2 a 3 veces más. Adicionar 8 mL de solución de AET a 2 mL de GRC del botón, incube 20 min a 37°C. Una vez pasando el tiempo adicionar PBS 1X y centrifugar 10 minutos a 1300 rpm, elimine el sobrenadante y lave dos veces más. Al final resuspender el botón en 48 mL de RPMI completo y guardar a 4°C (concentración final de GRC 4% vol/vol).

Para formar rosetas con linfocitos T se emplean  $4 \times 10^7$  células mononucleares con 4 mL de GRC al 4%.

##### 4. Amortiguador de lisis.

Cloruro de amonio (NH <sub>4</sub> Cl)	8,29 g
Bicarbonato de potasio (KHCO <sub>3</sub> )	1,0 g
Na <sub>2</sub> EDTA	37,2 mg

Adicionar 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 7,2-7,4 con HCl 1 N y aforar con agua hasta 1000 mL. Esterilizar por membrana de filtro 0,2  $\mu$ m y guardar a 4°C.

**5. Amortiguador de fosfatos PBS 1X.**

Cloruro de sodio (NaCl)	8,00 g
Cloruro de potasio (KCl)	0,20 g
Fosfato de sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Anh.)	1,15 g
Fosfato de potasio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,07 g

Disolver en agua destilada ajustando el pH a 7,2 y aforar a 1000 mL.

**6. Solución saturada de sulfato de amonio.**

Sulfato de amonio (NH <sub>3</sub> SO <sub>4</sub> )	761,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

Disolver lentamente sobre parrilla de agitación y almacenar a temperatura ambiente.

**7. Fenol saturado.**

Fenol al 100%	300 mL
Solución reguladora pH 8	200 mL

**8. Solución amortiguadora pH 8.**

2-mercaptoetanol 14,2 M	2 mL
Tris-HCl 1M pH 8	4 mL
NaOH 10 N	292,5 µL
Agua destilada	200 mL

**9. Mezcla fenol/cloroformo.**

1 parte de fenol saturado	100 mL
1 parte de cloroformo/alcohol isoamilico	100 mL

**10. Mezcla cloroformo/alcohol isoamilico.**

24 partes de cloroformo puro	240 mL
1 partes de alcohol isoamilico	10 mL

#### XIV. REFERENCIAS.

1. Whitton JL and Oldstone MBA. Immune response to viruses. En: Fields BN, Knipe DM, and Howley PM. Fields virology. 3a ed. USA: Lippincott-Raven Publishers, 1996: vol. 1:311-340.
2. Abbas AK, Lichtman AH, and Pober JS. Cellular and molecular immunology. 2a ed. USA: W.B. Saunders Company, 1994: 327-329.
3. Roit I, Brostoff J, and Male D. Immunology. 4a ed. Barcelona, Spain. Ed. Mosby, 1996: 16.1-16.6.
4. Male D, Cooke A, Owen Mc, Trowsdale J. and Champion B. Advanced immunology. London, Ed. Mosby, 1996: 7.1-7.15.
5. Stites DP, Terr AI, y Parslow TG. Inmunología básica y clínica. 8a. de México, DF:Ed. El manual moderno, 1996: 85-100.
6. Alp NJ, Allport TD, Zanten JV, Rodgers B, Sissons JGP, and Borysiewicz LK. Fine specificity of cellular immune responses in humans to human cytomegalovirus immediate-early 1 protein. *J Virol* 1991; **65**:4812-4820.
7. Britt WJ, and Alford CA. Cytomegalovirus. En: Fields BN; Knipe DM, Howley PM. Fields virology. 3a de. USA: Lippincott-Raven Publishers, 1996: vol. 2:2493-2523.
8. Davignon JL, Clément D, Alriquet J, Michelson S, and Davrinche C. Analysis of the proliferative T cell response to human cytomegalovirus major immediate-early protein (IE1): phenotype, frequency and variability. *Scand J Immunol* 1995; **41**:247-255.
9. Jahn G, Scholl BC, Traupe B, and Fleckenstein B. The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. *J Gen Virol* 1987; **68**:1327-1337.
10. Biron CA, Byron KS and Sullivan JS. Severe herpes virus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 1989; **320**:1731-1735.
11. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Advances in immunology*. 1989; **47**:187-302.
12. Robertson MJ, and Rits J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990; **76**(12):2421-2438.
13. See DM, Khemka P, Sahl L, Bui T, and Tilles JG. The role of natural killer cells in viral infections. *Sand. J Immunol*. 1997; **46**:217-224.
14. Timonen T. Natural killer cells: endothelial interactions, migration, and target cell recognition. *J Leukocyte Biology*. 1997; **62**:693-701.
15. Mori S, Jewett A, Murakami MK, Cavalcanti M, Bonavida B. The participation of the fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent. *Can. Imm Immunother*. 1997; **44**:282-290.
16. Nakazawa T, Agematsu K and Yabuhara A. Later development of fas ligand-mediated cytotoxicity as compared with granule-mediated cytotoxicity during the maturation of natural killer cells. *Immunology*. 1997; **92**:180-187.
17. Sashchenko LP, Kabanova OD, Lukyanova TI, Blishchenko EY, Satpaev DK, Pogor S, Gnuchev NV. Apoptotic and necrotic cytolytic processes induced by membrane associated proteins of LAK cells. *Imm Letters*. 1997; **59**:43-46.
18. Brutkiewicz RR and Welsh R.M. Major histocompatibility complex class I antigens and the control of viral infections by natural killer cells. *J Virol* 1995; **69**(7):3967-3971.

19. Biron C.A. Activation and function of natural killer cells responses during viral infections. *Curr Opin Immunol* 1997;9:24-34.
20. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11:237-244.
21. Lanier LL. Natural killer cell receptors and MHC class I interactions. *Curr Opin Immunol* 1997;9:126-131.
22. López BM, Carretero M, Pérez VJJ, Bellón T, Llano M. and Navarro F. The CD94/NKG2 C-type lectin receptor complex. *Imm Research*. 1997; 16(2):175-185.
23. Reyburn H, Davis DM. and Strominger J.L. Human NK cells: their ligands, receptors and functions. *Immunological Reviews* 1997;155:119-125.
24. Olcese L, Cambiaggi A, Semenzato G, Bottino C, Moretta A. and Vivier E. Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecule are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells. *J Immunology*. 1997; 158: 5083-5086.
25. Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, and Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature*. 1998; 391:703-707.
26. King A, Loke YW, and Chaouat G. NK cells and reproduction. *Immunology Today*. 1997; 18(2):64-66.
27. Mandelboim O, Pazmany L, Davis DM, Valés GM, Reyburn HT, Rybalow B, and Strominger JL. Multiple receptors for HLA-G on human natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94: 14666-14670.
28. Colonna M. Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors. *Imm Reviews* 1997;155:127-133.
29. Kurago ZB, Smith KD, and Lutz C. NK cell recognition of MHC class I. NK cells are sensitive to peptide-binding groove and surface  $\alpha$ -helical mutations that affect T cells. *J Immunology*. 1995; 154:2631-2641.
30. Binstadt BA, Brumbaugh KM, and Leibson PJ: Signal transduction by human NK cell MHC-recognizing receptors. *Imm Reviews*. 1997; 155:197-203.
31. Renard V, Cambiaggi A, Vély F, Bléry M, Olcese L, Olivero S, Bouchet M, and Vivier E. Transduction of cytotoxic signal in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Imm Reviews*. 1997; 155:205-221.
32. Vivier E, and Daeon M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today*. 1997; 18(6):286-291.
33. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16:359-393.
34. Liu CC, Persechini PM, and Young JD. Perforin and lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Imm Reviews*. 1995; 146:145-169.
35. Liu CC, Walsh CM, and Young JD. Perforin: structure and function. *Immunol Today*. 1995; 16(4):194-201.
36. Smyth MJ, Trapani JA. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today*. 1995; 16(4):202-206.
37. Moretta A. Molecular mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Cell*. 1997; 90:13-18.
38. Mach M, Stamminger T, and Jahn G. Human cytomegalovirus: recent aspects from molecular biology. *J Gen Virol* 1989; 70:3117-3146.

39. Chee M, Rudolph SA, Plachter B, Barrell B, and Jahn G. Identification of the major capsid protein gene of human cytomegalovirus. *J Virol* 1989; **63**:1345-1353.
40. Gretch DR, Kari B, Rasmussen L, Gehrz RC, and Stinski MF. Identification and characterization of three distinct families of glycoprotein complexes in the envelopes of human cytomegalovirus. *J Virol* 1988; **62**:875-881.
41. Spaete RR, Gehrz RC, and Landini MP. Human cytomegalovirus structural proteins. *J Gen Virol* 1994; **75**:3287-3308.
42. Mocarski ES. Cytomegaloviruses and their replication. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 3rd. de. Philadelphia: Lippincott-Reven Publishers, 1996: **2**:2447-2479.
43. Sinzger C. and Jahn G. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* 1996; **39**:302-319.
44. Compton T. Towards a definition of the HCMV entry pathway. *Scand J Infect Dis Suppl* 1995; **99**:30-32.
45. Keay S, and Baldwin B. Update on the 92.5 KDa putative HCMV fusion receptor. *Sand J Infect Dis Suppl* 1995; **99**:32-33.
46. Li L, Nelson JA, and Britt WJ. Glycoprotein H-related complexes of human cytomegalovirus identification of a third protein in the gCIII complex. *J Virol* 1997; **71**:3090-3097.
47. Yurochko AD, Hwang ES, Rasmussen L, Keay S, Pereira L, and Huang ES. The human cytomegalovirus UL55 (gB) and UL75 (gH) glycoprotein ligands initiate the rapid activation of Sp1 and NK- $\kappa$ B during infection. *J Virol* 1997; **71**:5051-5059.
48. Ahn JH, and Hayward GS. The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with an disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J Virol* 1997; **71**:4599-4613.
49. Spector DH. Activation and Regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology* 1996; **39**:361-377.
50. Irmiere A, and Gibson W. Isolation of human cytomegalovirus intranuclear capsids, characterization of their protein constituents, and demonstration that the B-capsid assembly protein is also abundant in noninfectious enveloped particles. *J Virol* 1985; **56**:277-283.
51. Gibson W. Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 1996; **39**:389-400.
52. Britt WJ, and Mach M. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* 1996; **39**:401-412.
53. Ho M. Cytomegalovirus. *Biology and infection*. 2da de. NY: Plenum Medical, 1982: 75-98.
54. Mins, *Microbiología médica*. España: Mosby-Doyma Libros, 1995: 520.
55. Sánchez CP, Pelayo CR. Múltiples estrategias de evasión de la respuesta inmune por citomegalovirus humano: Mecanismos moleculares. *LAB-acta* 1996; **8**(3):65-73.
56. Taylor-WJ, Sissons P and Sinclair J. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J Virol*. 1994; **68**(3):1597-1604
57. Kondo K, Xu J, and Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**:11137-11142.
58. Sinclair J, and Sissons P. Latent and persistent infections of monocytes and macrophages. *Intervirology* 1996; **39**:293-301.

59. Soderberg NC, Fih KN, and Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 1997; **91**:119-125.
60. Rakusan TA, Juneja H, and Fleischmann WR. Inhibition of hemopoietic colony formation by human cytomegalovirus *in vitro*. *J Inf Dis* 1989; **159**:127-130.
61. Schrier RD, Rice GPA, and Oldstone MBA. Suppression of natural killer cell activity and T cell proliferation by fresh isolates of human cytomegalovirus. *J Inf Dis* 1986; **153**:1084-1091.
62. Buchmeier NA, and Cooper NR. Suppression of monocyte functions by human cytomegalovirus. *Immunology* 1989; **66**:278-283.
63. Noraz N, Lathey JL and Spector SA. Human cytomegalovirus-associated immunosuppression is mediated through interferon- $\alpha$ . *Blood* 1997; **89**(7):2443-2452.
64. Billstrom MA, Johnson GL, Avdi NJ, and Worthen GS. Intracellular signaling by the chemokine receptor US28 during human cytomegalovirus infection. *J Virol* 1998; **72**:5535-5544.
65. Koga sY, Tanaka K, Lu YY, Oh-tsu M, Sasaki M, Kimura G, and Nomoto K. Priming of immature thymocytes to CD3-mediated apoptosis by infection with murine cytomegalovirus. *J Virol* 1994; **68**:4322-2328.
66. van de Berg AP, Meyaard L, Otto SA, van Son Wj, Klompmaker IJ, Mesander G de leij LHF, Miedema F, The TH: Cytomegalovirus infection associated with a decreased proliferative capacity and increased rate of apoptosis of peripheral blood lymphocytes. *Transplant Proc* 1995; **97**:936-938.
67. Yoshida H, Sumuchika H, Hamano S, He X, Minamishima Y, Kimura G, and Nomoto K. Induction of apoptosis of T cells by infecting mice with murine cytomegalovirus. *J Virol* 1995; **69**:4769-4775.
68. Spiller OB, Morgan BP, Tufaro F, and Devine DV. Altered expression of host-encoded complement regulators on human cytomegalovirus-infected cells. *Eur. J: Immunol* 1996; **26**: 1532-1538.
69. Ploegh HL. Viral strategies of immune evasion. *Science* 1998; **280**:248-253.
70. Warren AP, Ducrocq DH, Lehner PJ, and Borysiewicz LK. Human cytomegalovirus-infected cells have unstable assembly of major histocompatibility complex class I complex and are resistant to lysis by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol*. 1994; **68**(4):2822-2829.
71. Jones TR, Hanson LK, Sun L, Slater JS, Stenberg RM and Campbell AE. Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J. Virol*. 1995; **69**(8):4830-4841.
72. Ahn K, Angulo A, Ghazal P, Peterson PA, Yang Y, and Fruh K. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; **93**:10990-10995.
73. Gilbert MJ, Stanley RR, Cheng RL, and Philip DG. Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus. *J Virol* 1993; **67**(6):3461-3469.
74. Gilbert MJ, Stanley RR, Plachter B, and Greenberg PD. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature*. 1996; **383**:720-722.

ESTA TESIS NO DEBE  
 SER PRESTADA  
 SIN LA APROBACION  
 DE LA BIBLIOTECA

75. Jones TR, Wiertz EJHJ, Sun L, Fish KN, Nelson JA and Ploegh HL. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci* 1996; **93**:11327-11333.
76. Wierts EJHJ, Tortorella D, Bogoyo M, Yu J, Mothes W, Jones TR, Rapoport TA and Ploegh HL. *Nature*. 1996; **384**:432-438.
77. Jones TR and Sun L. Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol* 1997; **71**(4):2970-2979.
78. Hengel H, Koopmann JO, Flohr T, and Momburg F. A viral er-resident glycoprotein inactivates the mhc-encoded peptide transporter. *Immunity* 1997; **6**:613.
79. Miller DM, Rahill BM, Boss JM, Lairmore MD, Durbin JE, Waldman WJ, and Sedmak DD. Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the jak/stat pathway. *J Exp. Med.* 1998; **187**(5):675-683.
80. Browne H, Smith G, Beck S, and Minson T. A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and  $\beta_2$  microglobulin. *Nature* 1990; **347**:770-772.
81. Fahnestock ML, Johnson JL, Feldman RMR, Naveu JM, Lane WS, and Bjorkman PJ. The MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus binds endogenous peptides. *Immunity* 1995; **3**:583-590.
82. Reyburn HT, Mandelboim O, Valés GM, Davis DM, Pazmany L, and Strominger JL. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 1997; **386**:514-517.
83. Farrell HE, Vally H, Lynch DM, Fleming P, Shellam GR, Scalzo AA, and Poynter NJD. Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue *in vivo*. *Nature* 1997; **386**:510-414.
84. Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L; and Hu ML. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 1997; **7**:273-282.
85. Grundy JE, Fletcher JM, and Prentice HG. Natural killer cell lysis of cytomegalovirus (cmv)-infected cells correlates with virally induced changes in cell surface lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3). Expression and not with the cmv-induced down-regulation of cell surface class I HLA. *J Immunology* 1998; **161**:2365-2374.
86. Lanier LL, Leonfg CC, Chapman TL, Bjorkman PJ, Formankova D, Mocarski ES, and Phillips JH. Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homologue. *J Exp Med* 1998; **187**(10):1681-1687.