

Genotipo viral de la glucoproteína B en la infección por citomegalovirus humano en pacientes pediátricos con trasplante de médula ósea

Mayor M.C. Raúl **Aragón-Franco**,* Cor. M.C. Ramón Arturo **Valdés-Espinosa**,**
Tte. Q.B. José D'Artagnan **Villalba-Magdaleno**,*** Dra. Elva **Jiménez-Hernández******

Escuela Militar de Graduados de Sanidad-Hospital Infantil de México-Centro Médico Nacional "La Raza", IMSS.

RESUMEN

Introducción. El citomegalovirus humano causa varias enfermedades inflamatorias que se presentan principalmente en pacientes inmunocomprometidos. El análisis del gen que codifica la glucoproteína B/UL55 (gB) de la envoltura viral ha mostrado que adoptan una de las cuatro secuencias y que sus variaciones tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad debido a que modifican el tropismo del virus hacia diferentes tejidos.

Objetivo. Determinar la asociación entre la evolución clínica y el genotipo viral de gB durante la infección activa por CMVH en pacientes pediátricos sometidos a trasplante de médula ósea (TMO).

Metodología. Se incluyeron todos los pacientes pediátricos de TMO, de las Unidades de Trasplante del Hospital Infantil de México Federico Gómez. El presente es un estudio descriptivo, observacional, retrospectivo, longitudinal. La genotipificación se realizó mediante la amplificación del gen gB, en el cual se amplificó una región de 293 a 296 pares de bases mediante reacción en cadena de la polimerasa. El genotipo se estableció mediante un patrón de corte conocido de enzimas de restricción.

Resultados. La infección activa por CMVH se comporta de manera diferente para cada paciente. La fiebre es el síntoma más frecuente. La amplificación del gen *UL55* (gB) en el control positivo (AD-169) se han obtenido, las muestras clínicas han mostrado bandas de amplificación de aproximadamente 357 pb y la segunda reacción con una banda de aproximadamente 293 pb. Los resultados de la digestión mostraron diferentes patrones de cortes de restricción. Es recomendable proseguir con esta línea de investigación.

Viral genotype of glycoprotein due to human B cytomegalovirus in pediatric patients post bo

SUMMARY

Introduction. Human cytomegalovirus causes several inflammatory diseases that appear mainly in immuno-deficient patients. The development of these diseases is not directly caused by viral replication, but to cytokines produced by cells of the immune system. On the other hand, the analysis of the gene that codifies glycoprotein B (UL55) of the viral envelope has shown that adopts one of the four sequences. Differences in the sequences of the genes that codify for gB show significant variations of the amino acids in their dominions. Some evidences indicate that these variations have an important paper in the development of the disease because they modify the tropism of the virus towards different weaves.

Objective. To determine the association between clinical evolution and viral genotype of gB during the active infection by HCMV in pediatric patients pos BMT.

Methodology. All BMT pediatric patients of the Transplant Units of the Infante Hospital of Mexico Federico Gomez were included. The present is a descriptive, observational, retrospective, longitudinal study. The diagnosis of active infection will be according to Hamprecht and cols.¹⁷ with leukocytes samples, plasma and urine, and will be amplified by polymerase chain reaction (PCR). Genotyping was made by means of gene gB amplification, in which a region of 293 to 296 pairs of bases (pb) was amplified by means of PCR in agreement with published by Aquino and Fi-

* Graduado de la Maestría de Inmunología Básica de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad Militar, actualmente profesor titular de Inmunología Básica, Escuela Médico Militar. ** Subdirector de Investigación de la EMGS. *** Investigador del Área de Inmunología de la EMGS. **** Unidad Médica de Alta Especialidad, Centro Médico Nacional La Raza, IMSS.

Correspondencia:

Mayor M. C. Raúl Aragón-Franco

Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Área de Inmunología.

Cda. de Palomas s/n esq. Periférico, Lomas de Sotelo, Del. Miguel Hidalgo, México, D.F. C.P. 11649. Correo electrónico: aracofra@yahoo.com.mx

Recibido: Febrero 2, 2006.

Aceptado: Febrero 25, 2006.

guereido¹⁹, the amplified fraction is the highly variable sequence of the glycoprotein gB. The genotype was established by a known restriction enzymes pattern of cut.

Results. The present investigation demonstrated that active infection by HCMV behave different in each patient. In the clinical evolution, the fever is the most frequent symptom. Amplification of gene UL55 (gB) in positive control (AD-169) has been obtained, clinical samples have shown amplification bands of approximately 357 pb and the second reaction with an approximately 293 band of pb. The results of the digestion showed different cut patterns of restriction, that have not been published, different from the mentioned in references.

Palabras clave: HCMV, genotipo, active infection.

Palabras clave: HCMV, genotipo, active infection.

Introducción

El citomegalovirus humano (CMVH) es un patógeno ubicuo, es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en individuos inmunosuprimidos e inmunocomprometidos, debido a: la elevada incidencia de seropositividad poblacional, la fácil transmisibilidad y la capacidad del virus de permanecer en estado de latencia, con la posibilidad de reactivación durante el estado de inmunosupresión.

La infección puede adquirirse verticalmente a través de la leche materna y transplacentaria u horizontalmente mediante secreciones como saliva, vaginales, semen y trasplante de órganos.¹

El citomegalovirus humano (CMVH) (*Figura 1*) pertenece a la familia de los β -*Herpesviridae*, posee un núcleo de ácido desoxirribonucleico (DNA) lineal de doble cadena, rodeado de una envoltura proteica con isometría icosaédrica

de 162 capsómeros. La partícula mide de 120-200 nm; y el virus desnudo 100 nm. Su DNA cuenta con un total de 235 kilobases (kb) y con un peso molecular de $130-150 \times 10^6$ g/mol y es un virus con ciclo reproductivo lento.²

El CMVH se caracteriza por ser de distribución cosmopolita y la infección depende de varios factores económicos y sociales. Ocurre con mayor frecuencia en los países subdesarrollados, con una incidencia entre 80 y 100% de la población, mientras que en los países desarrollados la incidencia oscila entre 60 y 80%.³

La infección se incrementa con la edad de los individuos. Se ha observado que durante los cinco primeros años de vida la infección oscila entre 10 a 15% de la población. Uno de los sitios de la infección latente son los monocitos y sus precursores, lo que favorece la transmisión, por medio de transfusiones en pacientes hospitalizados (1-2% de las unidades son de alto riesgo en la transmisión del virus latente). Tam-

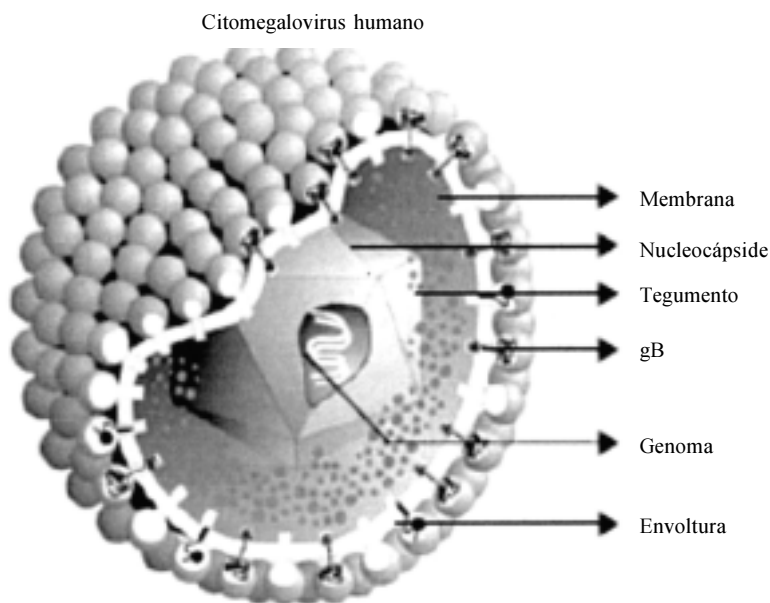


Figura 1. Modelo tridimensional de CMVH que muestra los componentes estructurales del mismo

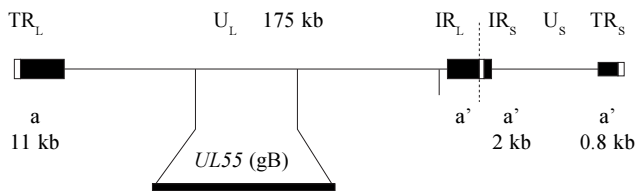


Figura 2. Representación lineal del genoma de CMVH. Localización de gen *UL 55* que codifica para la glucoproteína B (gB) que se encuentra en la región UL dentro del genoma de CMVH.

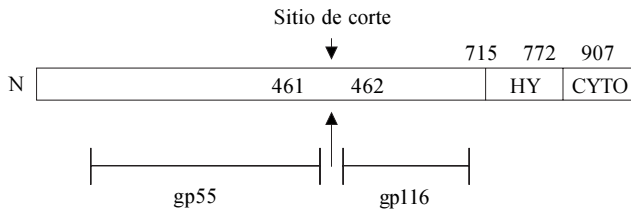


Figura 3. Diagrama esquemático de la glucoproteína gB. Representación esquemática de la glucoproteína gB precursora. Se muestra el sitio de corte para formar las subunidades gp55 y gp116. Los números se refieren al orden de los aminoácidos.

bién los receptores de trasplante de órgano sólido o médula ósea seronegativos a CMVH pueden adquirir la infección primaria desde órganos seropositivos.^{4,5}

Variabilidad genotípica y virulencia del CMVH

Se han reportado diferentes genotipos de CMVH que se basan en la variabilidad de la secuencia génica que codifica para la glucoproteína B (gB). Es la principal glucoproteína de la envoltura viral y es codificada por el gen *UL 55* (Figura 2). Ha sido involucrada en la entrada a la célula hospedera, la transmisión del virus célula a célula y la fusión de células infectadas, siendo un importante blanco para la respuesta inmune humoral y celular, así que es el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes.

La gB es sintetizado por el gen *UL55* y sintetizada como una molécula precursora de 906 aminoácidos en células infectadas. Una secuencia señal aminoterminal dirige al polipéptido naciente hacia el retículo endoplásmico donde gB rápidamente se asocia hacia un homodímero dependiente de enlaces disulfuro, acoplada al codón 461 para formar un complejo de unión disulfuro formados por las subunidades gp55 y gp116 (Figura 3).^{6,7}

Además, es la responsable del reconocimiento del virus por parte de receptores celulares, por lo que se han descrito, de acuerdo con la diferencia en el patrón de corte mediante digestión por enzimas de restricción 4 genotipos: gB1, gB2, gB3 y gB4.⁸

El efecto de la variación de las cepas de CMVH sobre las propiedades biológicas del virus es un tópico de gran interés. Cada aislado clínico de CMVH tendría el potencial para una identidad única, lo cual inicia la hipótesis que la variación de las cepas afecta el resultado de la infección por CMVH. El interés en la variación de las cepas ha sido re-

tomado por avances como el análisis de la secuencia completa de la cepa de laboratorio de CMVH AD-169 y la tecnología de las endonucleasas de restricción de secuencias de bases a través del análisis de polimorfismos de restricción fragmentos largos simples (RFLP).

La relación entre variaciones genéticas de los genes de glicoproteínas de envoltura y el resultado de enfermedad ha sido el objetivo de muchos estudios, debido a que estas variaciones son el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes virales y son esenciales para algunas funciones tales como la unión a receptores y fusión celular. Los genes *UL 55* (gB) y *UL75* (gH) han sido bien estudiados.⁹

Diversos análisis del gen que codifica la glucoproteína B de la envoltura viral han mostrado las diferencias en los genes que codifican para la glucoproteína gB produciendo variaciones significativas de aminoácidos en sus dominios. Algunas evidencias indican que estas variaciones tienen una función importante en el desarrollo de la enfermedad debido a que modifican el tropismo del virus hacia diferentes tejidos.¹⁰

Boheme y cols. observaron que viriones transcripcionalmente inactivos inducen la expresión génica de los genes estimulados por interferón (ISG), que son un subgrupo de genes celulares que están intensamente inducidos en respuesta al interferón alfa/beta que son responsables de la erradicación de la actividad antiviral atribuida al interferón. Estos autores demostraron que la forma recombinante de la glucoproteína B del virus, es un factor estructural que puede directamente inducir la expresión de los ISG, sugiriendo que la mayoría de la modulación transcripcional inducida por CMVH puede ser atribuida a una interacción entre gB y un receptor celular que es desconocido.

Además, demostraron que la infección no es necesaria para la inducción de la respuesta antiviral y que gB activa al factor 3 regulador del interferón (IRF3), lo que finalmente induce la secreción de interferón beta por parte de fibroblastos humanos. La producción de interferón implica que el establecimiento del estado antiviral es respuesta a CMVH y gB, es mediado por lo menos en parte por la actividad autocrina y/o paracrina del interferón. Sin embargo, la actividad secundaria de interferón no es requerida para el establecimiento del estado antiviral, ya que en las células que carecían de genes de interferón alfa/beta montaron una respuesta antiviral funcional tanto a CMVH como a gB. Esto indica que al inicio, la inducción generada en la superficie celular de ISGs tanto por CMVH y por gB es suficiente para el establecimiento del estado antiviral dentro de las células (Figura 4).¹¹

Se ha reportado que el genotipo gB1 es el más frecuente en pacientes trasplantados de médula ósea que desarrollan infección activa por CMVH.¹¹ Por otro lado, se ha propuesto que los genotipos gB2 y gB3 son más neurotrópicos porque han sido más frecuentemente aislados en líquido cefalorraquídeo de pacientes con SIDA infectados con el virus.¹²

Esto sugiere que la capacidad de producir enfermedad (virulencia) de una cepa del virus que infecta a un paciente inmunosuprimido, depende directamente de factores intrínsecos que producen tropismo viral hacia cierto tejido. Ade-

Modelo del inicio de señalización de gB

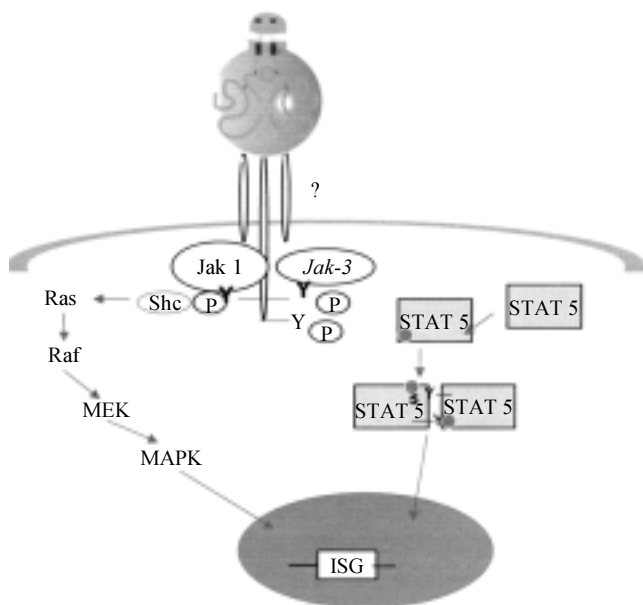


Figura 4. Modelo del inicio de señalización de gB. Inicio de la vía señalización, mediante el cual gB al unirse a un receptor desconocido se activa la vía de señalización JAK-STAT hasta llegar al núcleo activando a los genes inductores del interferón (ISG).

más, el control de la infección por parte de la respuesta humoral y la producción de citocinas puede ser modificada y transforma por lo tanto la severidad de la enfermedad producida por CMVH en pacientes inmunosuprimidos, lo cual se reflejaría tanto en la carga viral como en la expresión de citocinas proinflamatorias que el paciente pueda presentar durante el desarrollo de la infección activa.

Inmunopatogénesis de la infección viral

Se conocen alrededor de 100 cepas de CMVH, por lo que una persona puede estar infectada con más de una; es un virus especie-específico y después de la infección primaria, el virus se mantiene de por vida en el huésped en estado de latencia.¹⁴

En la interacción huésped-virus el equilibrio es establecido por el balance entre las múltiples estrategias de evasión y la correspondiente respuesta inmunitaria del huésped inmunocompetente, en este balance, varios mecanismos inmunológicos toman parte en el control de la infección, a pesar de que el virus posee varias estrategias que le permiten evadir la respuesta inmune del huésped. Estos mecanismos tienen una función importante en la patogénesis producida por la infección en pacientes inmunosuprimidos y en la capacidad de la respuesta del huésped a diferentes patógenos.

En la infección de los monocitos por CMVH, éste altera la capacidad de fagocitosis, lo que le incrementa al paciente la susceptibilidad a las superinfecciones micóticas y bacterianas.

Los principales factores de riesgo para la infección por CMVH en pacientes con trasplante de médula ósea es su

condición de ser seropositivos y la seropositividad del donador. Sin embargo, el factor principal en el desarrollo y progresión de la enfermedad es la ausencia de respuesta celular.¹⁴

En pacientes inmunocompetentes las células T CD8⁺ y las células NK son las que muestran la principal participación en el control de la infección por CMVH, ya que reconocen a las células infectadas y llevan a cabo su mecanismo efector lisando a las células infectadas, evitando así la diseminación viral y por lo tanto permiten el control de la infección, mecanismo que en pacientes trasplantados de médula ósea está alterado debido al condicionamiento mieloatóxico quimioterapéutico al que el paciente es sometido.

Algunos estudios han demostrado que la infección activa por el virus induce la producción de varias citocinas, incluyendo interleucina-12 (IL-12), interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Sin embargo, el papel de estas citocinas no está completamente esclarecido. Estudios utilizando anticuerpos anti-TNF- α , han mostrado una mayor predisposición a padecer de la enfermedad producida por CMVH. Otros no han encontrado efecto y otros un efecto protector del TNF- α en sinergia con IFN- γ .

Por otro lado, se ha demostrado que la infección en ratones por CMVH origina una intensa respuesta de la población de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ y por lo tanto una intensa respuesta Th1, caracterizada por la producción de IFN- γ , el cual ayuda a regular la infección viral aguda, crónica y latente.

Después de la primoinfección o cuando la infección primaria se reactiva, inicia una fase de viremia que permite al virus diseminarse sistémicamente. La infección latente comienza a ser infección activa y el virus es detectable en sangre mediante aislamiento en cultivo celular, ensayo de antigenemia pp65 y detección de DNA mediante PCR.¹⁵

A medida que el virus se replica, la carga viral se incrementa llegando incluso a producirse viruria (virus en orina), en individuos inmunocompetentes, este tipo de infección suele controlarse. Sin embargo, en pacientes en estado de inmunosupresión y si la infección activa no es controlada, el CMVH se disemina e infecta células de diferente linaje. La infección activa evoluciona a enfermedad, produciendo datos clínicos e histopatológica variada. El daño tisular producido depende directamente del grado de inmunosupresión y del tipo de mecanismos inmunológicos que se vean afectados en dicho proceso. Por ejemplo, en modelos animales se ha observado que el mecanismo principal de la enfermedad viral en pulmón puede ser la destrucción de tejido asociada a una reacción inmunitaria contra la infección.

Estudios en pacientes VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) seropositivos, han mostrado una respuesta menos agresiva durante el desarrollo de la neumonitis intersticial que los pacientes postrasplantados de médula ósea (pTMO), el mecanismo de este fenómeno no se conoce completamente, pero se ha propuesto que el déficit en la res-

puesta celular CD4+ de los pacientes con SIDA, reduce significativamente el fuerte daño tisular que se observa en los pacientes trasplantados de médula ósea.¹⁶ Esto sugiere la participación fundamental de factores solubles como las citocinas inflamatorias asociadas a linfocitos CD4+, que podrían protagonizar una función importante en el daño tisular producido durante la infección activa por CMVH.

Metodología

Universo del estudio

En el presente estudio se incluyeron un total de 10 pacientes pediátricos de TMO de la Unidad de Trasplante del Departamento de Hematopediatria del CMN La Raza del IMSS.

Tipo del estudio: El presente estudio es un estudio descriptivo, observacional, retrospectivo, longitudinal.

Criterios de inclusión: Pacientes pediátricos sometidos a trasplante de médula ósea (autólogo, alogénico y haploidéntico).

Criterios de exclusión: Pacientes cuyas muestras biológicas no fueron adecuadas para las pruebas de biología molecular.

Criterios de eliminación: 1) Pacientes que desarrollaron enfermedad de injerto contra huésped severa. 2) Pacientes que presentaron rechazo agudo del Injerto. 3) Pacientes con sepsis atípica severa.

Obtención de muestras: Las muestras fueron obtenidas de pacientes trasplantados de médula ósea en el Hospital Infantil de México y CMN La Raza.

Definición operativa de variables: 1) Variable independiente: Severidad de la Infección. 2) Variable dependiente: Genotipo de gB en pacientes con infección activa por CMVH.

Definición de infección activa por CMVH: Se consideró infección activa por CMVH a la detección de ADN viral mediante la técnica de PCR en leucocitos, plasma en orina de los pacientes pediátricos trasplantados de médula ósea de acuerdo con Ljungman P.¹⁷

Muestras biológicas: Muestras de sangre periférica de pacientes pediátricos pos-TMO. Muestras de orina de pacientes pediátricos pos-TMO. Muestras de plasma de pacientes pediátricos pos-TMO. CMVH cepa AD-169.

Material

- Tubos ópticos de PCR.
- Micropipetas.
- Tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Puntas para micropipetas.

Equipo

- Termociclador Perkin Elmer Gen Amp. PCR 9600.
- Cámara de electroforesis.
- Transiluminador Kodak 1 D 3.6.

Obtención de muestras biológicas

Las muestras biológicas analizadas fueron: orina, sangre y plasma de los pacientes pediátricos trasplantados de médula ósea, a las cuales se les extrajo y se purificó del ADN genómico a partir de la primera semana posterior a la realización del procedimiento. Obteniéndose un total de 255 muestras de ADN que fueron analizadas.

Extracción de ADN y cuantificación por espectrofotometría

Para cuantificar el ADN extraído, se realizaron diluciones 1:50 y se tomaron lecturas a longitudes de onda de 260 y 280 nm en espectrofotómetro (Gene Quant Pro). Posteriormente se realizó cálculo de la concentración según la siguiente fórmula:

Concentración de ADN en $\mu\text{g/mL}$ = 50X absorbancia a 260 nm X factor de dilución.

La relación de lecturas de 260 nm/280 nm proporcionó un estimado para valorar la pureza del ADN y su integridad se observó en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio 0.5 mg/mL (Figura 4).

Análisis de las muestras

Las muestras de sangre, plasma y orina se tomaron de manera semanal a cada paciente, posterior a la realización del trasplante de médula ósea, con el fin de monitorear la aparición o evolución de la infección activa.

Recolección y conservación de las muestras biológicas

Se obtuvieron 5 mL de sangre periférica mediante punción de la vena antecubital con sistema de vacutainer, en tubos de ensayo al vacío con EDTA (1 mg/mL) como anticoagulante, de los pacientes pediátricos postrasplantados de médula ósea, desde la primera semana postrasplante y la primera muestra de orina obtenida bajo condiciones de esterilidad.

Sangre: Se alicuotaron 500 μL de la muestra de sangre periférica en tubos eppendorf de 1.5 mL, adicionando medio de congelación constituido por RPMI (Gibco BRL) y 20% glicerol más 20% de suero fetal bovino (SFB) en condiciones de esterilidad.

Plasma: Se centrifugó la sangre total a 1,500 r.p.m. durante cinco minutos para obtener la fase acuosa, para posteriormente alicuotarse 500 μL en tubos eppendorf de 1.5 mL adicionando medio de congelación, constituido por RPMI (Gibco BRL) y glicerol en condiciones de esterilidad.

Orina: Se alicuotaron 500 μL y se colocaron en tubos eppendorf para la adición de medio de congelación y su posterior congelación a -70°C .

Identificación de la infección por CMVH

Purificación del ADN: Las muestras se procesaron de acuerdo con Hamprecht y cols.,¹⁸ como a continuación se describe.

A la muestra de sangre se adicionaron 500 μL de una solución 0.05% de dextrán en NaCl 0.85% y se incubaron 37°C

durante 30 min. El plasma rico en leucocitos se recuperó y se centrifugó a baja velocidad.

Los leucocitos se separaron del plasma y a las tres muestras, leucocitos, plasma y 500 µl de orina se adicionaron proteinasa K a una concentración de 200 µg/mL. Éstas se digirieron toda la noche y se extrajeron mediante fenol-cloroformo que a continuación se describe:

Se adicionó un volumen de fenol ultrapuro (Gibco BRL) y se mezcló en vórtex cinco minutos, posteriormente se centrifugó a 2,000 r.p.m. por cinco minutos. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se adicionó un volumen de cloroformo (JTBaker)- alcohol isoamílico (JTBaker) (24:1). Posteriormente se agitó en vórtex por cinco minutos y se centrifugó a 2,000 r.p.m. durante cinco minutos.

Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se precipitó en ADN con NaCl (Sigma) a una concentración final de 0.2 M más volumen de isopropanol. Se mezcló por inversión hasta la aparición de la hebra de ADN.¹⁸

Identificación de la infección activa por CMVH

Para demostrar la infección activa por CMVH, se detectó el gen *UL123* que codifica para la proteína IE-1, dicho gen se encuentra en cuarto exón de la región inmediata temprana, por medio de la técnica reportada por Brytting,¹⁹ en la cual se amplificó una región del gen de 146 pb por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para la fase de amplificación se utilizó 5 µl de ADN proveniente de leucocitos de sangre periférica, 5 µl de ADN de plasma y 5 µl de DNA de orina. Para la primera fase de amplificación la mezcla de reacción contenía: 1.5 U de Taq Polimerasa (Invitrogen), MgCl₂ 10 mM, dNTPs 0.2 mM, oligonucleótidos 5 pm, IEP4C (iniciador sentido) 5' TGAGGATAAGCGGGA-GATGT 3' (Invitrogen), IEP4D (Iniciador antisentido) 5' ACT-GAGGCAAGTTCTGCAGT 3' (Invitrogen), Tween 20 a 0.5% con un volumen final de 50 µl.

La primera reacción se llevó a cabo en un termociclador (Perkin-Elmer Gene Amp. PCR System 9600) bajo las siguientes condiciones:

Desnaturalización cinco minutos a 95 °C, 20 ciclos consistentes en 30 segundos a 91 °C, 60 segundos a 56 °C y 60 segundos a 72 °C, al término de los ciclos se dio una extensión final de 72 °C por 10 minutos.

La segunda reacción se realizó con 5 µl del producto de la PCR anterior de cada tubo y la mezcla de reacción que contenía: 1.5 U de Taq Polimerasa (Invitrogen), MgCl₂ 10 mM, dNTPs 0.2 mM, oligonucleótidos 20 pm, IEP4A (Iniciador sentido) 5' TGAGGATAAGCGGGAGATGT 3' (Invitrogen), IEP4B (Iniciador antisentido) 5' GAAGGCTGAGTTCTT-GGTAA 3' (Invitrogen), con un volumen final de 50 µl.

La segunda reacción se llevó a cabo en un termociclador (Perkin-Elmer Gene Amp. PCR System 9600) bajo las siguientes condiciones:

Desnaturalización de cinco minutos a 95 °C, 30 ciclos consistentes en 30 segundos a 91 °C, 60 segundos a 56 °C y 60 segundos a 72 °C, al término de los ciclos se dio una extensión final de 72 °C por 10 minutos. El producto de la

PCR anidada se visualizó en un gel de agarosa (Invitrogen) a 2% mediante tinción con bromuro de etidio frente a un marcador de tamaño molecular de 100 pb; el producto amplificado fue de 146 pb, se utilizó como control positivo la cepa de CMVH AD-169 y como control negativo agua MilliQ.

Genotipificación de CMVH

Detección del gen *UL 55* (gB): Se detectó el gen *UL 55* que codifica para la proteína gB, a través de la amplificación de una región de 293 a 296 pares de bases (pb), se llevó a cabo mediante PCR de acuerdo con lo publicado por Aquino y Figuereido.²⁰ Este segmento constituye la secuencia altamente variable de la glicoproteína gB.

Para incrementar la sensibilidad de la técnica se utilizó un sistema semianidado iniciando con 3 µl de ADN molde en un volumen final de 20 µl, preparado con 1.25 U de Taq polimerasa (Invitrogen), KCl 100 mM, Tris HCl pH 8.5 1M, MgCl₂ 50 mM, dNTPs 200 mM y oligonucleótidos 5 mM, los cuales flanquean a partir del nucleótido 1319 5' TGGAACCTGGAACGTTTGGC 3' (Accesolab, Invitrogen Life Technologies) y 1676 5'TGACGCTGGTTTGGTTGATG 3' (Accesolab, Invitrogen Life Technologies), de la región variable del gen *UL 55* (gB).

Se corrieron en un termociclador (Perkin-Elmer Gen Amp. PCR 9600) bajo el siguiente programa:

Desnaturalización inicial de 94 °C por cinco minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 60 segundos, 58 °C por 60 segundos y 72 °C por 60 segundos, terminando con un ciclo de extensión de 72 °C durante 10 minutos.

La segunda reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µl usando 3 µl del producto del primer amplificado, 1.25 U de Taq Polimerasa (Invitrogen), KCl 100 mM, Tris HCl pH 8.5 mM, MgCl₂ 50 mM, dNTPs 200 mM y 5 mM de los oligonucleótidos que flanquean la posición 1319 a 1604 5'GAAACGCGCGCAATCGG3' (Accesolab, Invitrogen Life Technologies) de 293 bases de la región variable de *UL 55* (gB).

Se corrieron en un termociclador (Perkin-Elmer Gen Amp. PCR 9600) bajo el siguiente programa:

Desnaturalización inicial de 94 °C por cinco minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 60 segundos, 58 °C por 60 segundos y 72 °C por 60 segundos, seguido de un ciclo de extensión final de 72 °C durante 10 minutos. Los productos se corrieron en un gel de agarosa (Invitrogen) al 2% frente a un marcador de tamaño molecular de 100 pb; y el gel se tiñó en una solución de 50 µg/mL de bromuro de etidio y el producto se encontró entre 293-296 pb.

Determinación del genotipo

El genotipo viral de cada cepa se estableció utilizando un patrón de corte conocido mediante enzimas de restricción para el producto obtenido. Las enzimas utilizadas fueron *Hinf I* y *Rsa I*. 5 µl del producto de amplificación se dirigió con 5 U de cada enzima, a 37 °C durante una hora y corridos pos-

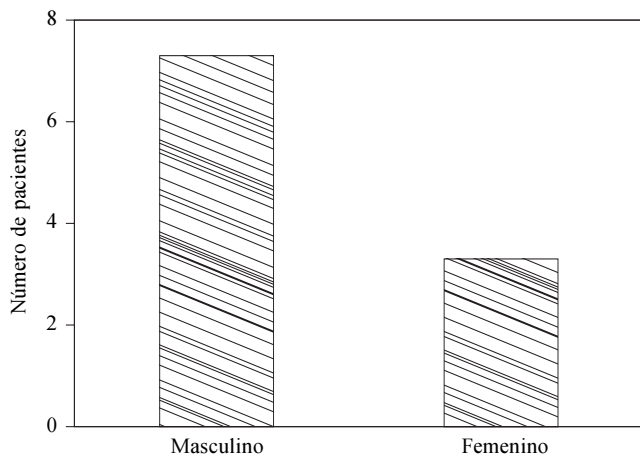


Figura 5. Gráfica que representa la distribución por género. De los individuos con infección por CMVH. Predominando el grupo de individuos del sexo masculino 70% (siete pacientes) y del sexo femenino 30% (tres pacientes).

mieloblástica aguda (un paciente). El tipo de trasplante fue alogénico en nueve pacientes y autólogo en un paciente (*Cuadro 1* y *Figuras 6* y *7*).

Diagnóstico de infección activa por CMVH con la técnica de PCR para la detección del gen *UL-123* (IE-1)

De los 10 pacientes en edad pediátrica analizados, se obtuvieron un total de 255 muestras de ADN (*Figura 8*), de las cuales 109 fueron positivas y 146 negativas. Leucocitos 46, plasma 39 y orina 24 fueron positivos. Leucocitos 39, plasma 61, orina 61 negativos (*Figura 9*).

Análisis de la evolución de la infección por CMVH en pacientes pediátricos trasplantados

Todos los pacientes presentaron diferentes formas en la evolución de la infección activa. Un solo paciente nunca desarrolló infección activa por CMVH. Dos pacientes pre-

Cuadro 1. Datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio.

No.	Sexo	Edad (Años)	Diagnóstico	Tipo de TMO	Serología CMVH previo a tto.
1	Masculino	5	LLA AR.	Alogénico	IgG(+)/IgM(-)
2	Masculino	13	Anemia aplásica tipo Fanconi	Alogénico	IgG(+)/IgM(-)
3	Masculino	13	LGC	Alogénico	IgG(+)/IgM(-)
4	Masculino	15	LLA L1 AR por cromosoma Ph	Autólogo	IgG(+)/IgM(-)
5	Femenino	3	LIA de AR por edad y trasl (4:11)	Alogénico	IgG(-)/IgM(-)
6	Femenino	1	LLA L-1 AR por inf. del SNC	Alogénico	IgG(+)/IgM(-)
7	Masculino	8	LLA L1 AR por hiperleucemia y CrPh +	Alogénico	N.D.
8	Femenino	13	A. A. G.	Alogénico	IgG(+)/IgM(-)
9	Masculino	15	LMA M4	Alogénico	N.D.
10	Masculino	15	Anemia Aplásica	Alogénico	IgG(+)/IgM(-)

LLA (Leucemia Linfoblástica Aguda). AR (Alto Riesgo). LMA (Leucemia Mieloblástica Aguda). Cr Ph + (Cromosoma Philadelphia Positivo). TMO (Trasplante de Médula Ósea).

teriormente en geles de azarosa 1000 al 3% frente a un marcador de tamaño molecular de 123 pb con un intervalo entre 25 y 766 pb, el perfil genotípico se espera de la siguiente manera: gB1 *Hinf* I (202,67 y 36 pb) *Rsa* I (239 y 66 pb), gB2 *Hinf* I (202 y 100 pb) *Rsa* I (239 y 63 pb), gB3 *Hinf* I (202 y 97 pb) *Rsa* I (195.66 y 44 pb) gB4 *Hinf* I (202, 67 y 36 pb) *Rsa* I (95, 66 y 36 pb).

Estadística

Se utilizó el programa STATS v.1.1. para la determinación de la frecuencia, porcentajes y media de la población estudiada.

Resultados

Se incluyeron 10 pacientes en edad pediátrica que se sometieron a trasplante de médula ósea, de los cuales siete son hombres y tres mujeres, comprendidos en edades de uno a 15 años. La media de edad fue de 10.1 años (*Figura 5*).

Las enfermedades incluyeron leucemia linfoblástica aguda (cinco pacientes), anemia aplásica (tres pacientes), leucemia granulocítica crónica (un paciente) y leucemia

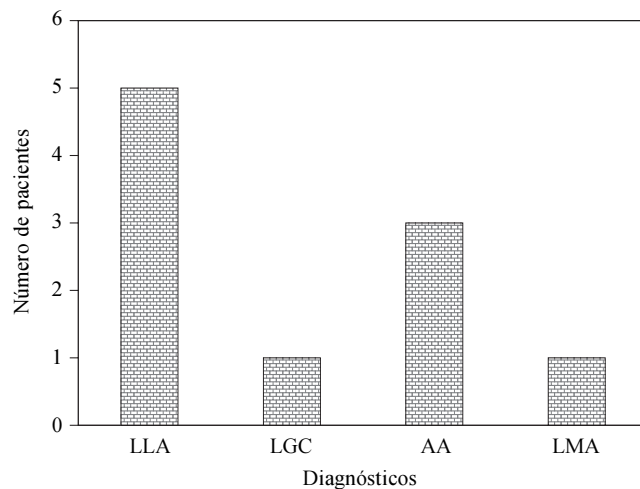


Figura 6. Distribución de enfermedades. Gráfica que muestra la incidencia de enfermedades hematológicas presente en pacientes con T.M.O. e Infección Activa por CMVH. Donde se indica que 50% (cinco pacientes) presentaron el diagnóstico de LLA (Leucemia Linfoblástica Aguda), 30% (tres pacientes) AA (Anemia Aplásica), 10% (un paciente) LGC (Leucemia Granulocítica Crónica) y 10% (im paciente) LMA (Leucemia Mieloblástica Aguda).

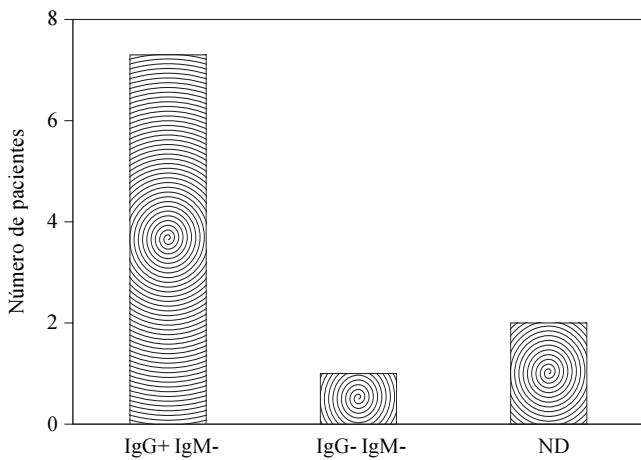


Figura 7. Serología CMVH previo al TMO. Gráfica que muestra las frecuencias de anticuerpos anti-CMVH en el grupo de pacientes trasplantados de médula ósea, donde se observa que la más común es la IgG+ IgM- (n = 7), sólo un paciente con IgG- IgM-.

sentaron resultado negativo a la PCR y posteriormente positividad para el virus (*Cuadro 2*).

Evolución clínica

Setenta por ciento (siete pacientes) de los pacientes presentó fiebre durante el periodo de monitoreo, 10% diarrea (un paciente), 10% (un paciente) datos de compromiso pulmonar, 30% (tres pacientes) enfermedad de injerto contra huésped (*Figura 10*).

Amplificación del gen *UL-55* (gB)

1. Curva de sensibilidad de amplificación de AD-169. La sensibilidad de amplificación se alcanzó hasta 1:100, lo que corresponde posterior a la cuantificación del ADN viral mediante espectrofotometría a una concentración de 1.15 ng/mL, después de esta dilución no se observó banda de amplificación esperada de 357 pb (*Figura 11*).
2. La amplificación de los controles positivos (cepa viral AD-169) corresponden una banda de 357 pb del gen

UL55 que codifica para la proteína gB del virus (*Figuras 12 y 13*).

3. Para el segundo amplificado del control positivo (AD-169) corresponde a una banda de 293 pb (*Figura 14*).
4. Los productos de la PCR en la primera reacción de PCR utilizando el par de oligonucleótidos 1676 y 1319 de ADN obtenidas de los leucocitos, plasma y orina de los pacientes pediátricos de cinco pacientes trasplantados de médula ósea, mostraron una banda de aproximadamente 357 pb (*Figuras 15 y 16*).
5. El resultado de la PCR semianidada utilizando el par oligonucleótidos 1604 y 1319 mostró la amplificación de una muestra de ADN obtenida de leucocitos de sangre periférica de un paciente en estudio, la banda de amplifi-

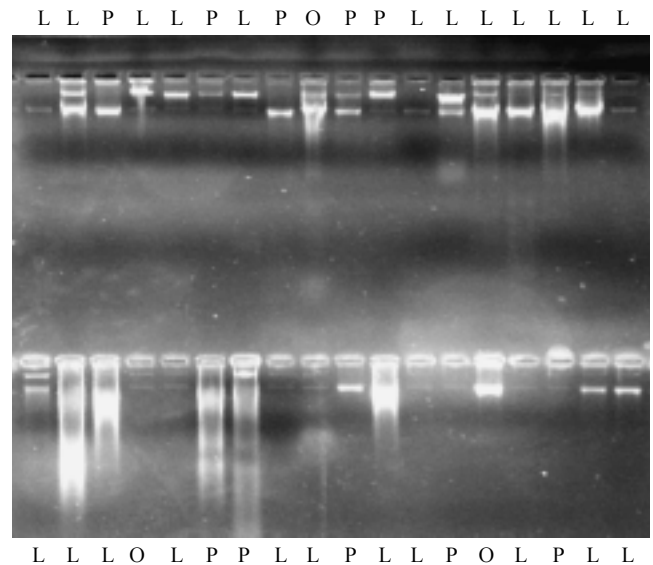


Figura 8. Muestras de ADN genómico de leucocitos, plasma y orina de los pacientes pediátricos trasplantados de médula ósea. Carril 1 al 18 ADN genómico obtenido de leucocitos (L),l plasma (P) y orina (O) de los pacientes pediátricos trasplantados de médula ósea.

Cuadro 2. Análisis de la evolución de la infección por CMVH en pacientes pediátricos TMO.

PA CI EN TE	Semanas PTMO														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	L P O	L P O	L P O	L P O	L P O	L P O	L P O	L P O	L P O	L P O	L P O	L P O	L P O	L P O	L P O
1	- - -	- - -	+ - -	++ -	+ - -	+ - -	- - -	- - -	- - -						
2	- - -	+ - -	+++	++ -	++ -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -				
3	+++	- + -	- + -	- + +	++ -	++ -	+ - -	+++	++ -						
4	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -									
5	- - -	- - -	- - -	- - -	+++	- - -	- - -								
6	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	++ -		++ -	+ - -	+++	- - -	+ - -	- - -
7	- + -	+++	+ + -	+ - -	+++	++ -	++ -	+++	+++	- - -	++ -	+++	+++		- - -
8	+++	- - -	+++	+ - -	+++	++ -	++ -								
9	++ -	+ - -	++ -	+ - -											
10	- - -	+++	+++	+++	+++	+++									
11															
12															
13															
14															
15															

Análisis de la Infección Activa por CMVH. L: Leucocitos. P: Plasma. O: Orina. Monitorización de la Infección Activa por CMVH mediante PCR para *IE-1*. La monitorización se llevó a cabo a partir de la primera semana del TMO utilizando el ADN obtenido de los productos biológicos obtenidos.

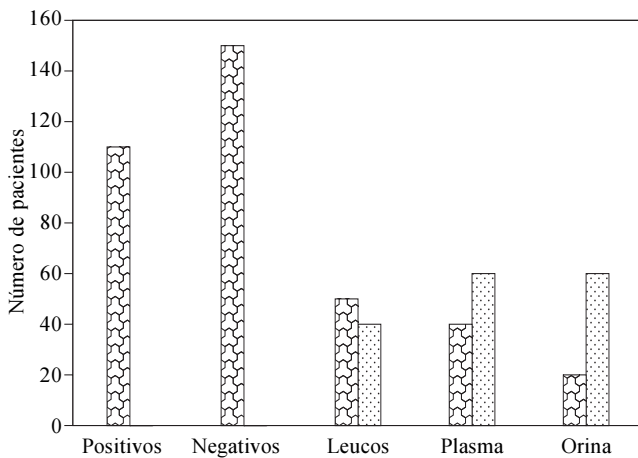


Figura 9. Diagnóstico de infección activa. ADN de pacientes trasplantados de médula ósea. Positivos (oscuros) y negativos (claros) para IE-1 mediante PCR

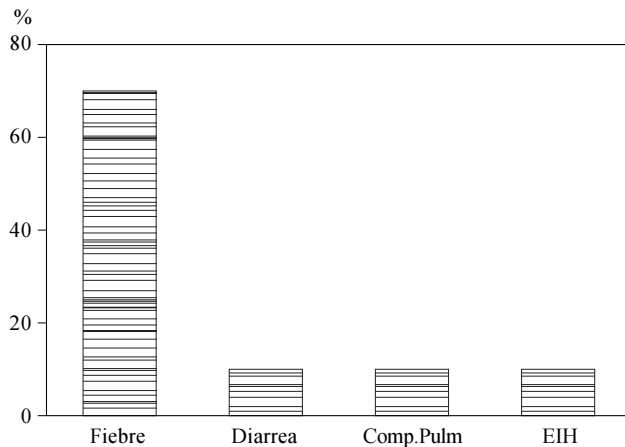


Figura 10. Datos clínicos más frecuentes. Frecuencia de manifestaciones clínicas de enfermedad producida por CMVH. El dato clínico más frecuente fue fiebre con 70% (siete pacientes), diarrea 10% (uno), datos de compromiso pulmonar 10% (un paciente) y datos de enfermedad injerto contra huésped (E.I.C.H.) 10% (un paciente).

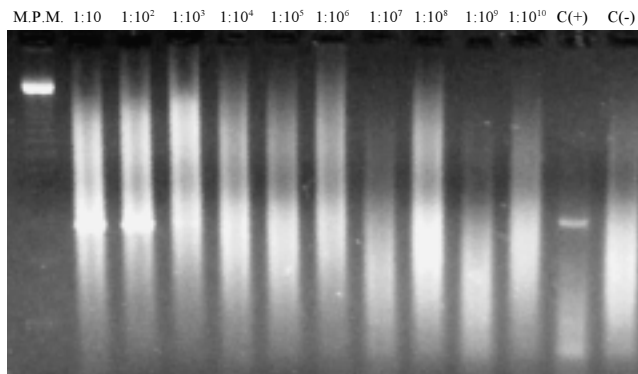


Figura 11. Curva de sensibilidad de amplificación de la cepa de CMVH AD-169 que se utilizó como control positivo. M.P.M.: Marcador de peso molecular 100 pb. Las concentraciones se diluyeron progresivamente, la concentración $1:10^2$ se considera la de la mayor sensibilidad. Se compararon con el control positivo que ocupa el penúltimo carril.

cación obtenida presentó un tamaño aproximado de 293 pares de bases (Figura 17).

Genotipificación de gB de CMVH de ADN de pacientes sometidos a TMO

Los productos del amplificado del gen *UL-55*, proveniente de leucocitos de sangre periférica y de cepa viral AD-169, se sometieron a digestión mediante las enzimas *HinfI* y *RsaI*, encontrando los diferentes sitios cortes, de aproximadamente 239 y 66 y 20 pb para *RsaI*, para *HinfI* 170, 100 y 20 pb (Figura 18).

Discusión

Nuestra muestra de estudio comprendió una población de 10 pacientes en edad pediátrica con diagnósticos de maligni-

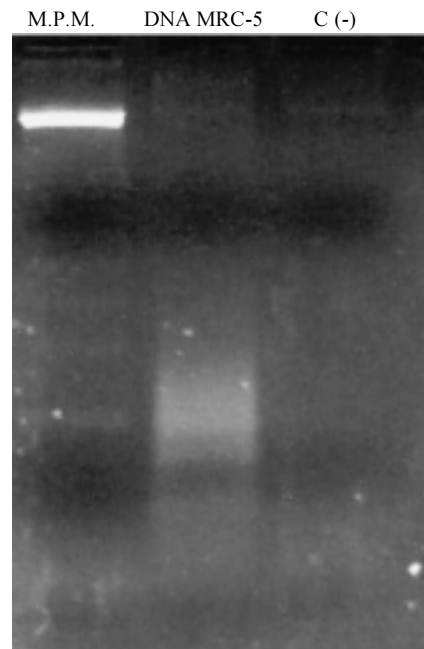


Figura 12. Resultado de PCR utilizando ADN de células MRC-5 sin infectar con los oligos 1319 y 1676. M.P.M. 100 pb. No se obtuvo amplificación utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *UL55* y ADN de células MRC-5 que se utilizan como células hospederas de la cepa viral AD-169.

Amplificación del gen *UL-55* AD-169

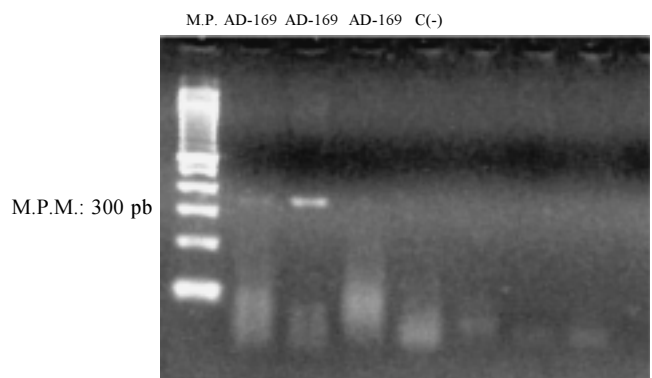


Figura 13. Resultado de la primera amplificación del gen 8 UL 55 que codifica para la gB con peso de 357 pb de la PCR semianidada con la cepa de CMVH AD-169 utilizada como control positivo (C+). M.P.: 100 pb.

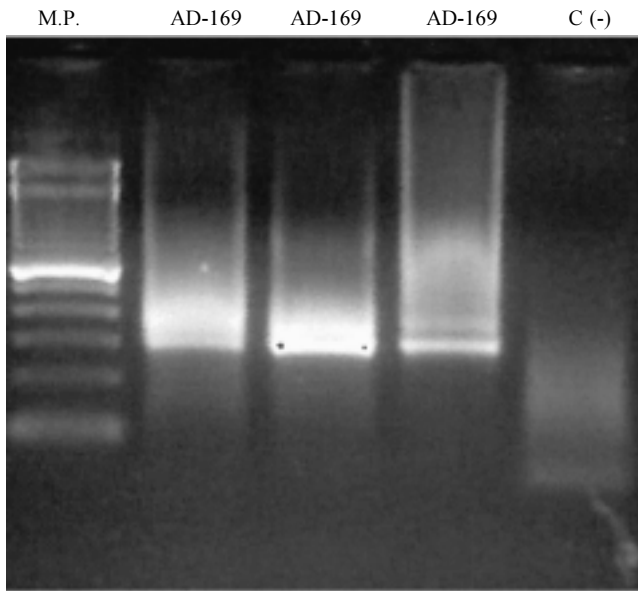


Figura 14. Amplificación del gel *UL55* AD-169. Resultado de la segunda amplificación del gen *UL55* que codifica para la gB de la PCR semianidada de aproximadamente 293 pb con la cepa de CMVH AD-169 utilizada como control positivo (C+). M.P. 100 pb.

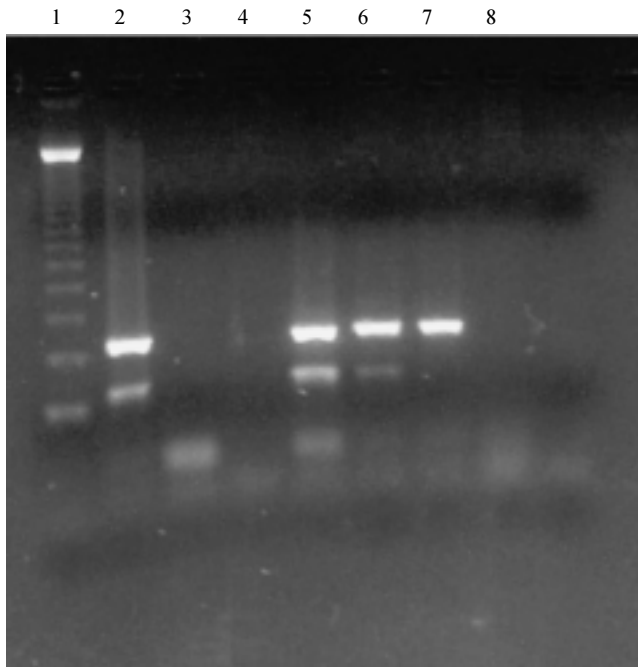


Figura 15. Amplificación del gen *IE-1* de CMVH de muestras clínicas. Resultado de PCR para la amplificación del gen *UL-123* que codifica para la proteína IE-1 de los ADN obtenidos de muestras provenientes de pacientes pediátricos trasplantados de M.O. 1. Marcador de Peso Molecular 100 pb. 2. ADN muestra clínica. 3. Muestra clínica. 4. Muestra clínica. 5. Muestra clínica. 6. Muestra clínica. 7. C (+) AD-169.

dad hematológica y de aplasia de médula ósea para los cuales el tratamiento fue trasplante de médula ósea. La edad comprendió entre 1 y 15 años, con promedio de edad de 10.1 años de la población estudiada. Setenta por ciento fueron del sexo

masculino y 30% del sexo femenino. Los estudios serológicos para CMVH fueron positivos en 80% de los pacientes, siendo IgG+, sin embargo, en 100% de los casos presentaron serología IgM negativos previo al procedimiento de TMO, lo que concuerda con los resultados publicados de la prevalencia serológica en la población mexicana de esa edad (Referencia).

Los resultados obtenidos muestran que la mayoría de los pacientes, 90%, que han sido trasplantados de médula ósea,

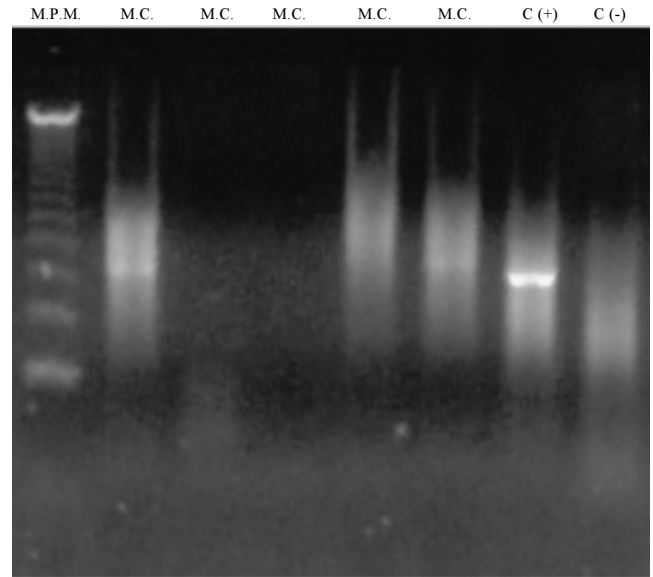


Figura 16. Primera reacción de PCR semianidada para el gen *UL55*. Muestras clínicas. Resultado de la primera reacción de PCR para la amplificación del gen *UL-55* utilizando los oligos 1319 y 1676 para cinco muestras de ADN obtenido de pacientes pediátricos trasplantados de médula ósea. M.P.: 123 pb.

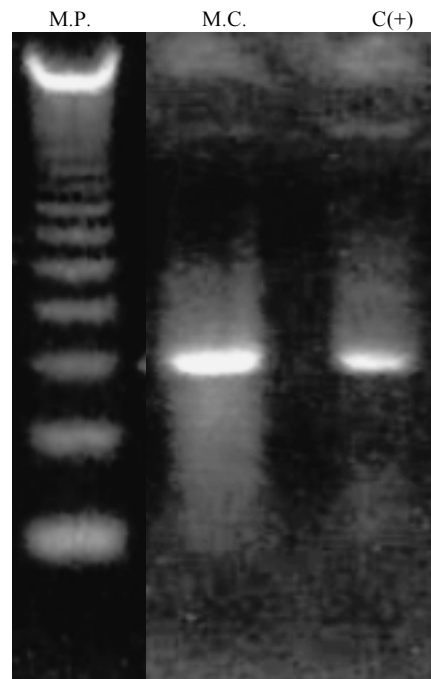


Figura 17. Amplificación del gen *UL 55*. Muestras clínicas. Resultado de la amplificación del gen *UL-55* utilizando los oligonucleótidos 1319-1604 de una muestra de ADN proveniente de leucocitos de un paciente trasplantado de médula ósea (M.C.). M.P. 123 pb. (marcador de peso molecular). C(+) Control positivo.

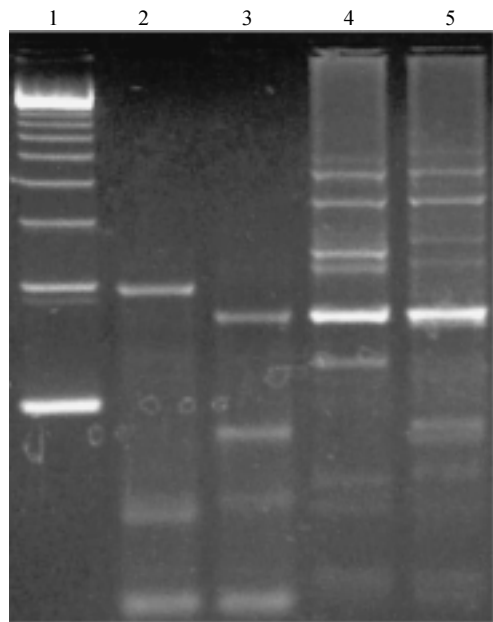


Figura 18. Digestión de los productos de PCR de gB. Producto de la digestión llevada a cabo mediante *Rsa I* y *Hinf I*. Carril 1 M.P.M. 123 pb. 2. Digestión de ADN obtenido de leucocitos de paciente T.M.O. con infección activa por CMVH con *Rsa I*. 3. Digestión de ADN obtenido de leucocitos de paciente T.M.O. con infección activa por CMVH con *Hinf I*. 4. Digestión de ADN obtenido de AD-169 *Rsa I*. 5. Digestión de ADN obtenido de AD-169 *Hinf I*.

presentaron infección activa producida por CMVH diagnosticada mediante la técnica de PCR anidada para la amplificación del gen UL-123 que codifica para la proteína inmediata temprana IE-1, en algún momento posterior al trasplante de médula ósea, confirmando que el estado de inmunosupresión es un factor determinante para el desarrollo de la infección activa por el virus.

La evolución de infección activa consistió en la detección del virus presente en los leucocitos, el plasma y la orina de los pacientes estudiados, de manera semanal por medio de la técnica de PCR ya mencionada. Los resultados obtenidos fueron diferentes para cada paciente, por ejemplo: en algunos casos, presentándose desde la primera semana posterior al trasplante diagnosticándose como positivos, posteriormente reportándose negativos y semanas después, nuevamente positivos para el virus. También un solo paciente con serología para IgG +, nunca desarrolló infección activa para el virus, manteniéndose todo el periodo de observación negativo.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad producida por CMVH en su mayoría presentó mucha variabilidad, aunque la fiebre fue el hallazgo más frecuente de infección activa, seguida de diarrea y datos de compromiso pulmonar como tos y disnea de medianos esfuerzos.

La amplificación del fragmento polimórfico del gen UL-55 que codifica para la glicoproteína gB mediante PCR semianidada, ha mostrado que es adecuada para el virus que se utiliza como control positivo (AD-169), con las condiciones establecidas en nuestro laboratorio.

El ADN proveniente de fibroblastos de pulmón fetal (MRC-5) sin infectar no mostró datos de amplificación del gen UL55 utilizando los oligonucleótidos 1319 y 1676, lo que descartaría que los productos amplificados durante la etapa de estandarización de la técnica de PCR es adecuada y no muestra bandas de amplificación inespecífica provenientes del genoma de la célula que se utiliza como permisiva para la infección de la cepa del virus utilizada como control positivo de amplificación.

Para nuestras muestras de ADN genómico obtenido de leucocitos de sangre periférica, plasma y orina que previamente se diagnosticaron como positivas para CMVH utilizando PCR anidada, la amplificación del gen UL-123 que codifica para la proteína inmediata temprana IE-1, han demostrado amplificación de bandas de aproximadamente 357 pb y la segunda reacción banda de 293 pb aproximadamente para la detección del gen que codifica para gB, por lo que se ha demostrado que la sensibilidad de dichos oligonucleótidos es baja.

Además al determinar que la concentración mínima detectable mediante espectrofotometría de ADN viral de la cepa que utilizamos como control para la reacción de amplificación utilizando los oligonucleótidos externos (1676-1319) es de 1.15 ng/mL, lo que nos podría orientar a evidenciar que la concentración de ADN viral en las muestras provenientes de productos biológicos de los pacientes en estudio podría estar en concentraciones más bajas.

Se amplificó una región más grande de aproximadamente 370 pb del ADN de muestras clínicas que incluye la región altamente polimórfica del CMVH, y posteriormente digiriéndola con las enzimas de restricción *Hinf I* y *Rsa I*, en México no existe algún estudio que demuestre la genotipificación de CMVH en pacientes pediátricos trasplantados de médula ósea con infección activa.

Hasta el momento no se puede llevar a cabo una correlación entre la evolución clínica de los pacientes pediátricos trasplantados de médula ósea y el genotipo de la cepa clínica de CMVH, proporcionándonos una idea de la patogenicidad de la cepa viral presente en el paciente que desarrolla infección activa, por lo que es necesario seguir haciendo amplificados (PCR) de la región del gen UL-55 y continuar con las digestiones correspondientes.

Referencias

1. Astrid E Greijer, et al. Direct quantification of human cytomegalovirus immediately early and late mRNA levels in blood of lung transplant recipients by competitive nucleic acid sequenced-based amplification. *J Clin Microbiol* 2001; 39(1): 251-9.
2. Kenneth J, Ryan C, George R. Microbiología médica. Una introducción a las enfermedades infecciosas, cuarta edición, México, D.F.: McGraw Hill; 2004, p. 620-2.
3. Griffiths PD, Grunfield JE. Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *Biochem J* 1987; 241: 313.
4. Ljungman P et al. Results of different strategies for reducing cytomegalovirus-associated mortality in allogeneic stem cell transplant recipients. *Transplantation* 1998; 66: 1330-4.

5. Adler SP, et al. Intrauterine infections: Pediatric infectious diseases. Principles and practice. Philadelphia: WB Saunders; 2002, p. 120-6.
6. Alain C, Alain B, Carine D, et al. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 155-61.
7. Lopper M, Compton T. Disulfide bond configuration of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J Virol* 2002; 76(12): 6073-82.
8. Ahumada-Ruiz S, et al. Determination of human cytomegalovirus genetic diversity in different patient populations in Costa Rica. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2004; 46(2): 87-92.
9. Rasmaussen L, Geissier A, Winters M. Inter-and intragenic variations complicate the molecular epidemiology of human cytomegalovirus. *J Infect Dis* 2003; 187: 809-19.
10. Beverly Torok-Storb, et al. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after transplantation. *Blood* 1997; 90(5): 2097-102.
11. Boheme KW, Singh J, Perry ST, Compton T. Human cytomegalovirus elicits a coordinated cellular antiviral response via envelope glycoprotein B. *J Virol* 2004; 78(3): 1202-11.
12. Fries-Hutchinson S, et al. Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* 1994; 169(4): 769-74.
13. Tarragó D, et al. Different cytomegalovirus glycoprotein B distribution in serum and cerebrospinal fluid specimens determined by a novel multiplex nested PCR. *J Clin Microbiol.* 41(7): 2872-7.
14. Alexandre Harari, et al. Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Human Immunology* 2004; 65: 500-6.
15. Elio Castagnola, et al. Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation in children. *Human Immunology* 2004; 65: 416-22.
16. Laegnaux L, Delfoge A, Snoeck R. Imbalance in production of cytokines by bone marrow stromal cells following cytomegalovirus infection. *J Inf Dis* 1996; 174: 913-19.
17. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34 (15): 1094-7.
18. Hamprecht, et al. Semi-quantitative detection of cytomegalovirus DNA from na serum and plasma by nested PCR: influence of DNA extraction procedures. *J Virol Methods* 1997; 69(1-2): 125-35.
19. Brytting M, Sundqvist VA, Stalhansake P, Linde A, Wahren B. Cytomegalovirus DNA detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. *J Virol Methods* 1991; 32: 127-38.
20. Aquino VH, Figueredo LT. High prevalence of renal transplant recipients infected with more than one cytomegalovirus glycoprotein B genotype. *J Med Virol* 2000; 61: 138-42.