

Expresión del receptor del factor de necrosis tumoral en monocitos infectados por citomegalovirus humano

Mayor M.C. Luz María **Aguilar-Anguiano**,* Tte. Q.B. José Dártagnan **Villalba-Magdaleno**,[†]
Dr. Francisco Vianney **Ortiz-Navarrete**,[‡] M. en C. Rosana **Pelayo-Camacho**,[§]
M. en C. Horacio **Astudillo-de la Vega**,^{||} Cor. M.C. Ramón Arturo **Valdés-Espinosa**

Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la E.M.G.S. (Departamento de Inmunología)/ Departamento de Inmunología del área de Biomedicina Molecular del CINVESTAV/ Laboratorio de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

RESUMEN

Introducción. El citomegalovirus humano (HCMV) es el miembro más representativo de los herpesvirus beta, causa infecciones persistentes y latentes con periodos frecuentes de reactivación. Afecta a todos aquellos que se encuentran inmunosuprimidos e inmunocomprometidos, aumentando su morbilidad y mortalidad.

Material y método. Las células utilizadas, fueron monocitos de sangre periférica humana de ocho donadores sanos, estimulados con Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), se analizaron las moléculas de superficie CD14 y CD45, así como los receptores del factor de necrosis tumoral CD120 α y CD120 β (TNFRI y TNFR II).

Resultados. La caracterización de las células obtenidas con el estímulo de PMA mostró que sufrían cambios morfológicos, así como aumento de la expresión de CD14, CD45 y TNFR II, mas no del TNFR I. Posteriormente se observó que las células estimuladas o macrófagos fueron susceptibles de ser infectados *in vitro* por el HCMV, ya que presentaban DNA viral 48 h postinfección. El HCMV es capaz de interferir en la expresión de moléculas de superficie probablemente como un fenómeno de desdiferenciación celular o desregularización, que permiten la supervivencia y persistencia del HCMV en su célula huésped.

Palabras clave: citomegalovirus humano, monocitos, factor de necrosis tumoral alpha, receptores de TNF- α , moléculas CD14 y CD45.

Expression of the receiver of the factor of tumorlike necrosis in monocytes infected by human cytomegalovirus

SUMMARY

Introduction. Human cytomegalovirus human (HCMV) is the most representative member of herpesvirus beta, cause persistent and latent infections with frequent periods of reactivation. It affects all those that are immunosuppressed and immunocompromised, increasing to its morbidity and mortality.

Material and method. The used cells, were monocytes of human peripheral blood of eight healthy donors, stimulated with 12-miristato Forbol 13-acetate (PMA), analyzed molecules of surface CD14 and CD45, as well as the receivers of the factor of tumorlike necrosis CD120a and CD120b (TNFRI and TNFR II).

Results. The characterization of the cells obtained with the PMA stimulus showed that they underwent morphologic changes, as well as increase of the expression of CD14, CD45 and TNFR II, of the TNFR I. After was not observed more that the stimulated cells or macrophages were susceptible to be infected *in vitro* by the HCMV, since post presented 48 viral DNA h infection. The HCMV is able to probably interfere with in the molecule expression of surface like a phenomenon of cellular desdiferenciación or desregularización, that allows to the survival and persistence of the HCMV in their cell guest.

Key words: Human cytomegalovirus, monocytes, factor of tumorlike necrosis alpha, receivers of TNF-a, molecules CD14 and CD45.

* Maestra en Ciencias en el área de Inmunología, perteneciente a la E.M.G.S. [†] Maestro en Ciencias. Perteneciente al Laboratorio de Inmunología de la E.M.G.S. [‡] Doctor en Ciencias en el área de Inmunología, Jefe del Departamento de Biomedicina Molecular (Inmunología) del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV). [§] Doctora en Ciencias en el área de Inmunología. Departamento de Inmunología CINVESTAV. ^{||} Maestro en Ciencias en el área de Biología Molecular y jefe del Laboratorio de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. [¶] Médico Militar con especialidad en Medicina Interna, Maestro en Ciencias en la especialidad de Inmunología y actualmente Subdirector del Laboratorio de Investigación de la E.M.G.S.

Correspondencia:

Dra. Luz María Aguilar-Anguiano

Escuela Médico Militar, Cda. de Palomas S/N. Col. Lomas de Sotelo, C.P. 11200. Tel.: 5540-7729 Ext. 171.

Correo electrónico: anguianoluzmaria@hotmail.com

Recibido: Octubre 18, 2006.

Aceptado: Marzo 21, 2007.

Introducción

Una característica de las infecciones virales es una respuesta rápida por la célula infectada. Ésta incluye la activación de una maquinaria de defensa antiviral preexistente, que puede llevar a mecanismos antivirales como la apoptosis y la producción de citocinas específicas de la célula infectada. Nokta y cols., en 1996 así como Tomioka y cols., en 1995 y 1996 demostraron que muchas de las perturbaciones de la respuesta inmune se han atribuido a una red de citocinas y el TNF- α (Factor de necrosis tisular α) se ha propuesto candidato en varios modelos de inmunosupresión, así como en la patogénesis de varias infecciones virales.^{1,2-5}

El citomegalovirus humano (HCMV) es el miembro más representativo de los herpesvirus beta, causa infecciones persistentes y latentes con periodos frecuentes de reactivación⁶ (Figura 1). Afecta a todos aquellos que se encuentran inmunosuprimidos e inmunocomprometidos, aumentando su morbilidad y mortalidad.⁷ La evasión del sistema inmune (SI) es la esencia de la persistencia de CDVH. El virus utiliza varias estrategias para evitar la detección y eliminación por la respuesta inmune. Dentro de los mecanismos que se han documentado es que el HCMV induce la supresión de moléculas de histocompatibilidad clase I y clase II en la superficie celular, bloquea vías intracelulares para el procesamiento y presentación de antígenos, vías de señalización de la apoptosis, entre otros.⁸⁻¹⁰ Los monocitos son células efectoras responsables de proteger al organismo a través de la liberación de factores solubles o citocinas o de la acción directa hacia invasores o células aberrantes, junto con la interacción de linfocitos T. Sin embargo, en muchos estados de enfermedad esas células son alteradas o son el *blanco de patógenos invasores* resultando en una respuesta inmune aberrante. Uno de los patógenos que infecta esas células son los virus, el HIV y el CMVH son ejemplos representantes. Durante la infección por el CMVH los monocitos son el blanco primario *in vivo*, sitio de persistencia o latencia para el CMVH así como responsables para la diseminación en el cuerpo y se hipotetiza ser importantes en las manifestaciones de muchas enfermedades asociadas al CMVH.¹⁰⁻¹² La naturaleza antiviral del factor de necrosis tumoral es actualmente bien aceptada. Se ha reportado que el tratamiento con TNF de algunos tipos celulares reduce la infectividad de un gran número de virus sinergizando con el INF- γ y promueven un buen efecto antiviral. Se han comprobado sus efectos antivirales tanto *in vitro* como *in vivo*. El TNF- α tiene efectos antivirales contra el CMV.¹³⁻¹⁵ El receptor del factor de necrosis tumoral tipo I (TNF-RI) promueve la actividad citotóxica y lleva la señal para la muerte celular por apoptosis, el TNF-RII favorece la activación y proliferación del linfocito T (Figura 2).¹⁵⁻¹⁷ Es poco probable que un solo mecanismo explique la persistencia viral. El CMVH utiliza la combinación de estrategias para evadir al sistema inmune, incluso desconocidas, que contribuyen a la persistencia viral en huéspedes inmunocompetentes. Esta evasión y/o equilibrio con el sistema inmune es la esencia de la persistencia viral y el establecimiento de la latencia

viral.¹⁸⁻²² Por lo que en este trabajo se busca discernir si la infección por citomegalovirus humano modifica la expresión los receptores del factor de necrosis tumoral en su célula infectada.

Material y métodos

Células

Los monocitos fueron obtenidos a partir de concentrados leucocitarios de donadores sanos voluntarios del Hospital Central Militar, México, D.F., por medio de un gradiente con Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO (densidad 1,077 g/L) a temperatura ambiente centrifugando a 1,500 rpm por 30 minutos. Posteriormente la capa de células mononucleares se lavaron dos veces con PBS para retirar el ficoll. Las células mononucleares (8×10^6 células por mL) se suspendieron en cajas de cultivo con medio DMEN, suplementado con suero fetal bovino a 10% y ampicilina (100 g/mL) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ a 5% durante una hora, después de este tiempo se recuperaron las células adherentes que fueron divididas en tres grupos, dos de los cuales se estimularon con PMA durante un tiempo de 30 horas, transcurrido ese tiempo se eliminó el estímulo, sustituyéndolo con medio DMEN suplementado con SFB a 15% y un tercer grupo de células fueron infectadas con CMVH por 48 horas.

Virus e infección celular

Los concentrados de citomegalovirus humano (CMVH) cepa AD169 fueron titulados en las células MRC-5.²¹ Las células infectadas fueron recolectadas con más de 90% de efecto citopático, se congelaron a -70 °C. Cada concentrado (lisado celular total) de virus tuvieron títulos de 10^7 unidades formadoras de placa/mL para las infecciones celulares, la monocapa de fibroblastos MRC-5 confluentes fue incubada con CMVH AD169 con un MOI de 10. Después de una hora de absorción del virus, la capa celular se lavó y se cultivó por tres días en medio DMEM completo. Las células adherentes o monocitos estimulados con PMA se infectaron con la cepa AD-169 a una multiplicidad de infección (MOI) de 10, las células fueron contadas en la cámara de Neubauer, lavadas con PBS a 1300 rpm durante 10 minutos. Por cada 1×10^6 células se adicionó 100 μ L de virus, en 1 mL de medio DMEN, se centrifugaron a 1500 rpm por una hora a temperatura ambiente, posteriormente se retiró el sobrenadante (SN), y el precipitado celular fue lavado dos veces con PBS por 6 min a 1300 rpm a temperatura ambiente. Las células así infectadas fueron resuspendidas en medio DMEN suplementado con SFB a 15% y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂.

Purificación de DNA, PCR y detección del gen ul 123 del HCMV

Proteinasa K, Buffer de lisis (EDTA 0.1 M-NaCl 0.15M) -SDS 10% Fenol estabilizado pH8, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), éter etílico, etanol a 100 y 80%, acetato de sodio 3M,

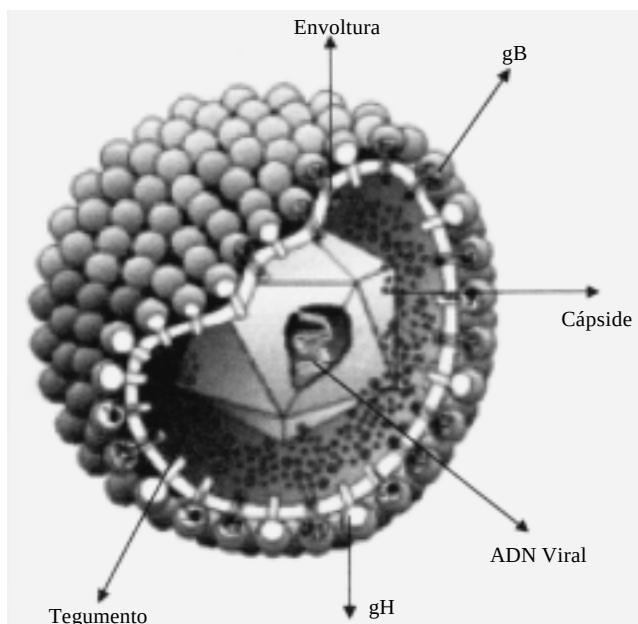


Figura 1. Citomegalovirus humano (Engstrom Robert R Jr.). El virión del HCMV posee rasgos estructurales que son característicos de la familia de los herpesvirus. Su genoma se encuentra contenido en la cápside, que se encuentra embebida en el tegumento, lecho proteico, que ocupa 40% de la masa proteica del virión; circunscribiendo a todas estas estructuras se encuentra la envoltura, constituida por una bicapa lipídica de origen celular con glicoproteínas de origen viral como la gB, gH, gM.

buffer TE (10mM Tris-HCL, 1mM EDTA). 1.5 mM de $MgCl_2$.

Para la amplificación de un segmento del gen *u123* por PCR se utilizó 1 μ L del DNA extraído por la técnica fenol-cloroformo, KC1 50 mM, Tris-HCl pH 8.5 10 mM, $MgCl_2$ 2 mM, los primers C y D 10 μ M de cada uno, dNTPs 0.25 mM, enzima Taq polimerasa (Gibco 10342-020) 0.5 uL (1.25 Unidades), todo en un volumen de reacción de 20 uL.

-Forbol 12 miristato 13-acetato (PMA). Sigma Chemical Co, St Louis MO, utilizada para estimular las células monocíticas.

Para la extracción de ADN de las células infectadas y sin infectar se utilizó la técnica de fenol-cloroformo y precipitación con etanol, en la cual dos millones de células se resuspendieron en 600 μ L de amortiguador de extracción y se le adicionó posteriormente proteinasa K a una concentración final de 100 μ L/mL incubándose 20 minutos a temperatura ambiente y después a 65 °C durante 20 minutos. Posteriormente se agregó 500 μ L de fenol saturado con Tris-HCL pH 8, agitándose suavemente durante 10 minutos y se centrifugó durante 10 minutos a 13,500 rpm a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se le adicionó 500 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico y se mezcló durante 5 minutos y luego se centrifugó a 13500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. La fase acuosa se recuperó y se le adicionó 200 uL de acetato de amonio 5 M+1 volumen de isopropanol frío mezclado completamente y se incubó a -20 °C toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 13500 rpm por 15 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y el botón se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 70%. Finalmente el DNA extraído se resuspendió en 50 μ L de agua desionizada y se cuantificó en un espectrofotómetro con luz UV a 260 nm y a 280 nm.

Para demostrar la infección *in vitro* de los monocitos estimulados con PMA se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), proceso enzimático empleado para amplificar secuencias de ADN del gen del CMVH con el que se infectaron las células. La PCR consiste en tres pasos principales. Desnaturalización del ADN, fusión de iniciadores o primers y amplificación del ADN. Se detectó el gen *UL123*, del cual se amplificó una región de 242 pares de bases (pb). Usando como iniciadores específicos:

1. '5'TGA-GGA-TAA-GCG-GGA-GAT-GT -3' (Accesso-lab, Invitrogen life technologies).

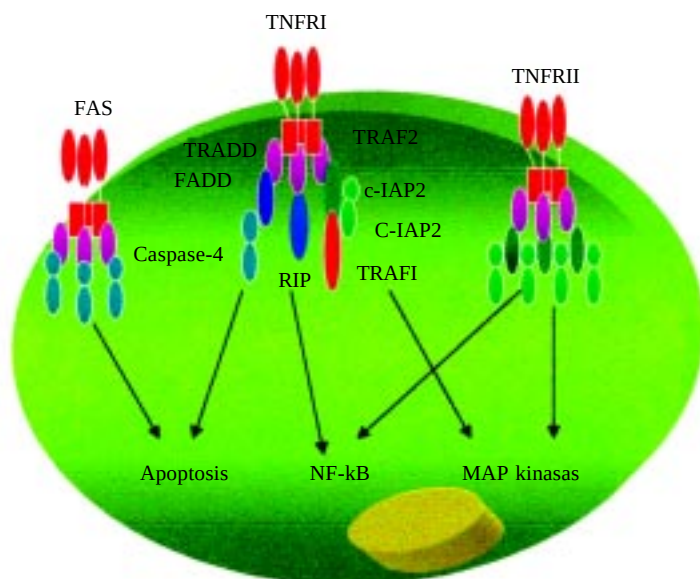


Figura 2. Vías de señalización de los receptores del TNF (TNFR I y TNFR II). Ambos receptores TNFR I y TNFR II son estimulados a través de la unión del TNF- α , reclutando una serie de proteínas que conllevan a la activación de la apoptosis o la traslocación del factor de transcripción NF- κ B y/o activación de las MAP-quinasas.

2. 5'ACT-GAG-GCA-AGT-TCT-GCA-GT -3' (Accesolab, Invitrogen life technologies).

Para la amplificación se utilizó 1 µl del ADN extraído por la técnica fenol-cloroformo, KC1 50 mM, Tris-HCl pH 8.5 10 mM, MgCl₂ 2 mM, los primers C y D 10 µM de cada uno, dNTPs 0.25 mM, enzima Taq polimerasa (Gibco 10342-020) 0.5 µL (1.25 unidades), todo en un volumen de reacción de 20 µL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Perkin-Elmer-Cetus, Emyrville, CA) bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo: 94 °C durante 5 min; 40 ciclos: 94 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min; y 1 ciclo de 72 °C durante 10 min.

Anticuerpos y expresión del receptor del TNF, CD14 y CD45

Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal de hámster anti-TNF-R1 conjugado con FITC (p55, CD120a sc-12746), anticuerpo monoclonal murino anti-TNF-R2 (p75, CD120b) ambos de Santa Cruz Biotechnology, fracción F(ab')₂-RPE anti-IgG murino (R048001) de DAKO, anticuerpos monoclonales murinos anti-CD45-FITC/CD14-PE de Ortho-mune y solución de inmunoglobulinas humanas (Grifols 200 mL).

El análisis fenotípico de las poblaciones celulares de monocitos se realizó con las técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta, utilizando anticuerpos monoclonales. El análisis se realizó en monocitos de los cuales se hicieron tres grupos: células monocíticas sin estímulo y sin infección, las células estimulas con PMA por 30 h y células estimuladas e infectadas con CMVH la infección con CMVH fue de 48 h. Los tres grupos permanecieron cultivadas el mismo tiempo, con medio DMEN suplementado con SFB a 15% 37 °C y 5% CO₂. Después de ese tiempo, las células se centrifugaron a 1,300 rpm por 6 minutos, las células fueron contadas en la cámara de New-bauer. De cada grupo de células se valoró el TNFRI, TNFRII, CD45, CD14 y el testigo de isotipo, en cada uno se colocaron dos millones de células, se lavaron con PBS a 1300 rpm por 6 minutos, posteriormente se adicionó a cada uno de los tubos inmunoglobulina humana normal (Flebogamma IV; GRIFOLS), 300 µL con una concentración de 0.015 g/mL para bloquear los receptores Fc. Se incubaron por 30 minutos a 4 °C, después de ese tiempo se lavaron dos veces con PBS y se centrifugaron a 1,300 rpm por 6 minutos. El TNFRI, CD45, CD14, utilizando la técnica de inmunofluorescencia directa se adicionó anti-TNFRI marcado con FITC, anti-CD45 marcado con FICT y anti-CD14 marcado con R-phycoerythrin (RPE), respectivamente. Se incubaron a 4 °C por 30 minutos, después de ese tiempo se lavaron dos veces con PBS a 1,300 rpm por 6 minutos. Y por inmunofluorescencia indirecta se marcaron el TNFRII y el testigo de isotipo, utilizando anti-TNFRII y IgG2a de ratón sin marcar como primer anticuerpo a cada uno como corresponde, incubando por 30 minutos a 4 °C, después de ese tiempo se lavaron dos veces con PBS a 1,300 rpm por 6 minutos. Y se agregó el segun-

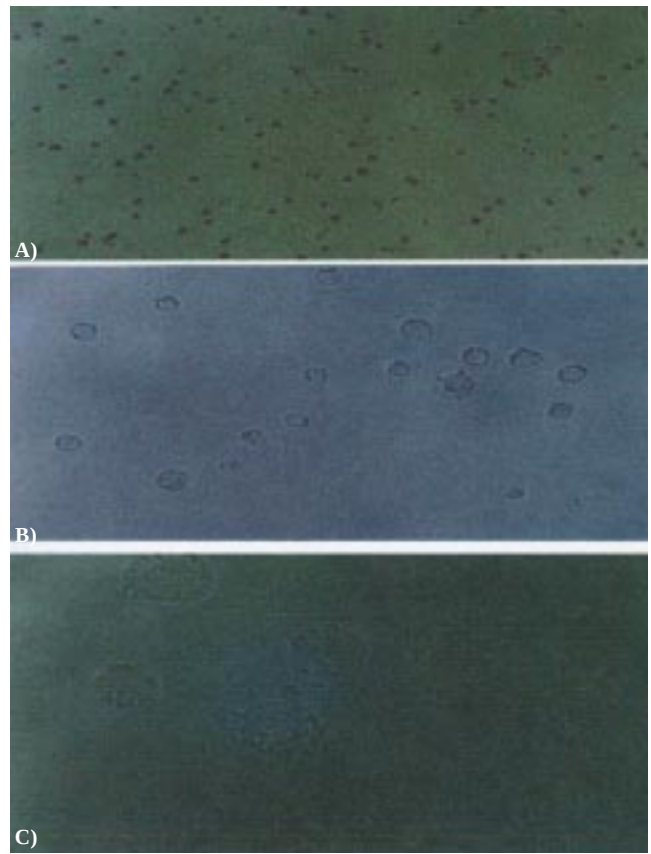


Figura 3. Cambios morfológicos de células monocíticas de sangre periférica humana. Células adherentes de sangre periférica humana. **A)** Población de células monocíticas. **B)** Células sin estimular. **C)** Células estimuladas con PMA 160 nM por 30 hrs. a diferente aumento.

do anticuerpo usando la fracción F(ab')₂ conjugado con RPE. Este mismo anticuerpo fue utilizado para marcar ambos, anti-TNFR y la IgG2a de ratón para el control de isotipo. El segundo anticuerpo se incubó a 4 °C por 30 minutos después de ese tiempo se lavaron dos veces con PBS a 1300 rpm 6 minutos. Las células marcadas con sus respectivos anticuerpos fueron fijadas con formaldehído a 2%, 250 µL y 250 µL de PBS.

Condiciones de lectura de fluorescencia en el FacS Calibur

Para analizar las moléculas de interés en la membrana de los monocitos infectados y no infectados se analizó la fluorescencia dada por el FITC y RPE de las células en un FacS Calibur (Becton Dickinson, San José CA) con el programa Cell Quest. Para la detección de los receptores se adquirieron 10,000 células o eventos que incorporaron los anticuerpos específicos con su fluorocromo.

Método estadístico

Todos los experimentos y mediciones fueron realizados en ocho ocasiones en forma independiente. Las figuras 3-4 muestran resultados de un experimento representativo de un individuo. El análisis estadístico de los datos obtenidos de

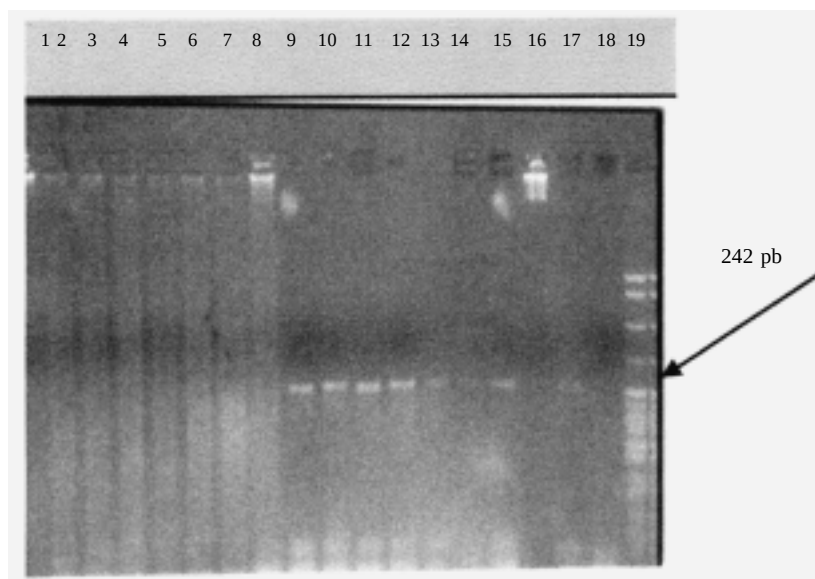


Figura 4. Detección del gen uL 123 del CMVH en células monocíticas a 48 horas postinfección. Del carril 1 al carril 8, monocitos no infectados. Del carril 9 al 16, monocitos infectados. Carril 17: Control Positivo. Carril 18: Control negativo. Carril 19: Marcador de tamaño molecular ADN pBR322/Mspl.

los ocho individuos se realizó por medio de un análisis de varianza usando la prueba de Friedman.

Resultados

En las células adherentes estimuladas con PMA por 30 horas, se observan los cambios morfológicos sufridos al estímulo con PMA, son células más grandes, menos redondas con aumento en su granularidad intracitoplasmática (*Figura 3*). Las células estimuladas con PMA 160nM por 30 horas y diferenciadas fueron infectadas con CMVH a una MOI de 10, centrifugadas a 1,500 rpm por 60 minutos. Para confirmar la incorporación del DNA viral se realizó la técnica de PCR para la detección de un segmento del gen *ul 123*. El producto de amplificación del gen del CMVH, se visualizó en las células infectadas y estimuladas con PMA más no en las células no infectadas (*Figura 4*).

Expresión de los receptores del TNF (CD120a y CD120b)

La expresión de los receptores del factor de necrosis tumoral fueron evaluados utilizando la técnica de inmunofluorescencia directa e indirecta. Se observó que en el TNFR1 no hubo inducción de su expresión bajo estímulo del PMA a 160 nM; sin embargo, los monocitos estimulados e infectados con HCMV disminuye su expresión encontrando una diferencia significativa de $p = 0.018$ por medio de la prueba de Friedman. La media de fluorescencia del TNFR I en el grupo de monocitos no estimulados y no infectados fue de 62.73, para el grupo estimulados, no infectados, fue de 84.90 y el grupo de estimulados e infectados fue de 41.15. El comportamiento de la expresión en los ocho individuos se muestra en las *figuras 5 y 6*.

La expresión de los receptores TNFR2 su comportamiento en los ocho individuos y en los tres grupos bajo condiciones

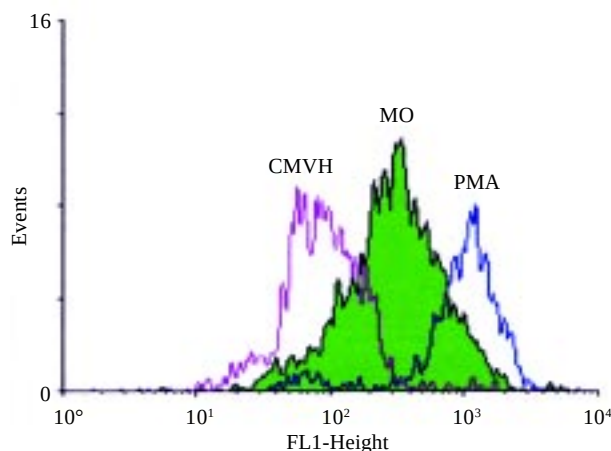


Figura 5. Expresión de los receptores TNFR 1 en monocitos estimulados y sin estimular e infectados con CMVH. Células adherentes de sangre periférica humana marcadas con anti-TNFR1 de un experimento. MO). Monocitos sin estimular y sin infectar. PMA) Estimulados con PMA a 160 nM por 30 horas. HCMV) Estimulados e infectados con CMVH 48 horas postinfección.

diferentes fue similar (*Figura 7*). En los monocitos sin infectar y sin estimular la media de fluorescencia de su expresión fue de 165.22, en los monocitos estimulado y sin infectar fue de 211.87, y en el grupo estimulado e infectado con HCMV 48 horas postinfección, la media fue de 46.13, encontrando que existe una diferencia significativa, con una $p = 0.030$ (*Figura 8*).

Para valorar la activación inducidos por el estímulo con PMA en las células monocíticas, se valoró mediante la expresión de moléculas de superficie CD14 y CD45. El comportamiento en los ocho individuos, excepto el individuo número 8, es similar. Encontrando que las moléculas de superficie CD14 en el grupo de células sin estimular y sin infectar presentan una media de fluorescencia de 208.83, en las células estimuladas y sin infectar la media de fluorescencia

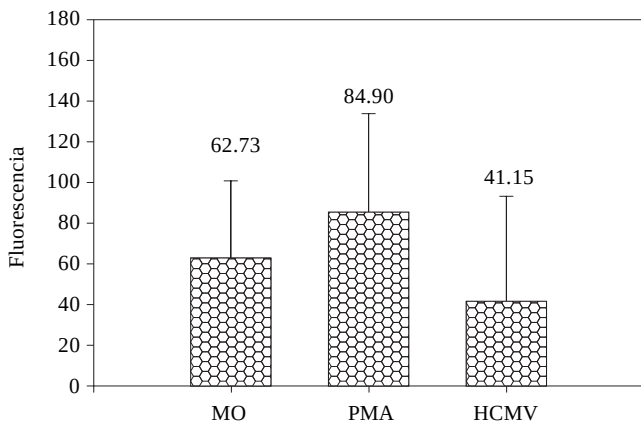


Figura 6. Expresión del TNFR I en monocitos de sangre periférica humana. La gráfica muestra la media de fluorescencia de los ocho individuos estudiados. En los monocitos sin estimular y sin infectar la media de fluorescencia es de 62.73, para los estimulados con PMA a 160 nM la media de fluorescencia fue de 84.90 y para los estimulados e infectados con HCMV 48 horas postinfección de 41.15 con una diferencia significativa de $p = 0.018$.

cia fue de 469.42 y el grupo de células estimuladas e infectadas con CMVH la media de fluorescencia fue de 110.23. En el análisis estadístico realizado en los datos obtenidos de los ocho individuos se encontró que existe una diferencia significativa con una $p \leq 0.001$ (Figuras 9 y 10). En la molécula CD45 se encontró una media de fluorescencia de 476.48 para las células no estimuladas y no infectadas, 649.98 de fluorescencia en células estimuladas no infectadas, y una media de fluorescencia de 401.19 en el grupo de células estimuladas e infectadas con CMVH 48 horas postinfección con una diferencia significativa de $p = 0.047$ (Figuras 11 y 12).

Discusión

En este trabajo de investigación se valoró la expresión de los receptores del factor de necrosis tumoral así como CD14 y CD45 en monocitos de concentrados leucocitarios de donadores sanos en tres diferentes condiciones; células sin estimular e infectar, células estimuladas y células estimuladas e infectadas con CMVH. Se demostró que en las células infectadas con CMVH 48 hrs. postinfección se presenta una disminución de moléculas CD14, CD45, así como de los receptores de factor de necrosis tumoral CD120a y CD120b. El TNFR I no fue inducible con el estímulo de PMA a 160 nM, sin embargo, en las células infectadas por HCMV se presentó una disminución significativa de este receptor.

El CMVH es un virus que ha evolucionado a la par del ser humano, como lo demuestra su especificidad de especie. Asimismo, ha desarrollado una variedad de mecanismos para evadir la respuesta inmune, desde utilizar lugares con barreras para ser protegido del sistema inmune, hasta hacer uso de la maquinaria de su célula huésped y modificar la expresión de moléculas de superficie. Hay estudios en los que se ha observado la participación del sistema TNF-

α , en la inducción de la reactivación y persistencia del HCMV.

La defensa inicial contra la invasión viral comienza con la respuesta inmune innata con la producción de diferentes citocinas, en la que participa el TNF- α que tiene efectos antivirales directos junto con el INF-gamma, actúan sobre las células infectadas impidiendo su replicación o llevando la célula infectada a la autodestrucción o apoptosis por medio de estímulo de receptores como son FAS-FASL, o por medio del estímulo del TNFR1 y 11.

Los receptores del TNF son importantes para la autodestrucción de la célula infectada o la inducción de mecanismos antivirales, es razonable sugerir que el CMVH puede inhibir procesos naturales de la apoptosis celular y le proporcione

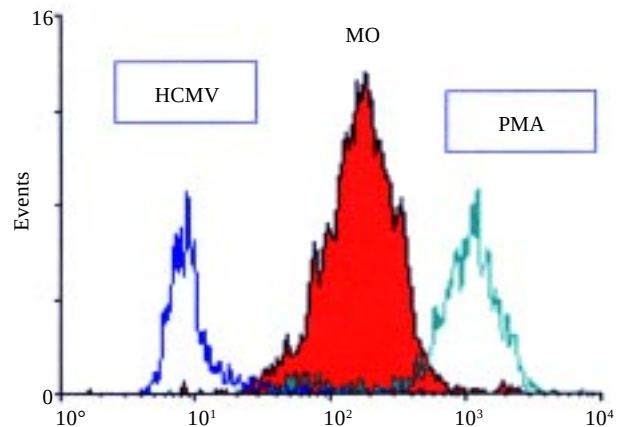


Figura 7. Expresión de los receptores TNFR 11 en monocitos estimulados y sin estimular e infectados con HCMV. Células adherentes de sangre periférica humana marcadas con anti-TNFR11 de un experimento. MO) Monocitos sin estimular y sin infectar. PMA) Estimulados con PMA a 160 nM por 30 horas. HCMV) Estimulados e infectados con CMVH 48 hr post-infección.

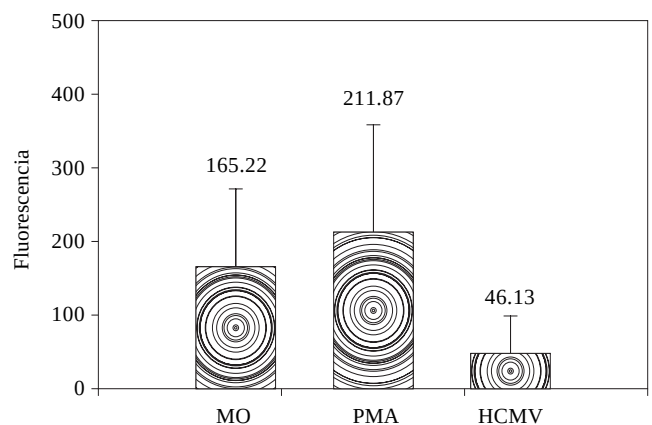


Figura 8. Expresión del TNFR II en monocitos de sangre periférica humana. La gráfica muestra la media de fluorescencia de los ocho individuos estudiados. En los monocitos sin estimular y sin infectar la media es de 165.22, para los estimulados con PMA a 160 nM, la media de fluorescencia fue de 211.87 y para los estimulados e infectados con HCMV 48 horas postinfección de 46.13. Con una diferencia significativa de $p = 0.030$.

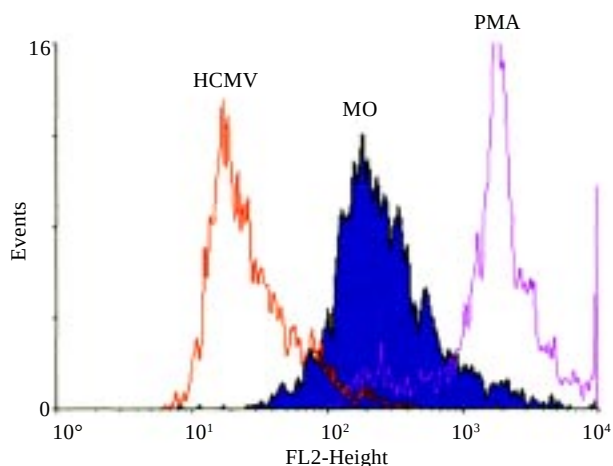


Figura 9. Expresión de CD14 en células monocíticas de sangre periférica de humanos. Células adherentes de sangre periférica humana marcadas con anticuerpos anti-CD14 de un experimento. MO) monocitos sin estimular y sin infectar. PMA) Estimulados con PMA a 160 nM sin infectar. HCMV) Estimuladas e infectadas con CMVH 48 horas postinfección.

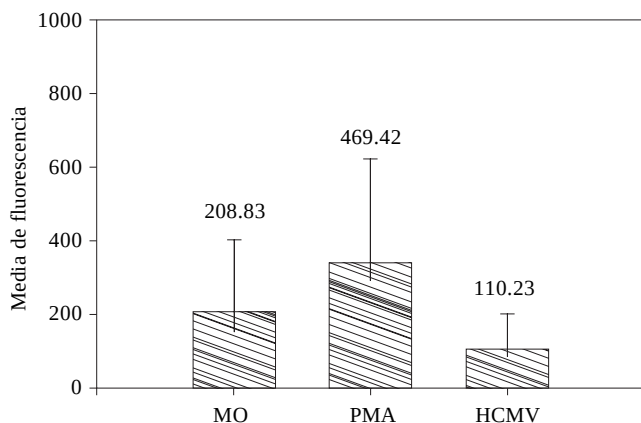


Figura 10. Expresión de la molécula CD14, en monocitos de sangre periférica humana. La gráfica muestra la media de fluorescencia de los ocho individuos estudiados. En los monocitos sin estimular y sin infectar la media de fluorescencia fue de 208.83, para los estimulados con PMA a 160 nM la media de fluorescencia fue de 469.42 y para los estimulados e infectados con HCMV 48 horas postinfección de 110.23 con una diferencia significativa de $p < 0.001$.

al virus ventajas, facilitando su capacidad de replicar, distribuir y mantener infecciones persistentes.

Como se puede observar los monocitos de sangre periférica de humanos que no han sido estimulados *in vitro* presentan niveles de expresión de CD14 y CD45, diferentes a aquellos que son estimulados con PMA, así como los que son infectados con HCMV. Los monocitos tratados con PMA adquieren una mayor densidad tanto de CD14 como de CD45(+) en la superficie celular, mientras tanto cuando las células estimuladas son además infectadas con HCMV la expresión de CD14 y CD45 disminuye (Figuras 6 y 10), en estos últimos se presenta un fenómeno probablemente de desdiferenciación celular o desregularización de estas moléculas de superficie, sin embargo, habría que evaluar si la

población que pierde los marcadores es aquella que está infectada, o eventualmente que se induzca “mitosis” por activación mediada por la infección viral (casi imposible, ya que los monocitos pierden la capacidad mitótica), la cual daría lugar a una nueva población con baja expresión de los marcadores. Esta disminución de moléculas de superficie de activación de monocitos CD14 y CD45, ¿daría ventajas al virus a silenciar la respuesta inmune y ser reconocido probablemente como un mecanismo de evasión y supervivencia?

El TNFRI ha sido descrito como un receptor constitutivo de los monocitos, sin embargo, en nuestra experiencia, los monocitos humanos expresan muy bajos niveles, aun cuando han sido estimulados con PMA lo cual nos indica y con-

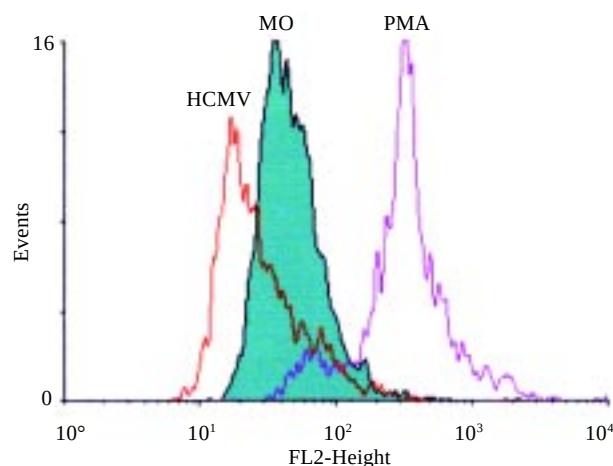


Figura 11. Expresión de CD45 en monocitos estimulados y sin estimular e infectados con HCMV. Células adherentes de sangre periférica humana marcadas con anti-CD45 de un solo experimento. MO) Monocitos sin estimular y sin infectar. PMA) Estimulados con PMA 160 nM por 30 horas. HCMV) Estimulados e infectados con CMVH 48 horas postinfección.

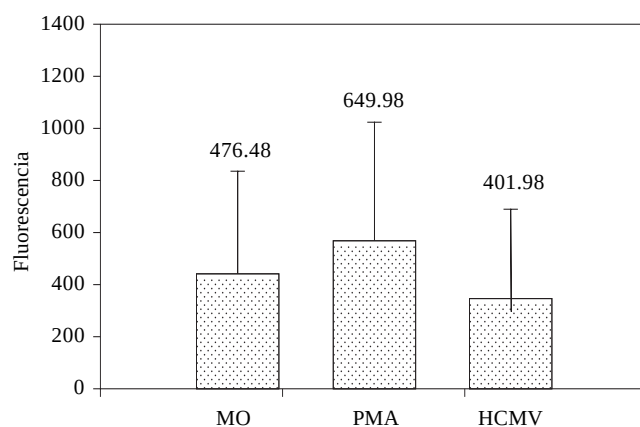


Figura 12. Expresión de la molécula CD45, en monocitos de sangre periférica humana. La gráfica muestra la media de fluorescencia de los ocho individuos estudiados. En los monocitos sin estimular y sin infectar la media de fluorescencia es de 476.48, para los estimulados con PMA a 160 nM la media de fluorescencia fue de 649.98 y para los estimulados e infectados con HCMV 48 horas postinfección de 401.98. Con una diferencia significativa de $p = 0.047$.

firma que el TNFRI no es inducible al menos con el estímulo de PMA a 160 nM, y esta baja densidad es poco detectable con nuestro sistema utilizado de anticuerpos anti-TNFRI. Aún así nosotros evaluamos si el CMVH es capaz de aumentar el número de receptores en la superficie celular de monocitos infectados con HCMV, ya que se describe que las infecciones virales aumentan el número de receptores del TNF. Pero el resultado fue negativo; no es aumentado, por el contrario con la infección con HCMV disminuye por debajo de los niveles constitutivos encontrados con nuestro sistema.

Estos resultados sugieren que la susceptibilidad de un monocito *in vivo* a la apoptosis mediada por TNF- α tiene un poderoso candado representado por TNFRI, que reiteradamente impediría la muerte de los monocitos en periferia en presencia del TNF- α circulante.

Otro resultado interesante fue la disminución del TNFRII inducida por HCMV probablemente representa un mecanismo a través del cual el virus impide la activación del monocito, contribuyendo con esto probablemente al establecimiento de un estado de reposo relativo en el que el virus toma ventajas para su replicación, supervivencia y latencia.

Es probable que la disminución de los TNFRII por un lado lleven al monocito a un estado de reposo relativo durante la infección y, por otro lado, la disminución de los TNFRII podrían permitir que el complejo antiapoptótico, al disminuir TNFRII, se uniera más al TNFRI evitando la auto-destrucción de la célula infectada, lo que le daría ventajas al HCMV de persistir su célula huésped.

Considero que es necesario seguir investigando sobre este fenómeno y tratar de dilucidar el mecanismo por el cual el virus modifica la expresión en la superficie celular de moléculas y de los receptores del factor de necrosis tumoral CD120a y CD120b, como un mecanismo de evasión y persistencia viral.

Referencias

1. Trine H, Mogensen and Soren R Paludan. Molecular Pathway in Virus-Induced Cytokine Production Microbiology and Molecular Biology Reviews 2001; 65 (1): 131-50.
2. Chee MS, Bankier AT, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus AD169. Curr Top Microbiol Immunol 1990; 1154: 125.
3. Nordoy I, Muller F, Knut PN, Rollai H, Lien E, Aukrust P. The Role of the Tumor Necrosis Factor System and Interleukin-10 during Cytomegalovirus Infection in Renal Transplant Recipients. The Journal of Infectious Diseases 2000; 181: 51-7.
4. Grundy JE, Lawson KM, MacCormac LP, Flecher KM. CMV-infected endothelial cells recruit neutrophils by the secretion of C-X-C cytokines and transmit virus by direct neutrophil-endothelial cell contact and during neutrophil transendothelial migration. J Infect Dis 1998; 177: 1465-74.
5. Yorken JA, Record M, Preval C, Davrinche C, Davignon JL. Distinct Pathways for Tumor Necrosis Alpha and Ceramides in Human Cytomegalovirus Infection. Journal of Virology 1998; 72: 2316-23.
6. Landini MP, Lazzarotto T, Xu J. Immune Response to CMV Latency-Associated ORF's. Biology of blood and Marrow Transplantation 2001; 6 (2): 100-8.
7. Braunwald FW, Wilson I, Kasper M, Longo H. Principios de Medicina Interna, Harrison, 14ª Edición, Madrid: Mc Graw Hill, 1998; 2: 1250-4.
8. Cotsman D, Mullberg J, Claire L, Chin W et al. ULBPs, Novel MHC class 1-Related Molecules, Bind to CMV Glycoprotein UL16 and Stimulate NK Cytotoxicity through the NKG2D Receptor. Immunity 2001; 14: 123-33.
9. Van der Berg AP, Meyaard L, Otto SA, Klompmaaker U, Mesander G. Cytomegalovirus infection associated with a decreased proliferative capacity and increased rate of apoptosis of peripheral blood lymphocytes. Traspl Proc 1995; 27: 936-8.
10. Taylor JW, Sissons JGP, Borysiewics LK, Sinclair JH. Monocytes are site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. The Journal of General Virology 1991; 72: 2059-64.
11. Hahn C, Jores R, Mocarski E. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. The National Academy of Science 1998; 95: 3937-42.
12. Dankner WM, McCutchan JA, Richman DD, Hirata K, Spector SA. Localization of Human Cytomegalovirus in Peripheral Blood Leukocytes by In Situ Hybridization. The Journal of Infectious Diseases 1990; 161: 31-6.
13. Söderberg CN, Fish KN, Nelson JA. Interferon-gamma and tumor Necrosis factor- α Specifically Induce formation of Cytomegalovirus-permissive Monocytes-derived Macrophages that are refractory to the Antiviral Activity of these Cytokines. J Clin Invest 1997; 100 (12): 3154-63.
14. Michelsson S, Aclami J, Danelipur D, Bachelier F, Picard L. Human Cytomegalovirus infection induces transcription and secretion of transforming growth factor B1. J Virol 1994; 68: 5730-7.
15. Koszinowsky UH, Del Val M, Reddhas MJ. Immune response to cytomegalovirus infection. Curr Top Microbiol Immunol 1990; 154: 189-220.
16. Hestdal K, Aukrust P, Muller F, Froland S. Dysregulation of Membrane-Bound Tumor Necrosis Factor- α and tumor necrosis factor Receptors on Mononuclear cell in human immunodeficiency Virus Type 1 Infection; Low Percentage of p75-Tumor Necrosis factor Receptor Positive Cell in Patients With Advanced Disease and High Viral Load. Blood 1997; 90 (7): 2670-9.19.
17. Peschon J, Ruby J, Bluethmann H. Antiviral Activity of Tumor Necrosis Factor (TNF) Is Mediated via p55 and p75 TNF Receptors. J Exp Med 1997; 186 (9): 1591-6.
18. Camelo, Lafage M, Galelli A, Lafon M. Selective role for the p55 Kd TNF- α receptor in immune unresponsiveness induced by an acute viral encephalitis. Journal of neuroimmunology 2001; 113: 95-108.
19. Spiller OB, Morgan BP, Tufaro F, Devine DV. Altered expression of host-encoded complement regulators on human cytomegalovirus-infected cells. Eur J Immunol 1996; 26: 1532-8.
20. Borysiewicz LK, Sissons GP. Cytotoxic T cells and human herpes virus infections. Curr Top Microbiol Immunol 1994; 189: 123-150.
21. Yurochko AD, Huand E. Human Cytomegalovirus Binding to Human Monocytes Induced Immunoregulatory Gene Expression. The Journal of Immunology 1999; 162: 4806-16.
22. Humar A, Louis St, Mazzulli, McGeer A, Lipton J, Messnes H, MacDonald S. Elevated serum Cytokines are associated with Cytomegalovirus Infection and Disease in Bone marrow Transplant recipients. The Journal of Infectious disease 1999; 179: 484-8.