

U
A
H

**BÚSQUEDA DE NUEVOS ANTÍGENOS DE
HCMV CON POTENCIAL INMUNOGÉNICO
PARA LA FORMULACIÓN DE UNA VACUNA.**

**SEARCH FOR NEW HCMV ANTIGENS WITH
IMMUNOGENIC POTENTIAL FOR VACCINE
FORMULATION.**

**Máster Universitario en Microbiología aplicada a la Salud Pública e
Investigación en Enfermedades Infecciosas**

Presentado por:

Lucía Armán Fernández

Dirigido por:

D. Francisco José Mancebo Pascual

Dra. Estéfani García Ríos

Dra. Pilar Pérez Romero

Alcalá de Henares, a 19 de junio de 2023

ÍNDICE

<u>RESUMEN</u>	5
<u>ABSTRACT</u>	6
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	7
1.1. ESTRUCTURA DEL VIRUS.....	8
1.2. GENOMA	9
1.3. CICLO.....	11
1.4. SISTEMA INMUNE.....	12
1.4.1. SISTEMA INMUNE INNATO	12
1.4.2. SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO.....	13
1.5. VACUNA	13
<u>2. OBJETIVOS</u>	15
<u>3. MATERIAL Y MÉTODOS</u>	16
3.1. CÉLULAS, MEDIO Y VIRUS.....	16
3.2. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES Y CLONACIÓN	16
3.3. SUEROS	17
3.4. TRANSFECCIÓN DE LAS CÉLULAS HEK 293T, EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS Y CUANTIFICACIÓN	17
3.5. LISADO DE PROTEÍNAS.....	17
3.6. WESTERN BLOT	18
3.7. WESTERN BLOT NATIVO	19
3.8. ELISA	19
<u>4. RESULTADOS</u>	20
4.1. COHORTE Y TÍTULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES INDUCIDOS POR INFECCIÓN NATURAL	20
4.2. CLONACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE HCMV	21
4.3. DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.....	21
4.4. RESULTADOS DE WESTERN BLOT NATIVO.....	22
4.5. RESULTADOS ELISA.....	24

<u>5.</u>	<u>DISCUSIÓN</u>	<u>30</u>
<u>6.</u>	<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>34</u>
<u>7.</u>	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>35</u>
<u>8.</u>	<u>ANEXO.....</u>	<u>43</u>

RESUMEN

El citomegalovirus humano (HCMV) es un *betaherpesvirus* humano de tipo 5 (HHV5) con una alta prevalencia global y que supone un problema muy grave principalmente en personas inmunocomprometidas, como los pacientes con un trasplante de órgano sólido (TOS). Hasta la fecha a pesar de los múltiples esfuerzos, no se ha conseguido desarrollar una vacuna eficaz que impida la infección y propagación de este virus. Nuestro grupo identificó que el genoma de HCMV presenta 77 proteínas con dominios transmembrana, de las cuales muchas de ellas todavía se desconoce su función y que podrían estar involucradas en procesos tan importante como la entrada del virus o la modulación del sistema inmune. Estas proteínas de membrana podrían inducir la respuesta inmune humoral mediante la producción de anticuerpos neutralizantes (Nabs), por lo que podrían ser posibles candidatas para la formulación de una posible vacuna. En este trabajo, se evaluaron 9 proteínas, (6 transmembrana y 3 citosólicas) de las cuales algunas de ellas tienen un papel esencial en el ciclo replicativo viral o inmunomodulación. Para ello se utilizó la técnica de ELISA utilizando lisados transfectados con los antígenos de HCMV tanto en condiciones nativas como reductoras. Para ello, se utilizaron sueros de una cohorte de 12 pacientes con TOS de los cuales se disponía de un suero pre-inmunización y post-inmunización para determinar si había reconocimiento específico de estas proteínas. Los resultados indicaron que las proteínas más reconocidas fueron, UL44, UL57, UL75 y UL83, mientras que las menos reconocidas en ambas condiciones fueron US12, US30 y RL11. Pensamos que la técnica utilizada es válida para la búsqueda de proteínas de HCMV que puedan estimular la respuesta inmune de los pacientes, sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios funcionales para determinar su posible actividad neutralizante o de estimulación de la respuesta celular.

Palabras clave: HCMV, pacientes trasplante de órgano sólido, ELISA, epítomos conformacionales, epítomos lineales, anticuerpos neutralizantes.

ABSTRACT

Human cytomegalovirus (HCMV) is a human betaherpesvirus of type 5 (HHV5) with high global prevalence and poses a serious problem mainly in immunocompromised individuals, such as patients undergoing solid organ transplantation (SOT). Despite multiple efforts, an effective vaccine to prevent HCMV infection and spread has not been developed to date. Our group identified that the HCMV genome encodes 77 proteins with transmembrane domains, many of which still have unknown functions and could be involved in important processes such as virus entry or immune system modulation. These membrane proteins could induce humoral immune response by producing neutralizing antibodies (Nabs), making them potential candidates for vaccine development. In this study, we evaluated 9 proteins (6 transmembrane and 3 cytosolic), some of which play an essential role in viral replicative cycle or immunomodulation. ELISA technique was used, employing lysates transfected with HCMV antigens under both native and reducing conditions. Sera from a cohort of 12 SOT patients, including pre-immunization and post-immunization samples, were used to determine specific recognition of these proteins. The results indicated that the most recognized proteins were UL44, UL57, UL75, and UL83, while the least recognized proteins under both conditions were US12, US30, and RL11. We believe that the technique used is valid for the identification of HCMV proteins that can stimulate the immune response in patients. However, functional studies are needed to determine their potential neutralizing activity or stimulation of cellular response.

Keywords: HCMV, solid organ transplant patients, ELISA, conformational epitopes, linear epitopes, neutralizing antibodies.

1. INTRODUCCIÓN

El citomegalovirus humano (HCMV) es un *betaherpesvirus* humano de tipo 5 (HHV5) perteneciente a la familia *Herpesviridae*¹. La prevalencia global de este virus varía entre un 25% y un 95% dependiendo de diversos factores socio-económicos, teniendo una mayor prevalencia en países en vías de desarrollo².

HCMV se transmite a través de múltiple vías como la saliva, sangre, contacto sexual, heces, leche materna, a través de trasplante de órgano sólido (TOS) o transfusión sanguínea, así como, por vía vertical de madres a hijos a través de la placenta causando una infección congénita¹. Además, se trata de un patógeno oportunista con un amplio tropismo celular, siendo capaz de infectar la mayoría de tipos celulares, como por ejemplo, células epiteliales, fibroblastos o células del linaje mieloide, entre otros³.

En general, la infección por HCMV en personas inmunocompetentes cursan la enfermedad de forma asintomática o con síntomas leves, generalmente parecido a la mononucleosis. Sin embargo, en personas inmunodeprimidas o con un sistema inmune inmaduro, como en pacientes con trasplante, en personas con VIH, cáncer o durante la infección congénita o recién nacidos en los que es la infección oportunista más común, está asociado a complicaciones graves. Además, debido a que HCMV establece infección latente durante toda la vida con reactivaciones periódicas a lo largo de la vida supone un problema recurrente en esta población^{1,4}.

Los pacientes TOS más vulnerables a HCMV y que presentan un mayor riesgo de rechazo del órgano son aquellos receptores seronegativos que reciben un órgano del donante seropositivo⁴. Esto ocasiona que tengan un alto riesgo de infección, reactivación de infecciones latentes y pérdida del injerto, por lo que es de vital importancia evaluar la carga viral y la inmunidad del receptor antes de realizar el trasplante^{5,6}.

Actualmente para el tratamiento de HCMV se emplea una combinación de fármacos inmunosupresores y en casos de desarrollar eventos de replicación se utilizan los antivirales disponibles como el ganciclovir o valganciclovir como primera línea de tratamiento⁷. Sin embargo, en la actualidad es cada vez más frecuente la aparición de cepas de HCMV que adquieran resistencia a estos fármacos. Además, su elevada toxicidad para el paciente hace que sea necesario continuar investigando para encontrar fármacos seguros y eficaces contra HCMV, siendo además otro motivo de peso para seguir invirtiendo en encontrar una vacuna efectiva frente a este virus⁴.

Desde los años 70 se han intentado desarrollar una gran cantidad de tipos de vacunas utilizando diferentes cepas de HCMV, virus atenuados, de ADN, ARN, así como distintas terapias con anticuerpos tanto monoclonales como policlonales. Sin embargo, en la actualidad ninguna de ellas ha generado una respuesta robusta capaz de combatir la infección. Una de las principales limitaciones de las vacunas desarrolladas ha sido la falta de inducción de anticuerpos funcionales capaces de bloquear la infección impidiendo la entrada del virus en la célula o la transmisión célula-célula⁸.

Debido al elevado coste social, médico y económico, encontrar una vacuna frente al HCMV es prioritario para la Salud Pública. Actualmente no existe ninguna vacuna protectora y la resistencia a los antivirales disponibles hace necesario seguir investigando sobre la patogénesis de este virus para encontrar mecanismos alternativos para bloquear la infección¹. Por todo ello, es de especial importancia el estudio y la búsqueda de proteínas virales capaces de generar una respuesta inmune que nos permitan desarrollar nuevas formulaciones de vacunas que induzcan protección frente a la infección por HCMV.

1.1. Estructura del virus

El genoma del HCMV encuentra empaquetado dentro de una nucleocápside icosaédrica rodeada por una matriz proteica, conocida como tegumento. Este tegumento está conformado por varios tipos de proteínas, normalmente fosforiladas, como pp65 (UL83) o pp150 (UL32). Aún no se conoce la totalidad de las proteínas que lo forman ni todas sus funciones, pero se sabe que algunas son imprescindibles para la infección viral⁹. Por ejemplo, pp65 es trasladada al núcleo de la célula y activa a los genes que participan en el ciclo lítico, además de participar en la evasión del sistema inmune^{10,9}. La proteína pp150 participa en la maduración de los viriones y parece tener una función en la entrada viral^{11,9}. Ambas son altamente inmunogénicas y son las dos proteínas más abundantes del tegumento⁹.

El tegumento a su vez se encuentra envuelto por una bicapa lipídica que proviene de la célula infectada y está formada por proteínas del huésped y del propio virus¹². Por tanto, la envuelta viral también es diferente en función del tipo de célula infectada³. Dentro de las proteínas que forman parte de la envuelta viral, se encuentran algunos complejos glicoproteicos esenciales para la infectividad del virus, como el complejo pentamérico (gH, gL, UL128-UL131) y los complejos gCI (dímero gB), gCII (gM, gN) y gCIII (gH, gL, gO)^{3,12} que se pueden apreciar en la Figura 1.

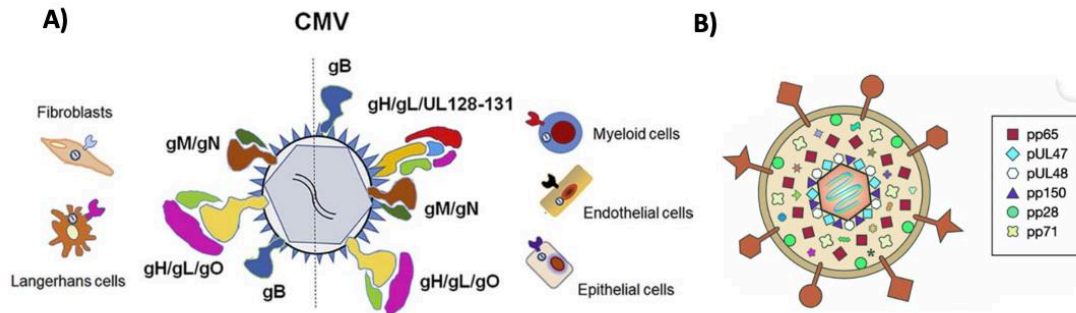


Figura 1. A) Representación gráfica del virión de HCMV donde se pueden apreciar los complejos glicoproteicos más importantes³. **B)** Representación gráfica de una partícula infecciosa viral donde se detallan algunas de las proteínas que conforman el tegumento⁹.

Todos estos complejos intervienen en la entrada viral a las células que infectan. Por ejemplo, la proteína gB, (codificada en UL55¹³) que forma parte del complejo gCI y que es la mayoritaria en la envuelta viral, tiene un papel en la fusión de las membranas. Las proteínas gH (codificada en UL77¹³) y gL (codificada en UL115¹³) del complejo gCIII son necesarias para la activación de la actividad fusogénica de gB y gO coopera con gH para actuar como un correceptor que permite la fusión de membranas. Sin embargo, otras de las proteínas de la envuelta viral aún no se han caracterizado y podrían tener un papel esencial en la interacción virus-célula huésped.

Este virus es capaz de infectar muchos tipos diferentes de células y para hacerlo utiliza diferentes dominios y receptores. En este sentido, el complejo pentamérico es esencial para la infección de células endoteliales, epiteliales y dendríticas¹⁴, mientras que para la infección de los fibroblastos son necesarias las proteínas gB y gH¹⁵.

1.2. Genoma

El HCMV tiene un genoma de ADN de doble cadena (dsADN) de aproximadamente 236 kpb, siendo el virus de mayor tamaño capaz de infectar a humanos. Su genoma tiene una arquitectura genómica de tipo E y está formado por dos regiones únicas, una corta (US) y una larga (UL), ambas flanqueadas por repeticiones invertidas de larga (TLR/IRL) y corta (TRS/IRS) repetición^{12,16} (Figura 2). Tiene un contenido en GC de aproximadamente un 57,5%, uno de los más altos de los virus de su familia¹².

1.3. Ciclo

Dependiendo del tipo celular, la entrada del virus se produce de distinta forma. En fibroblastos, el gCIII interacciona con el receptor del factor de crecimiento de plaquetas PDGFR α ^{22, 23, 24, 25} y las integrinas²⁶. Esto desencadena la fusión de envuelta del virión con la membrana de la célula en un proceso independiente del pH mediado probablemente por gB Y gH/gL/gO²⁷ (Figura 3A). Sin embargo, en las células epiteliales, endoteliales y células mieloides, la entrada ocurre a través de la interacción entre el complejo pentamérico interacciona con el receptor de la neuropilina 2 (Nrp2) y el miembro de la familia de receptores olfatorios OR14I1^{28, 29} lo que produce la entrada del virus en las células por endocitosis en un proceso dependiente de pH, necesitando que el pH sea bajo³⁰, siendo necesaria la acidificación de las vesículas para la liberación de las partículas víricas al interior de las células³¹ (Figura 3B). En las células epiteliales y endoteliales se sospecha que hay un receptor todavía desconocido que interacciona con el gCIII, siendo necesario también para la entrada en estos dos tipos celulares³².

Posteriormente, se libera la cápside que contiene el genoma viral y las proteínas del tegumento en el interior de la célula, comenzando el proceso de replicación del genoma del virus y la expresión génica que favorecerá la evasión del sistema inmunitario⁹.

En primer lugar, comienzan a expresarse los genes inmediatamente tempranos que hacen que el virus siga la vía lítica de infección y estimula la expresión de los genes tempranos que comienzan a replicar el ADN. Una vez replicado el ADN, se expresan los genes tardíos que codifican para los componentes estructurales del virión y participan en el ensamblaje y salida de los nuevos viriones. Las proteínas del tegumento se acumulan durante las últimas fases de la infección y colaboran en el ensamblaje de los nuevos viriones⁹.

Tras la primoinfección, HCMV establece una infección latente en determinados tipos celulares, para lo cual silencian tras la infección los genes inmediatos tempranos, reduciendo su expresión génica al mínimo, y evitando de esta manera el reconocimiento del virus por parte del sistema inmune dejando de producirse nuevas partículas virales³³.

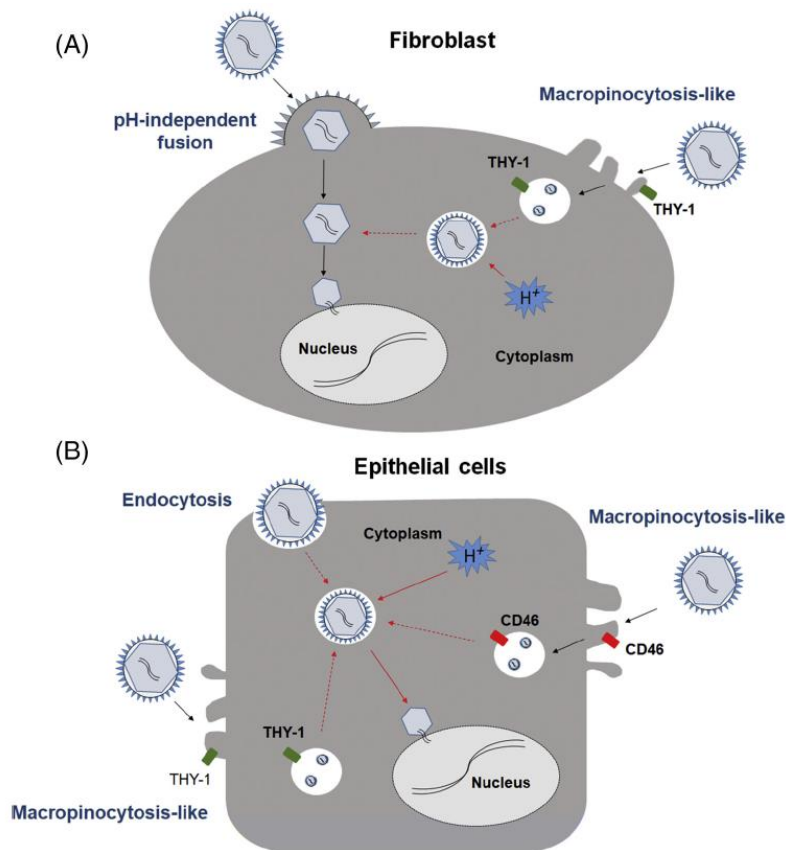


Figura 3. A) Representación gráfica del ciclo viral en fibroblastos. B) Representación gráfica del ciclo viral en células epiteliales³.

1.4. Sistema inmune

HCMV induce tanto una respuesta innata como adaptativa¹³.

1.4.1. Sistema inmune innato

La primera línea de defensa contra el HCMV viene por parte de las células T γ/δ y las células NK CD57⁺ NKG2C^{bright}³⁴ que se activan en respuesta al estímulo que causan péptidos derivados de UL40³⁵.

Los anticuerpos son capaces de producir respuestas no neutralizantes, como la citotoxicidad celular dependientes de anticuerpos (ADCC) al unirse al receptor Fc γ R-III de las células NK, lo que provoca la apoptosis de la célula infectada³⁶. Además, también se producen otros procesos en los que median los anticuerpos, como la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) o la activación del sistema del complemento³⁷. Se ha visto que la respuesta innata se produce tempranamente en los niños que sufren infecciones congénitas y en los pacientes con TOS o trasplante de células hematopoyéticas, donde el porcentaje de estas células se ve

aumentado en respuesta a un estímulo antigénico específico³⁸. Además, la infección por HCMV desencadena la producción de diferentes citocinas, como IL-1, IL-6 o TNF α que participan en la estimulación de los diferentes tipos de células que participan en la respuesta inmune innata y adaptativa³⁹.

1.4.2. Sistema inmune adaptativo

La respuesta adaptativa es fundamental en el control de la infección por HCMV¹³. Por este lado, participan en la respuesta varios tipos de anticuerpos, entre los que se encuentran los anticuerpos neutralizantes, y las inmunoglobulinas, que se ha podido comprobar que son clave en el control de la enfermedad por HCMV en recién nacidos infectados congénitamente y reducen las tasas de infección primaria en las mujeres seronegativas embarazadas⁴⁰. De igual forma, el papel de los linfocitos T CD4+ y CD8+ es esencial para controlar la infección por HCMV¹³. En este caso, se ha demostrado que las células T CD4+ son las que guían la respuesta celular contra el HCMV en pacientes con TOS con un papel secundario de las células T CD8+ a las que activan gracias a la secreción de interleucinas, como la IL-2⁴¹. Las principales dianas de las células T CD4+ son IE1 (codificada en UL123), pp65 (codificada en UL83), gH y gB¹³.

Los anticuerpos neutralizantes se encuentran principalmente dirigidos frente a las proteínas que conforman los complejos gCI, gCII y gCIII¹³. Sin embargo, dentro de ellos destaca particularmente gB⁴² y el complejo pentamérico⁴³ debido a que son contra las que más anticuerpos neutralizantes se producen tras una infección por HCMV.

Se hicieron estudios en mujeres seropositivas antes del embarazo que habían transmitido la infección al feto debido a reinfecciones con cepas diferentes. Mediante la técnica de ELISA se podía detectar una respuesta específica de los anticuerpos frente a las glicoproteínas gH y gB⁴⁴.

1.5. Vacuna

Actualmente no se dispone de ninguna vacuna eficaz que confiera protección a largo plazo frente a la infección por HCMV. Una vacuna ideal debería ser capaz de inducir una respuesta inmune específica amplia incluyendo anticuerpos funcionales y linfocitos T CD4+ y CD8+ capaz de conferir al individuo protección frente a la infección^{8, 13}.

Las proteínas mayormente utilizadas hasta la fecha son la proteína gB, el complejo pentamérico y pp65 debido a su papel en el ciclo de infección y su potencial capacidad de inducir una respuesta inmune completa¹³.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las proteínas de la envuelta formada por diferentes proteínas y complejos proteicos podrían ser candidatas para el desarrollo de una vacuna, debido a su potencial capacidad de inducir una respuesta inmune de anticuerpos con funcionalidad distinta como anticuerpos neutralizantes y aquellos que median procesos de citotoxicidad mediada por anticuerpos implicados en el bloqueo del virus libre o en la propagación célula a célula, respectivamente con un papel desconocido, pero fundamental, en la entrada viral^{3,17}.

En el trabajo realizado por nuestro laboratorio *Mancebo et al. 2022* se identificaron 77 proteínas con dominio transmembrana que podrían ser candidatas para el desarrollo de una vacuna. De ellas, 39 proteínas (Figura 4) estaban altamente conservadas en todas las cepas de HCMV y presentes tanto en las cepas utilizadas en el laboratorio como las principales cepas clínicas circulantes, a estas proteínas se le denominó *core*. Entre sus funciones algunas actúan en la entrada a la célula y mecanismos de inmunoevasión, aunque 17 de ellas siguen teniendo una función desconocida (Figura 4). Mejorar el conocimiento de la función de las proteínas del HCMV es vital para poder desarrollar vacunas eficaces contra este virus.

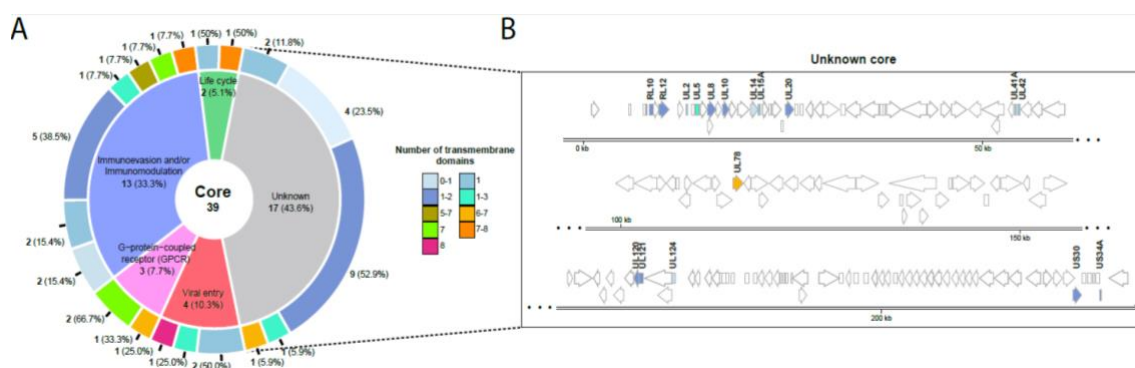


Figura 4. A) Representación de las 39 proteínas que constituyen el *core* agrupadas por la función que desempeñan y el número de dominios transmembrana por el que están formadas. **B)** Posición en el genoma de las 17 proteínas con función desconocida¹⁷.

En la actualidad hay dos ensayos clínicos de vacunas en fase II y fase III de diferentes tipos: subunidades recombinantes, vectores virales, vivas atenuadas y de ARNm⁴⁵. Un ejemplo de una de las vacunas que ha llegado hasta fase III es la vacuna ASP01131 (NCT01903928), basada en la combinación de dos plásmidos que codifican para la proteína gB y la pp65, pero que no mostró una inducción completa de la respuesta inmunitaria específica frente al HCMV ni inmunidad a largo plazo⁴⁶. Además, ha presentado ciertas limitaciones relacionadas con la no inclusión de grupos de riesgo y la evaluación de los efectos indirectos de la infección por HCMV, como la asociación de este virus con otras enfermedades (ateroesclerosis, asociación con VIH o tuberculosis, cáncer y retraso neurodegenerativo en niños)⁴⁵.

Otra de las vacunas desarrollada frente a HCMV fue la vacuna compuesta por la proteína gB recombinante en un adyuvante microfluidizado 59 (MF59; NCT00133497). A pesar de demostrar resultados prometedores, la respuesta de los anticuerpos no era duradera en el tiempo¹³. Actualmente la vacuna mRNA-167 desarrollada por la empresa biotecnológica ModernaTX (NCT05085366) se encuentra en ensayo clínico de fase III en el que participan 7300 mujeres en edad fértil entre 16 y 40 años, en el cual se está evaluando la seguridad y la eficacia de la vacuna, y los primeros resultados se esperan para abril de 2026⁴⁷.

Algunos de los obstáculos que han impedido el desarrollo de una vacuna eficaz frente a HCMV han sido la falta de establecimiento de inmunidad a largo plazo de células T de memoria, y la limitación de evitar la reactivación de cepas latentes o la reinfección de individuos seropositivos por nuevas cepas del virus. Es por esto que el objetivo de conseguir una vacuna frente este virus no es solamente evitar la infección primaria, sino también la reactivación y reinfección por HCMV¹³.

La alta variabilidad de este virus junto al desconocimiento que existe sobre la función de gran parte de su genoma han limitado el desarrollo de una vacuna exitosa frente a HCMV. Por tanto, sigue siendo necesario continuar investigando para comprender mejor el ciclo de infección de este virus y las proteínas que participan en él para así poder encontrar una o varias dianas adecuadas que permitan desarrollar una vacuna.

En el presente trabajo se ha evaluado la capacidad de inducir una respuesta inmune funcional de 9 de las proteínas de HCMV previamente identificadas en el grupo de investigación, utilizando para ello sueros de 12 pacientes TOS y que han adquirido una inmunidad específica frente a HCMV tras el trasplante. Las proteínas se han evaluado en dos condiciones diferentes; por un lado, en condiciones reductoras donde se presenta la proteína en conformación lineal y, por otro lado, en condiciones nativas donde la proteína mantiene su conformación estructural.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es la búsqueda de proteínas de HCMV capaces de inducir una respuesta inmune funcional, que pudiesen ser candidatas para el desarrollo de una nueva formulación vacunal. Los objetivos específicos del trabajo se resumen en:

1. Estudiar si las proteínas seleccionadas generan una respuesta inmune utilizando sueros de pacientes TOS que han adquirido inmunidad específica frente a HCMV.
2. Comparar el reconocimiento de los anticuerpos dependiendo de la conformación estructural en la que se encuentre el antígeno.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Células, medio y virus

Las líneas celulares utilizadas fueron la HEK 293-T (ATCC CRL-11268) que son células embrionarias de riñón humano, y las células ARPE-19 ATCC que son células de epitelio pigmentario de retina. Ambas fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC ; Manassas, VA). Para su cultivo se usó medio Dulbecco's modified Eagle medium-DMEM alto en glucosa (Gibco-BRL) complementado con 10% de suero bovino fetal (HyClone Laboratories), 10,000 IU/L de penicilina y 10 mg/L de estreptomina (Gibco-BRL).

Para la transformación de los plásmidos del estudio se utilizó la cepa bacteriana competente de *Escherichia coli* XL10 Gold, utilizada habitualmente para transformar con eficacia moléculas de ADN de gran tamaño. Se utilizó medio Luria Broth (Conda) con Ampicilina 100 µg/mL (Amp, A0166-5G, Sigma) para la selección antibiótica. El medio S.O.C (Invitrogen) se utilizó tras el choque térmico para la recuperación de las células bacterianas competentes.

Para la infección por HCMV se utilizó la cepa de HCMV BADrUL131-Y4 que proviene de la cepa AD169 modificada para expresar el completo pentamérico y un casete que codifica la proteína de fluorescencia verde (GFP) cedido por el Dr. Thomas Shenk (Universidad de Princeton).

3.2. Amplificación de los genes y clonación

Las secuencias codificantes de los genes que codifican las proteínas candidatas de HCMV fueron amplificadas PCR utilizando como molde el BAC de HCMV BADrUL131-Y4 y la ADN polimerasa Phusion (ThermoScientific). Para cada uno de los genes se utilizaron cebadores específicos (ThermoFisher Scientific). Los cebadores utilizados, el tamaño y la temperatura de fusión (T_m) se especifican en la Tabla 1 del Anexo. Los productos de PCR obtenidos y el plásmido pcDNATM3.1/Myc-His (-) (5,5 kb) (Invitrogen) fueron digeridos con las enzimas de restricción adecuadas (FastDigest enzymes, Thermo), ligados (Ligase, Thermo Scientific) y transformados en células *E.coli* XL10 Gold químicamente competentes. Las construcciones plasmídicas resultantes fueron verificadas mediante secuenciación utilizando cebadores específicos (Tabla 2 del anexo).

3.3. Sueros

Para este trabajo se utilizaron los sueros de 12 pacientes receptores de TOS, antes y después de adquirir inmunidad específica frente a HCMV. Estas muestras provienen del Hospital Universitario 12 de octubre (Madrid, España) y para lo cual se recogió el consentimiento informado de los pacientes y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica local.

3.4. Transfección de las células HEK 293T, expresión de las proteínas y cuantificación

Las construcciones de ADN fueron purificadas para la transfección utilizando el kit de extracción de plásmidos MIDI de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la transfección, se utilizaron células HEK 293T a una confluencia de aproximadamente 60-80% en placas de cultivo de 100mm. 4 horas antes de la transfección se cambió el medio de cada una de las placas añadiendo 12mL de medio fresco DMEM.

Para la transfección se preparó 40µg del ADN plasmídico, que contenían los genes de las proteínas de interés. A cada uno de los eppendorfs que contenían el ADN se le añadió H₂O hasta llegar a un volumen final de 675µl. Posteriormente se añadió 75µL de CaCl₂ 2,5M a cada tubo, seguido de 750µL de buffer salino HBS (140mM NaCl, 1.5mM Na₂HPO₄, 50mM HEPES). Esta mezcla se dejó incubar durante 15 minutos y luego fue añadida al cultivo gota a gota por toda la placa y se incubó durante 12 horas tras lo cual el medio fue sustituido por medio fresco y se dejó incubando durante 48 horas en la estufa a 37°C y 5% de CO₂.

3.5. Lisado de proteínas

Después de las 48 horas las células transfectadas fueron levantadas de la placa con un rascador y fueron centrifugadas en tubos Falcon de 50mL™ a 4000rpm durante 5 minutos para poder recolectar las células y eliminar el medio. Las células obtenidas fueron divididas en las alícuotas para proceder a la lisis de proteínas utilizando dos técnicas diferentes:

- Método nativo: se utilizó un buffer de lisis 10% (Cell Signaling), conteniendo inhibidores de proteasas (MERCK LIFE SCIENCE) disuelto en agua ultrapura.
- Método reductor: se utilizó el mismo buffer de lisis con inhibidores de proteasas, pero en este caso se le añadió también ditioneitol (DTT) 100 mM (BioRad) para una reducción efectiva de los enlaces de disulfuro de las proteínas.

El *pellet* celular fue resuspendido y se dejó incubar en hielo durante 30 minutos mezclado con el *vortex* cada 5 minutos. Una vez finalizado este tiempo, se centrifugó a 13000 rpm para eliminar los restos celulares, recurando el sobrenadante que fue cuantificado utilizando el método Bradford. Para los controles positivos y negativos de HEK-293T, ARPE-19 y ARPE-19 infectado con HCMV se empleó el mismo método.

3.6. Western Blot

Las células ARPE-19 con una confluencia entre el 80-90% fueron infectadas con la cepa de CMV BADrUL131-Y4 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 incubadas a 37 °C en un 5% de CO₂ durante 14 días. Como control negativo se utilizaron células no infectadas. Posteriormente, se levantaron las células y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos. Para saber si la transfección había funcionado y se habían expresado las proteínas, usamos como técnica de validación el Western Blot (WB).

Para ello las células sedimentadas fueron resuspendidas en 500 µl de tampón de lisis 1X (Cell Signaling Technology) y cuantificadas. Se cargaron 10 µg de lisados proteicos en un gel de agarosa con un gradiente de concentración del 4-20% (Mini-PROTEAN TGX Stain-free Gels of agarose BioRad) para su separación por electroforesis. Las muestras contenían el buffer de carga 4X Laemmli loading buffer (Bio-Rad). Como marcador de peso molecular se utilizó 5µL el Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad) y como control negativo un lisado de HEK-293T sin transfectar.

Tras la electroforesis se procedió a la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa de 0,45µm utilizando el método semiseco (Trans-Blot® SD Semi- Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (1X PBS + 0,1% Tween 20 + 5% de leche desnatada, PBSTM) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

A continuación, para la detección, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario monoclonal anti-Myc a una dilución de 1:1000 (MA1-21316, Invitrogen), ya que todas las proteínas presentan esta etiqueta en el extremo corboxi-terminal, disuelto en el tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C en agitación.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas 5 veces con 1X PBS + 0,1% Tween durante 5 minutos en agitación. Posteriormente, se añadió el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con peroxidasa de rábano picante (Cell Signalling Technology®) a una dilución 1/2000 en el tampón de bloqueo y se dejó incubar durante 1 hora

a temperatura ambiente en agitación. A continuación, la membrana fue lavada 5 veces con 1X PBS + 0,1% Tween durante 5 minutos en agitación.

Para el revelado se usó el kit de quimioluminiscencia Super Signal™ West Pico Chemiluminescent Substrate detection Kit (ThermoFisher Scientific) según las recomendaciones del fabricante. La máquina empleada para ello fue el ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad).

3.7. Western Blot nativo

Para la realización del WB nativo se siguieron los pasos explicados en el apartado anterior, sin embargo, no se añadió SDS en ninguno de los pasos. El buffer de electroforesis 10X para 500mL se añadió 15,15g de base Tris-HCl, 72,3g de glicina disuelto en agua destilada. Como buffer de carga se empleó el Native Sample Buffer de Bio-Rad.

3.8. ELISA

Para la detección por ELISA, se añadió 20µg de proteína disuelta en PBS por triplicado en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, tanto en condiciones reductoras como nativas. Como control negativo se utilizaron lisados de células 293T y ARPE-19 sin infectar y como control positivo lisados de ARPE-19 infectados con HCMV. Las placas se incubaron a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se retiró el medio y se lavaron las placas dos veces con PBS 0,1% Tween (PBST). A continuación, las placas se bloquearon con leche en polvo al 5% en PBST (PBSTM) a temperatura ambiente durante 40 minutos. Las placas se lavaron dos veces con PBST y se incubaron durante 2 horas con sueros de pacientes diluidos 1/200 en PBSTM. Tras lavar las placas 3 veces con PBST, se incubaron con IgG antihuman marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (diluida 1:2000; ab98624, Abcam) durante 1 hora. Tras lavar otras tres veces con PBST, se añadieron 50µl de sustrato de 3,3',5,5'tetrametilbencidina (Merck Life Science) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación y oscuridad. La reacción se detuvo con 50µl de ácido sulfúrico 1 N y se midió absorbancia a 450nm en el espectrofotómetro.

4. RESULTADOS

4.1. Cohorte y título de anticuerpos neutralizantes inducidos por infección natural

Se utilizó una cohorte de 12 pacientes receptores de trasplante renal que fueron seguidos tras el trasplante durante un año y monitorizados para detectar episodios de replicación del CMV junto con la respuesta inmune específica de CMV, incluyendo los anticuerpos neutralizantes. Los títulos de anticuerpos neutralizantes se determinaron mediante microneutralización como se describió previamente⁴⁸, estableciéndose como título de anticuerpos neutralizantes (NAbs) la dilución del suero en la que se detectaba una disminución del 50% la infección de HCMV en comparación con el control positivo de células infectadas sin suero (Tabla 1).

Para llevar a cabo los experimentos se emplearon sueros de estos pacientes tanto pre-inmunización (basal) y post-inmunización lo que nos permite observar la presencia o no de anticuerpos que reconozcan los epítomos lineales o estructurales de los diferentes antígenos testados en este estudio, así como su abundancia en el suero.

Tabla 1. Resumen de los resultados de la titulación de los sueros basal y post-inmunización de los 12 pacientes.

Paciente	Título suero basal	Título suero post-inmunización
1	0	2560
2	80	2560
3	0	640
4	20	2560
5	0	2560
6	0	5120
7	5120	5120
8	5120	5120
9	0	2560
10	0	2560
11	0	2560
12	80	2560

Los pacientes presentaban títulos altos de NAbs en el suero tras la adquisición de la inmunidad específica frente a HCMV (post-inmunización), excepto el paciente 3 con un título algo inferior de 640. En cuanto a los sueros basales, la mayoría de los pacientes no presentaban título o un

título \leq a 80. Por último, los pacientes 7 y 8 presentan título de NAb muy elevados tanto en lo sueros basal como post-inmunización, lo que puede ser debido a que el paciente hubiera pasado por una infección muy reciente de HCMV antes de recolectar la muestra basa

4.2. Clonación de las proteínas de HCMV

Los genes clonados y utilizados en este estudio se encuentran detallados en la Tabla 2.

Tabla 2. Lista de genes de HCMV empleados en este trabajo.

Lista de genes trasfectados , clonados y expresados	
UL44	UL132
UL57	US12
UL75	US30
UL83	RL11
UL100	

4.3. Detección de la expresión de proteínas

En la Figura 5 se muestran varios ejemplos de la expresión de las proteínas evaluadas en este trabajo mediante la técnica del WB usando como anticuerpo primario el anti-Myc. Aunque las proteínas bandean en el tamaño esperado, se puede observar como en todos los casos aparece más de una única banda. La mayoría de las proteínas estudiadas son proteínas de membrana por lo que el bandeo múltiple puede deberse a que estas proteínas podrían estar glicosiladas, por la proteólisis que dan lugar a fragmentos más pequeños, o la dimerización y formación de complejos con otras proteínas. Así por ejemplo mientras que UL57 siempre aparece con una banda en torno a los 134KDa, otras como RL11 o UL100 aparecen con bandeados a diferentes tamaños.

Los pesos moleculares de las proteínas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Información de los pesos moleculares de las proteínas detectadas por Western Blot.

Peso molecular de las proteínas transfectadas (KDa)			
UL44	46,233	UL132	29,782
UL57	133,925	US12	32,471
UL75	84,321	US30	39,156
UL83	62,898	RL11	26,690
UL100	42,861		

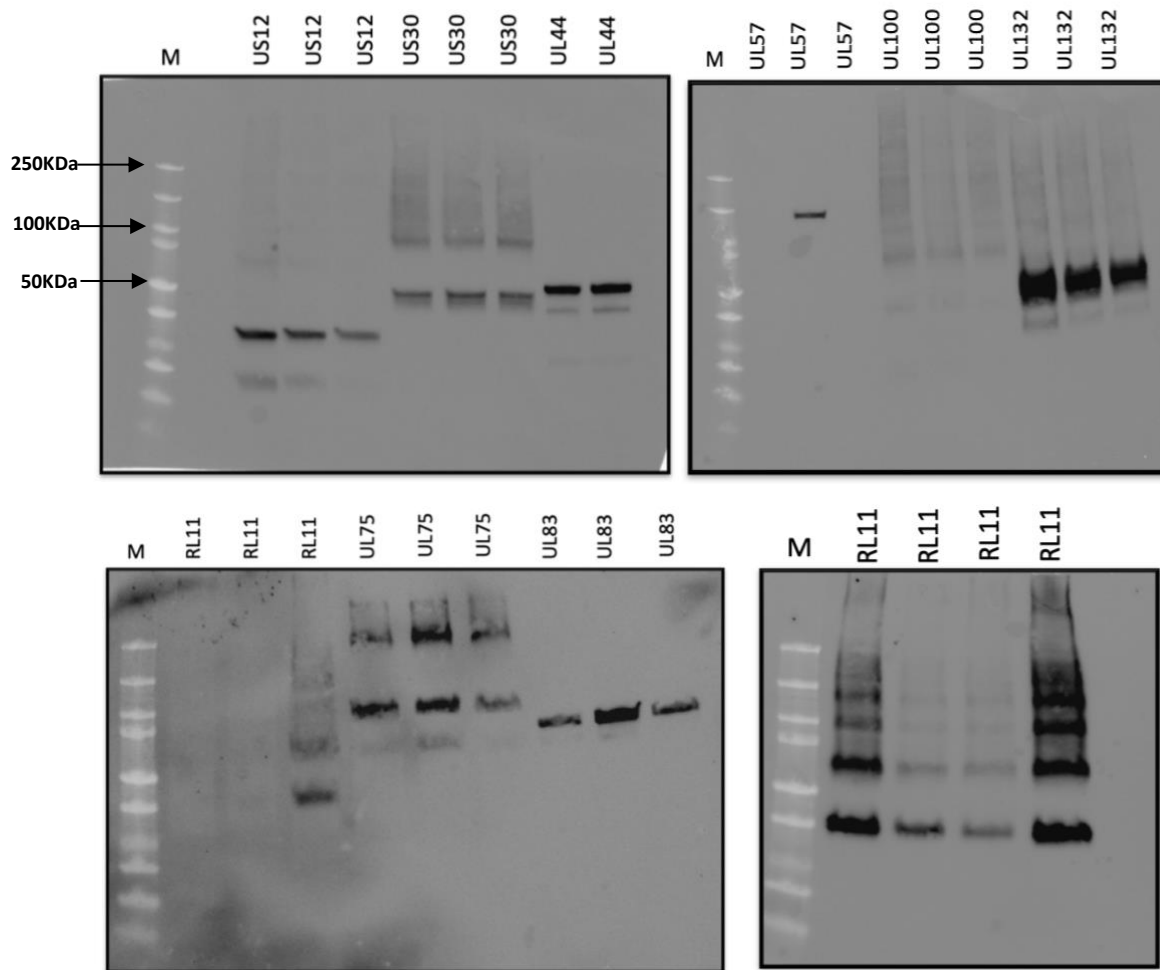


Figura 5. Reconocimiento con anti-Myc de la expresión de las proteínas evaluadas en este trabajo.

4.4. Resultados de Western Blot Nativo.

Para comprobar la expresión de las proteínas se utilizó como anticuerpo primario anti-Myc y como anticuerpo secundario se utilizó un anti-mouse. Como se observa en la Figura 6, las proteínas reconocidas fueron UL100, US12 y UL83. A pesar de tener pesos moleculares muy diferentes, las proteínas no migraban a través del gel a su tamaño esperado, quedándose agrupadas en el inicio del pocillo, probablemente debido a su naturaleza hidrofóbica. Para comprobar si el reconocimiento era específico, se realizó una prueba de Western Blot Nativo, empleando como anticuerpo primario anticuerpos monoclonales que disponíamos en el laboratorio frente a las proteínas UL44 y UL55 (Figura 7).

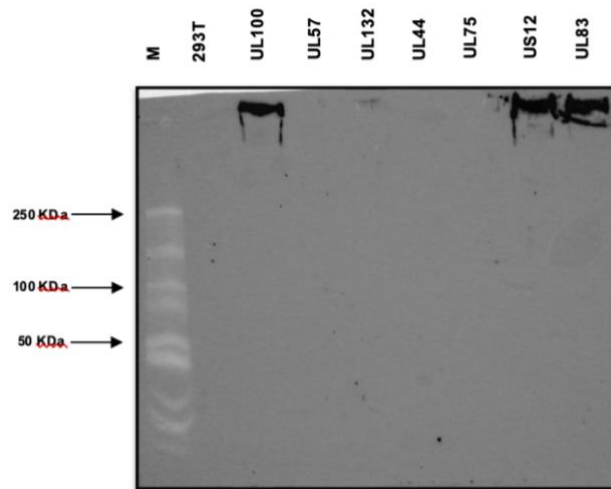


Figura 6. Reconocimiento de la expresión de proteínas usando el anticuerpo anti-Myc en Western Blot Nativo. Como control negativo se utilizó el lisado de células HEK 293T sin transfectar.

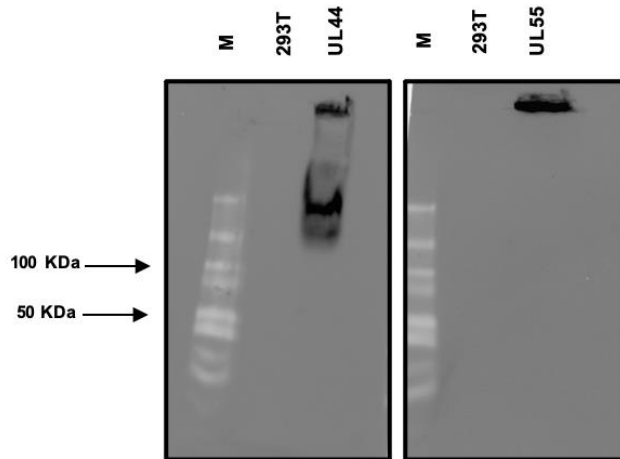


Figura 7. Reconocimiento de la expresión de proteínas usando el anticuerpo monoclonal en Western Blot Nativo. Como control negativo se utilizó el lisado de células HEK 293T sin transfectar.

Como se puede observar los anticuerpos monoclonales reconocieron la expresión de estas dos proteínas. Sin embargo, como en el caso anterior las proteínas no migraban a su tamaño esperado, UL44 (46KDa) y UL55 (102KDa). UL44 una proteína citoplasmática migraba mejor que UL55, que es una proteína de membrana. Debido a que en nuestro estudio la mayoría de las proteínas empleadas son de membrana lo que limita su migración en el gel y que usamos como anticuerpo primario el suero de pacientes que incluye otros anticuerpos dando en algunos casos un marcaje inespecífico (Figura 8) probamos distintas condiciones utilizando pH diferentes de buffer de electroforesis dependiendo del punto isoeléctrico de cada proteína, realizando Blue Native Western Blot, pero no conseguimos mejorar los resultados. Mientras que en la Figura 8A parece que UL100 es reconocido de manera específica por el suero post-inmunización, en la Figura 8B, US12 no puede determinarse de manera clara el reconocimiento por parte del suero post-inmunización del paciente 1. En ambos casos se usó como control el anticuerpo anti-Myc.

Por todo ello, decidimos utilizar la técnica de ELISA como método de identificación para el reconocimiento específico de las proteínas.

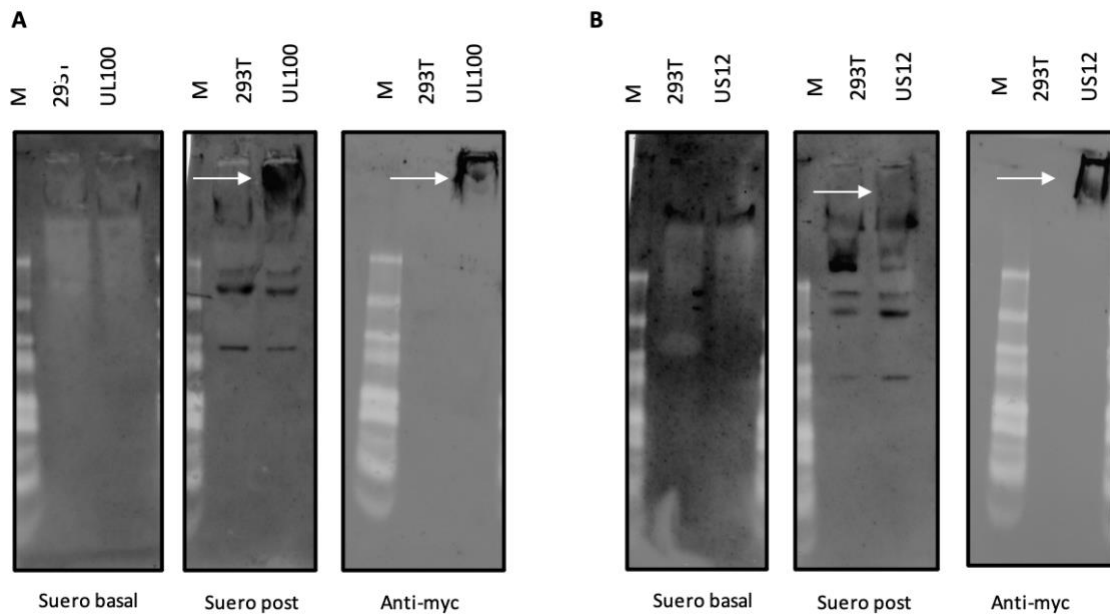


Figura 8. Ejemplo de Western Blot nativo con sueros de pacientes. En la **Figura 8A** se puede ver el resultado del Western Blot Nativo del paciente 4. En el suero basal no aparece ninguna banda. En el suero post-inmunización se puede ver como parece reconocerse de manera específica (marcado con una flecha), con respecto a el control 293T. En la **Figura 8B** podemos ver el Western Blot Nativo de la proteína US12 con los sueros del paciente 1. Además de las diferentes bandas inespecíficas, podemos ver que la banda que correspondería a US12 en el suero post, es más leve que en el caso anterior (flechas) por lo que a pesar de que en los ELISAS este paciente presenta anticuerpos frente a US12 como fue confirmado, en Western Blot Nativo no podríamos asegurar que el reconocimiento fuera específico.

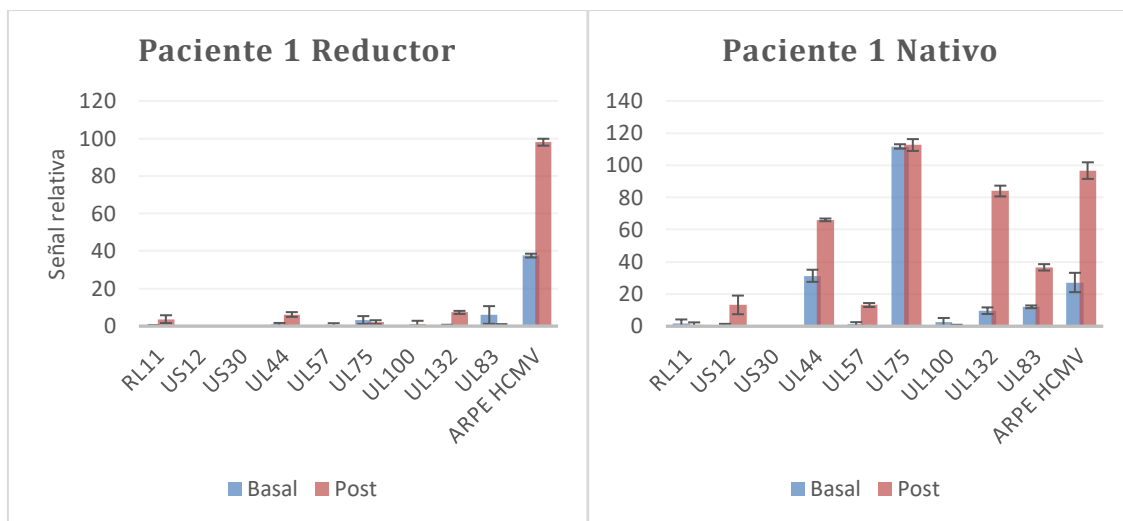
4.5. Resultados ELISA

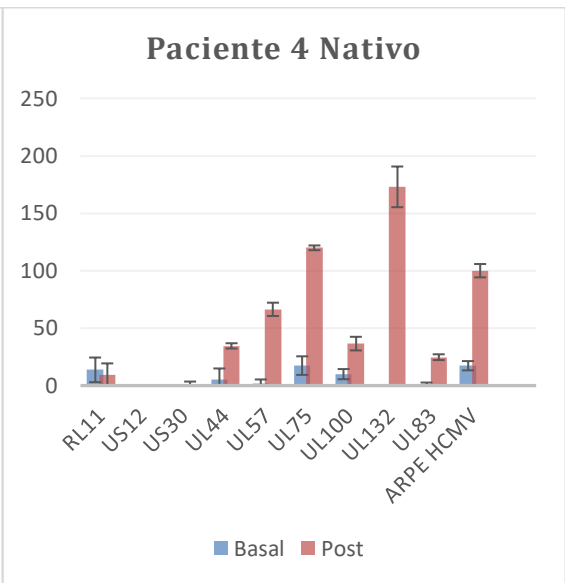
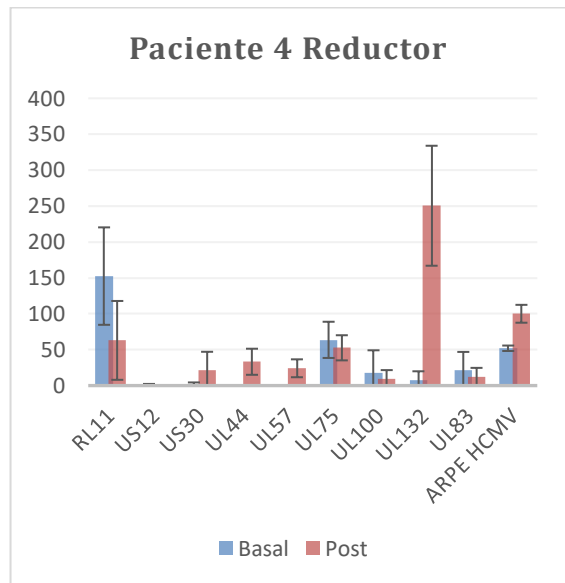
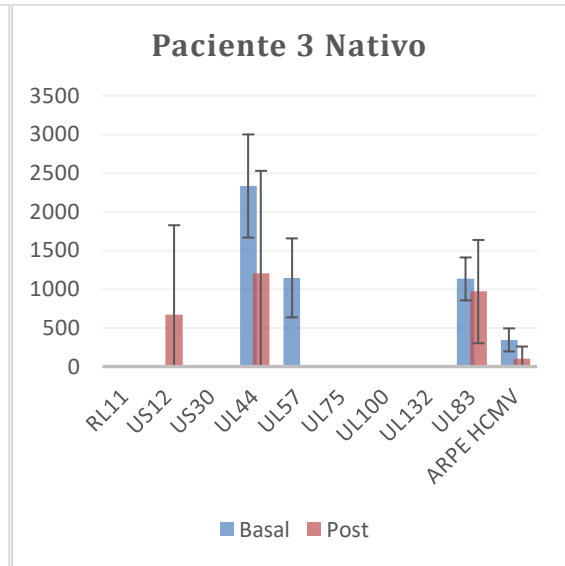
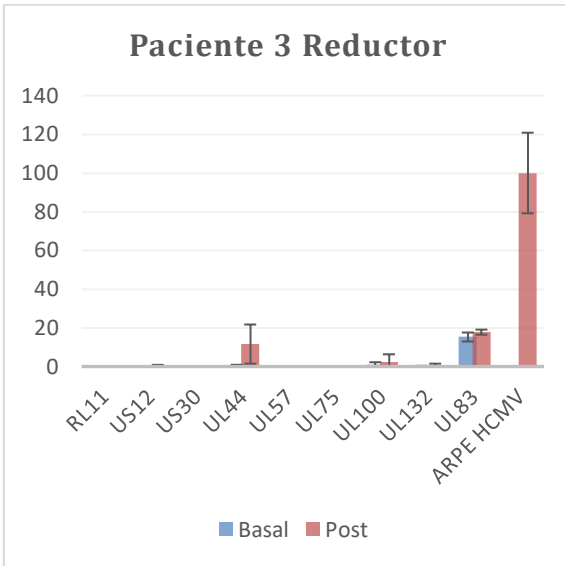
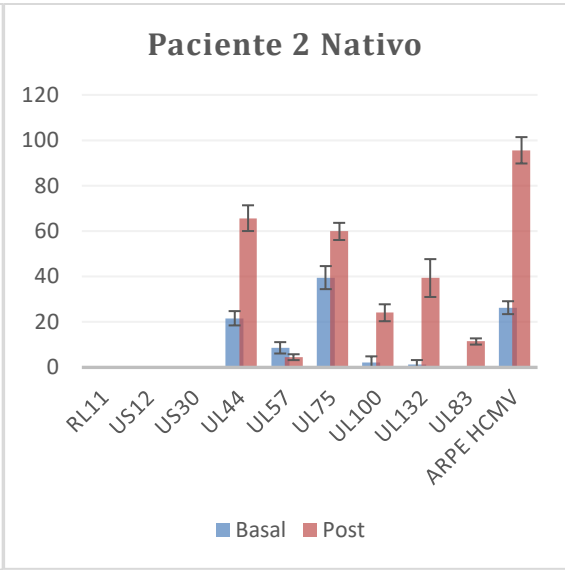
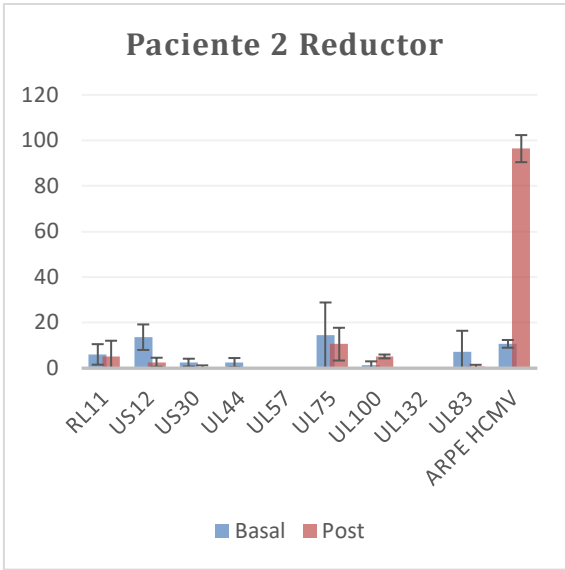
Los resultados obtenidos por cada uno de los pacientes se muestran en la Figura 9. Cada una de las condiciones fueron realizadas en experimentos por triplicado. Como control positivo utilizamos lisados de ARPE-19 infectados con HCMV. Como podemos observar en la Figura 9, los pacientes 7 y 8 presentaron una señal muy elevada tanto en su suero basal como en el suero post-inmunización. Estos datos concuerdan con el elevado título que presentan estos pacientes en ambas condiciones. Estos dos pacientes podrían haber pasado una infección reciente de HCMV antes de la recogida de la muestra basal. El único paciente que no generó ninguna señal significativa entre el suero basal y post, fue el número 3, siendo este el que menor título de anticuerpos neutralizantes presenta en la muestra post-inmunización con un título NAb < 640.

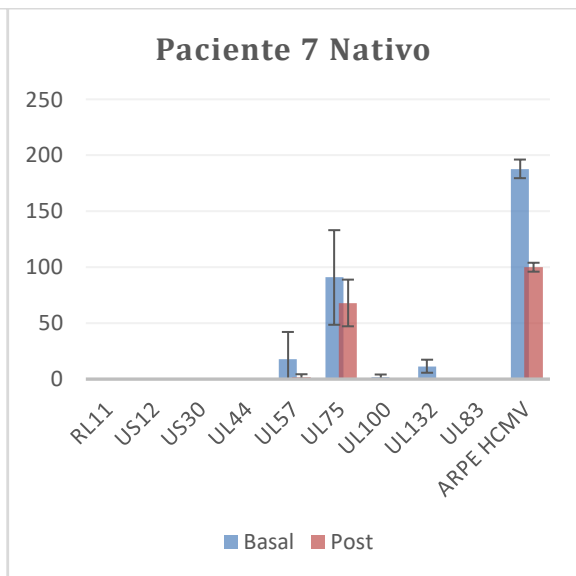
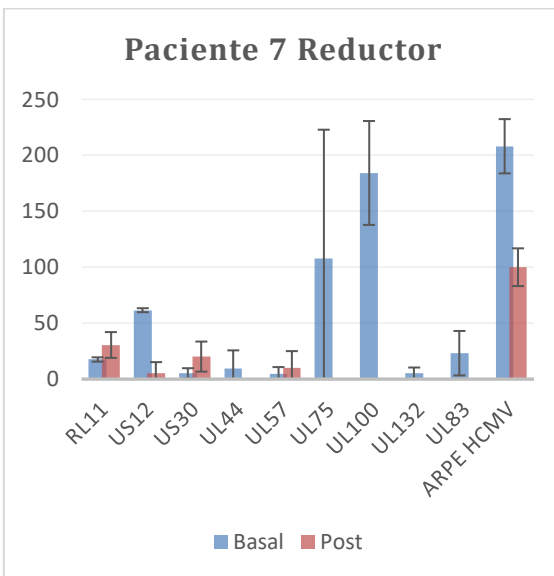
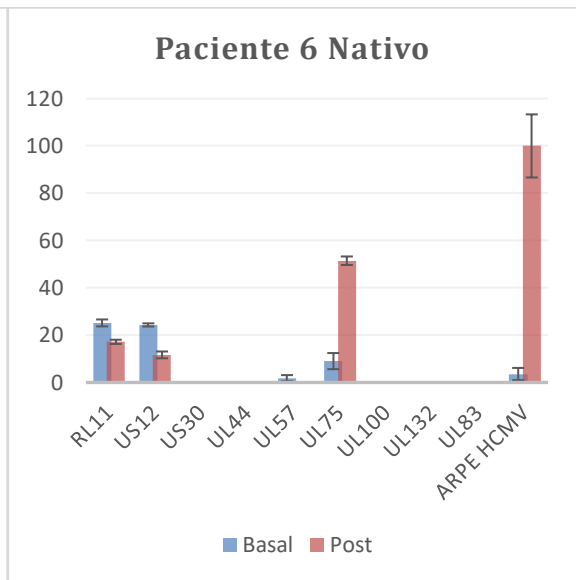
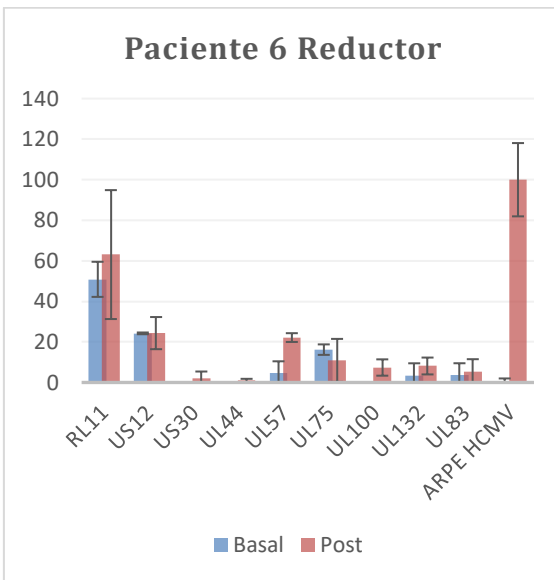
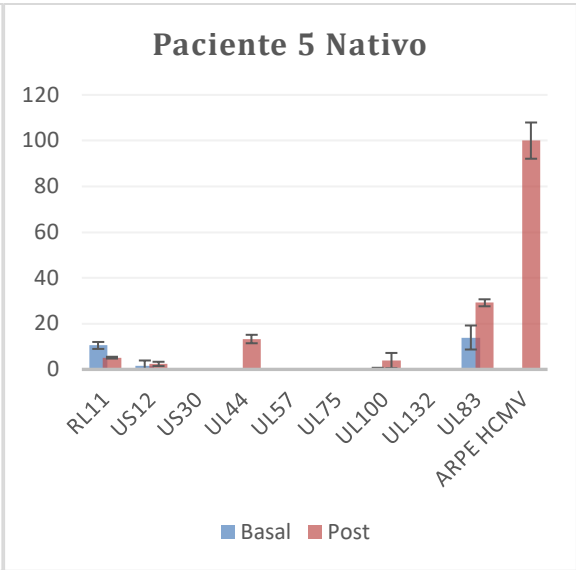
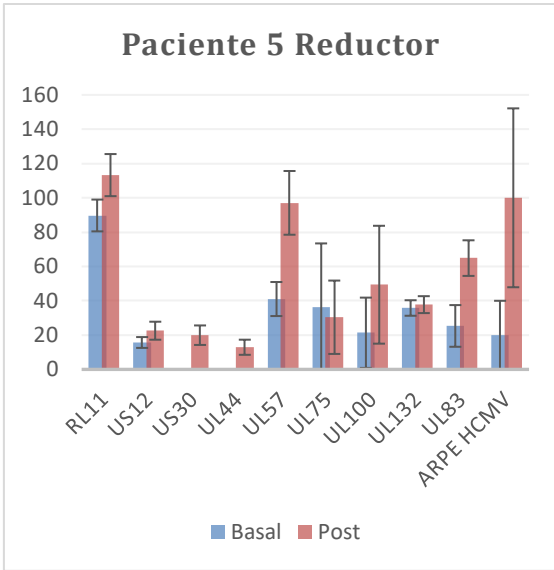
Los pacientes 2, 4, 11 y 12 dan una señal mayor principalmente cuando las proteínas se encuentran en su conformación nativa mientras que el suero del paciente 5 reconoce en mayor medida proteínas reductoras, se muestra el porcentaje de proteínas que fueron reconocidas por los sueros de los pacientes utilizados. Como podemos observar en la Figura 10, mayoritariamente los pacientes presentan anticuerpos que reconocen epítomos conformacionales de los antígenos de HCMV UL44, UL75, UL83, UL132 y US12. Sin embargo, en las proteínas UL57, US30 y RL11 su reconocimiento fue mayor en las proteínas desnaturalizadas indicando un reconocimiento mayor de epítomos lineales.

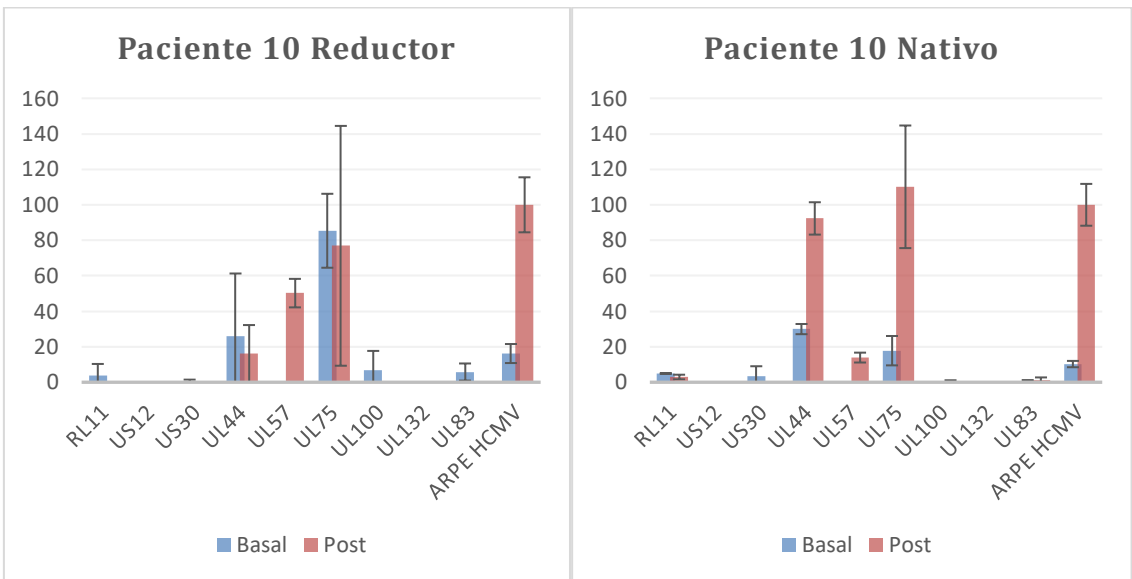
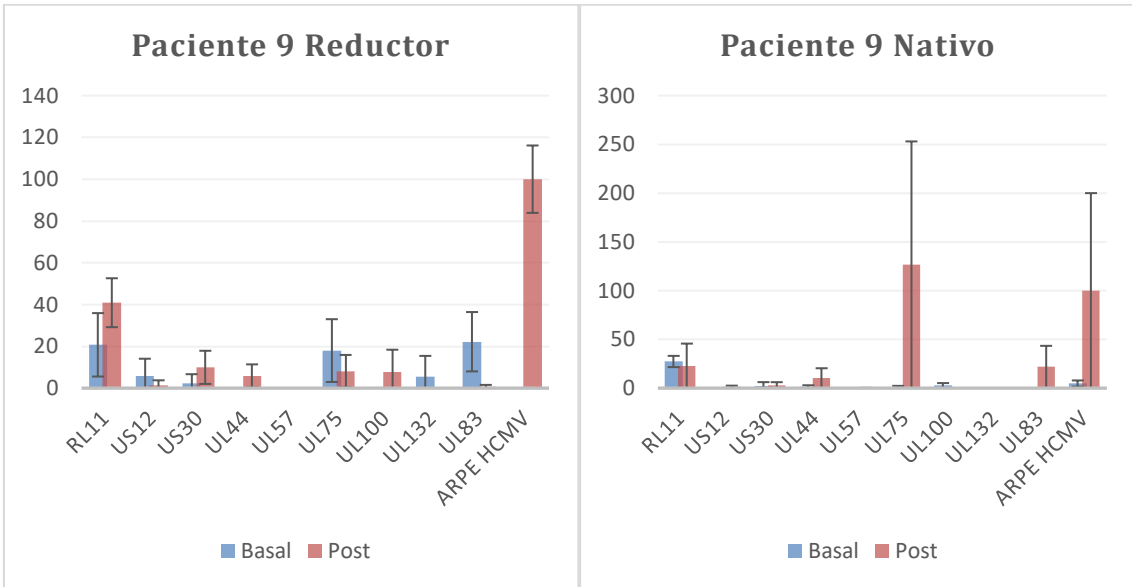
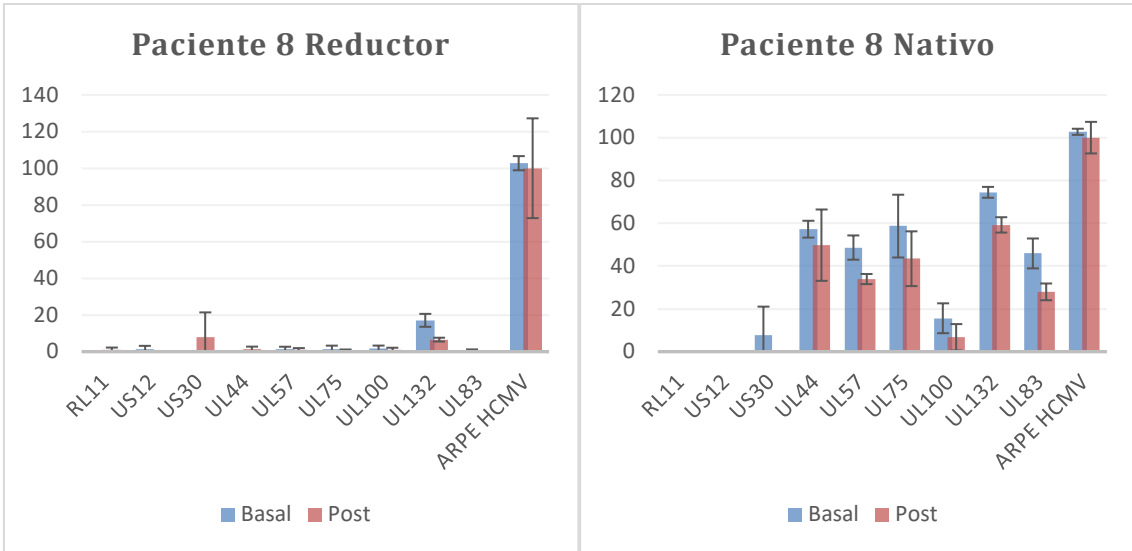
En cuanto a las proteínas reconocidas por un número mayor de sueros de pacientes se encuentran UL44, UL57, UL75, UL83 y UL100. Esto concuerda con datos obtenidos previamente en el laboratorio, en el que hemos comprobado por métodos de Western Blot que estas proteínas son muy inmunogénicas, lo que podría deberse a las importantes funciones que estas presentan, tanto en replicación del genoma viral, como en los mecanismos de entrada a la célula y la modulación de la respuesta inmune del hospedador.

En la Figura 1 del ANEXO se muestra un esquema, en el que se puede ver con más detalle las proteínas reconocidas por cada uno de los pacientes.









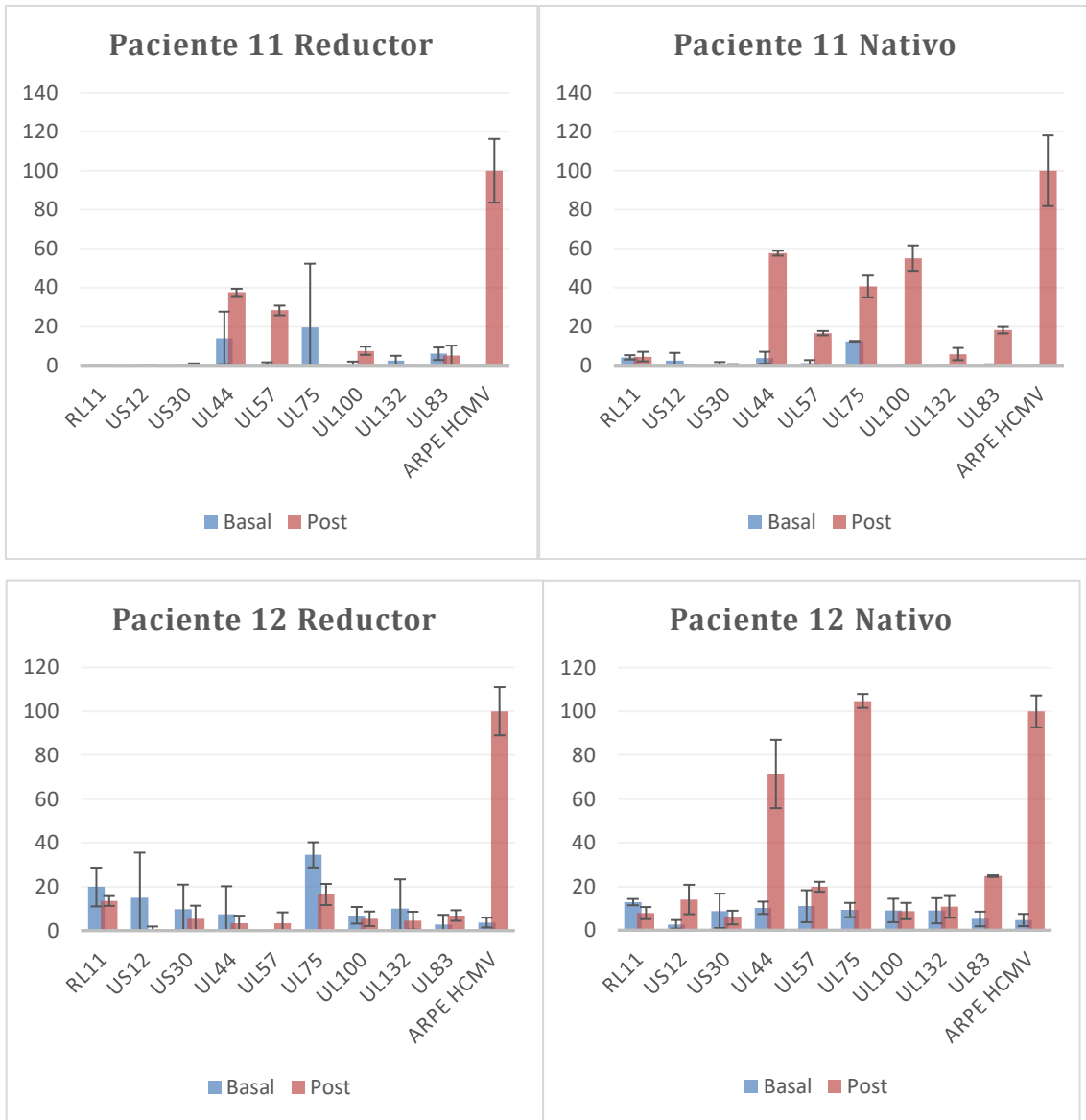


Figura 9. ELISAS de cada paciente en condiciones reductoras y nativas. En azul se muestran los resultados de la señal relativa obtenida con los sueros basales. En rojo la obtenida por los sueros post-inmunización. Como control se le restó la señal producida por los sueros de lisados HEK 293T. Como control positivo se utilizaron lisados de ARPE-19 infectadas con HCMV. La señal de ARPE-19 sin infectar fue utilizada como control negativo.

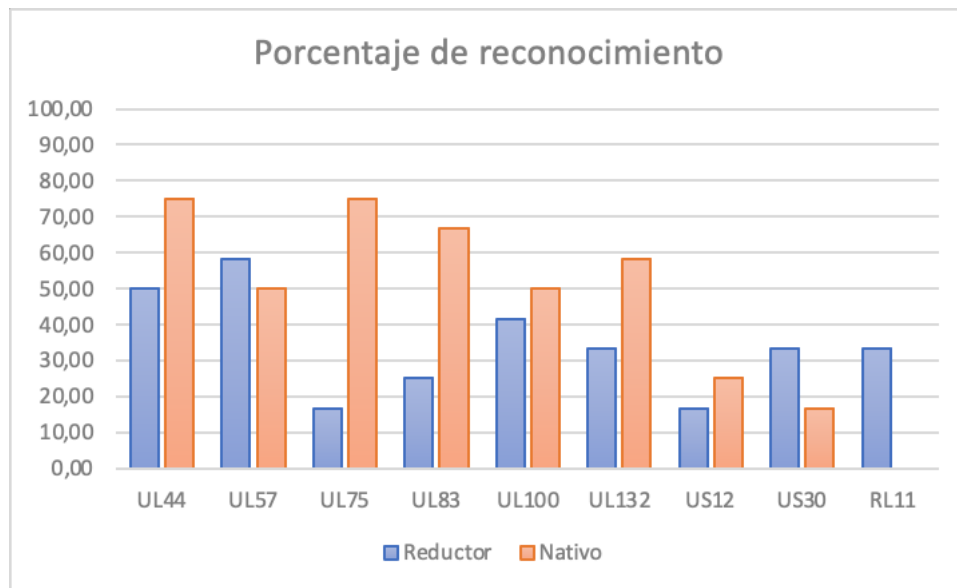


Figura 10. Porcentaje de reconocimiento de las proteínas por los pacientes.

5. DISCUSIÓN

Para este trabajo se han caracterizado 9 proteínas del HCMV utilizando el suero de 12 pacientes de los que se tenía disponibilidad de muestra basal y post infección para determinar si son capaces de inducir una respuesta inmune funcional.

De las 9 proteínas estudiadas tres son proteínas citosólicas (UL83, UL44 y UL57) y las otras 6 son proteínas con dominio transmembrana (RL11, US12, US30, UL75, UL100 Y UL132). Una de las proteínas estudiadas UL83, también conocida como pp65, ha sido ampliamente estudiada forma parte del tegumento participando en la evasión de la respuesta inmune innata¹⁰. Esta proteína ha sido empleada ampliamente para el diagnóstico y el estudio de antigenemia de HCMV en pacientes TOS⁴⁹ y es utilizada como control en nuestro trabajo. Otra de las proteínas citosólicas muy inmunogénica es UL44. Esta proteína es imprescindible para HCMV ya que participa en la replicación viral, participando como una subunidad accesoria de la ADN polimerasa del virus⁵⁰. En nuestro laboratorio hemos determinado previamente que esta proteína es importante en la activación de la respuesta celular frente a HCMV, además, nuestros análisis bioinformáticos muestran que esta proteína presenta epítomos estructurales de respuesta citotóxica, este artículo se encuentra actualmente en revisión. En los datos de este trabajo podemos observar que UL44 es reconocida principalmente por anticuerpos que reconocen regiones conformacionales de la proteína, por lo que podría ser una buena estrategia terapéutica, la búsqueda y aislamiento de anticuerpos específicos frente a UL44, para combatir la infección temprana de HCMV.

La última proteína citosólica empleada en este estudio es UL57. Es una proteína de unión al ADN monocatenario que se localiza en el núcleo de la célula infectada. Previamente ha sido descrita como una proteína que no está presente en los viriones, pero que se expresa en etapas tempranas de la infección debido a su papel en la replicación⁵¹ También se ha sido descrito una respuesta específica de anticuerpos contra UL57 asociada a pacientes con enfermedades autoinmunes como la esclerosis sistémica o el síndrome de fatiga crónica^{52, 53}. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para determinar el papel de los anticuerpos frente a UL57. Nuestros resultados indican que es reconocida en una proporción similar por su conformación lineal y conformacional.

Las proteínas RL11, US12, US30, UL75, UL100 Y UL132 son proteínas con dominios transmembrana¹⁷. UL75 y UL100 son proteínas bien estudiadas que participan en la entrada viral- UL75 conocida como glicoproteína gH que junto a gL forma parte del complejo trimérico y pentamérico requerido para la fusión viral con la membrana²³. Esta proteína ha sido empleada en distintos estudios describiendo su papel en la neutralización del virus así como la combinación de anticuerpos frente a gH junto con el tratamiento con ganciclovir en pacientes TOS renal, poniendo de manifiesto la importancia de la combinación de nuevas terapias que incluyan anticuerpos dirigidos frente a estos antígenos junto a los tratamientos ya existentes^{54, 55}. La proteína UL100 o gM que junto con la glicoproteína N (UL73) forman el complejo proteico gM/gN (gCII) está implicado en la entrada viral y es esencial para la producción del virus infeccioso⁵⁶. En este trabajo ha sido reconocida por la mitad de los sueros de los pacientes tanto en condiciones reductoras como en nativas. En un estudio del año 2006 se desarrollaron y probaron la eficacia de anticuerpos dirigidos hacia estos complejos en la neutralización de la entrada del virus, obteniendo que los anticuerpos dirigidos al complejo gM/gN eran más efectivos en la neutralización del virus, que los dirigidos solamente a la proteína gM⁵⁷.

US12, US30 y RL11 son las proteínas que menos han sido reconocidas por los sueros de los pacientes. US12 pertenece a un grupo de diez proteínas que presentan siete dominios transmembrana similares al receptor acoplado a proteína G ^{58, 59}. Aunque su función no está definida se creó que podría tener un papel en la inmunomodulación de HCMV, afectando a la activación de las células NK. De hecho, este mismo año se ha descrito que US12 está principalmente localizado en los lisosomas alrededor del aparato de Golgi e interactúa con reguladores esenciales de autofagia, potenciando la formación de autofagosomas que puede contribuir al ensamblaje del virión y a la maduración de HCMV a través de la aportación de fuentes de membrana al compartimento de ensamblaje del virus. Además, por homología por otras funciones descritas para genes de esta familia, podría degradar inmunológicas necesarias

para el reconocimiento adecuado de la activación de la inmunidad innata y adaptativa^{60, 61}. La presencia principalmente de esta proteína en membranas internas de la célula infectada podría explicar el hecho de la presencia de pocos anticuerpos frente a US12.

US30 es una proteína que se desconoce actualmente su función¹⁷. RL11 por su parte participa en procesos de inmunomodulación. RL11 es una glicoproteína transmembrana de tipo I que se une a la inmunoglobulina IgG Fcγ⁶². Se ha descrito que se encuentra en la membrana plasmática y que se une e internaliza IgG humanas en la superficie de las células infectadas^{63, 64}.

La proteína UL132 glicoproteína de membrana de tipo I que participa en el ensamblaje y la eficiente producción de las nuevas partículas virales⁶⁵. Es una proteína que forma parte de la envuelta del virión por lo que cabría esperar encontrar un mayor número de pacientes que presentasen anticuerpos frente este antígeno. UL132 ha sido utilizado en un estudio para evaluar la infección por HCMV en el sedimento urinario en pacientes con trasplante renal mediante RT-qPCR como posible método de diagnóstico⁶⁶.

Se ha demostrado que la expresión de las proteínas en su conformación nativa y, por tanto, de los epítomos virales estructurales pueden ofrecer respuestas inmunitarias más fuertes. Esto se propone como alternativa para la creación de nuevas vacunas, como la desarrollada por Chiron Corporatives que usa gB y el complejo pentamérico en su estructura conformacional parece dar resultados prometedores⁶⁷. Además, se han descrito epítomos conformacionales que podrían ser clave en el desarrollo de vacunas, como el epítomo 2B10 de gB que es reconocido por anticuerpos neutralizantes y que podría ser usado como herramienta diagnóstica⁶⁸. En otros estudios, se ha visto que dependiendo de a qué epítomos se unan diferentes anticuerpos monoclonales de diferentes proteínas (gB, complejo pentamérico, gH, gL, etc.) son capaces de neutralizar la entrada del virus y la propagación entre las células epiteliales o los fibroblastos, pero no en todas las cepas del HCMV debido a una variación en estos epítomos que impide el reconocimiento por parte de estos anticuerpos⁶⁹.

La técnica del ELISA ha sido empleada por otros grupos para detectar la respuesta inmune contra el HCMV y su diagnóstico. Por ejemplo, gracias a esta técnica se pudo la respuesta específica de IgM e IgG contra gB y p52 (UL44) y su avidéz en infecciones primarias en mujeres embarazadas⁷⁰. La técnica del ELISPOT se usó en pacientes con un trasplante renal y lisado de HCMV para estudiar los niveles de células T específicas para ver cuáles de ellos eran capaces de resolver la infección por sí mismo y cuales necesitaban el tratamiento con antirretrovirales para aclarar la infección, determinando que esta técnica es sensible y específica para el diagnóstico y personalización del tratamiento⁷¹. Se han desarrollado ELISAS comerciales, como el de Genzyme

Virotech, que son altamente sensibles y específicos y que usa combinaciones de antígenos nativos y recombinantes que permiten una estandarización de las pruebas serológicas del HCMV⁷². Se están desarrollando ELISAS que permiten diferenciar cepas específicas, usando por ejemplo el antígeno UL44 que diferencia entre los 3 genotipos principales (A, B, C) basados en la detección de IgG anti-HCMV con una técnica sencilla y reproducible⁷³. Además, esta técnica permite diferenciar las personas inmunizadas con vacunas gB de individuos que están cursando la infección, usando otros antígenos como UL132, UL83, UL44 o UL57⁷⁴ que han sido usados en este trabajo. No solamente es usada para el diagnóstico de HCMV, sino que se usa para diagnosticar otras enfermedades como la toxoplasmosis⁷⁵, Chagas⁷⁶, VIH, VHB, VHC o HTLV⁷⁷.

En base a los resultados obtenidos pensamos que la técnica de ELISA empleada puede ser una buena aproximación a la hora de detectar que proteínas virales pueden ser más inmunogénicas. Algunos de los sueros testados en este trabajo fueron empleados en trabajos anteriores para determinar por WB el reconocimiento de UL83 y UL44. Ambas técnicas reconocieron o no estas proteínas dependiendo del suero empleado lo que le da más fiabilidad a nuestros resultados.

La detección de proteínas muy antigénicas nos permite poner el foco en estos antígenos con el fin de poder aislar y generar anticuerpos dirigidos a estas proteínas virales como futura terapia.

En la actualidad se están llevando a cabo los estudios de neutralización de algunas de estas proteínas utilizando para ello modelos animales. Sin embargo, en la presente fecha no se disponen de datos que puedan ser añadidos en este trabajo.

6. CONCLUSIONES

1. Los resultados de este trabajo demuestran que la aproximación utilizada es válida para la búsqueda de proteínas que puedan generar una respuesta inmune. Como resultado de esta aproximación hemos determinado que las proteínas UL75, UL83 y UL44 son buenas inductoras de anticuerpos.
2. Sin embargo, no en todos los casos la presencia de anticuerpos y reconocimiento de esa proteína está ligada a protección, ya que pueden ser anticuerpos no funcionales.
3. Hemos encontrado diferencias en el reconocimiento de los anticuerpos dependiendo de la conformación estructural (lineal o nativa) de las proteínas que podrían sugerir una mejor respuesta inmunitaria.
4. Es necesario continuar con los estudios funcionales para determinar su actividad neutralizante o implicación en ADCC de estas proteínas utilizando para ello modelos animales.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Sezgin E, An P, Winkler CA. Host Genetics of Cytomegalovirus Pathogenesis. *Front Genet.* 2019 Jul 23;10:616.
2. Fowler K, Mucha J, Neumann M, Lewandowski W, Kaczanowska M, Grys M, et al. A systematic literature review of the global seroprevalence of cytomegalovirus: possible implications for treatment, screening, and vaccine development. *BMC Public Health.* 2022 Sep 1;22(1):1659.
3. Sandonís V, García-Ríos E, McConnell MJ, Pérez-Romero P. Role of Neutralizing Antibodies in CMV Infection: Implications for New Therapeutic Approaches. *Trends Microbiol.* 2020 Nov;28(11):900-912.
4. Griffiths P, Reeves M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. *Nat Rev Microbiol.* 2021 Dec;19(12):759-773.
5. Cope AV, Sweny P, Sabin C, Rees L, Griffiths PD, Emery VC. Quantity of cytomegalovirus viraemia is a major risk factor for cytomegalovirus disease after renal transplantation. *J Med Virol.* 1997 Jun;52(2):200-5.
6. Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, et al. Disease Definitions Working Group of the Cytomegalovirus Drug Development Forum. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials. *Clin Infect Dis.* 2017 Jan 1;64(1):87-91.
7. Natori Y, Alghamdi A, Tazari M, Miller V, Husain S, Komatsu T, et al. CMV Consensus Forum. Use of Viral Load as a Surrogate Marker in Clinical Studies of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2018 Feb 1;66(4):617-631.
8. Nuévalos M, García-Ríos E, Mancebo FJ, Martín-Martín C, Pérez-Romero P. Novel monoclonal antibody-based therapies: implications for the treatment and prevention of HCMV disease. *Trends Microbiol.* 2023 May;31(5):480-497.
9. Kalejta RF. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008 Jun;72(2):249-65.
10. Biolatti M, Dell'Oste V, De Andrea M, Landolfo S. The human cytomegalovirus tegument protein pp65 (pUL83): a key player in innate immune evasion. *New Microbiol.* 2018

Apr;41(2):87-94.

11. Mitra D, Hasan MH, Bates JT, Bidwell GL 3rd, Tandon R. Tegument Protein pp150 Sequence-Specific Peptide Blocks Cytomegalovirus Infection. *Viruses*. 2021 Nov 15;13(11):2277.
12. Martí-Carreras J, Maes P. Human cytomegalovirus genomics and transcriptomics through the lens of next-generation sequencing: revision and future challenges. *Virus Genes*. 2019 Apr;55(2):138-164.
13. Gerna G, Lilleri D. Human cytomegalovirus (HCMV) infection/re-infection: development of a protective HCMV vaccine. *New Microbiol*. 2019 Jan;42(1):1-20.
14. Gerna G, Percivalle E, Lilleri D, Lozza L, Fornara C, Hahn G, et al. Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8+ T cells. *J Gen Virol*. 2005 Feb;86(Pt 2):275-284.
15. Macagno A, Bernasconi NL, Vanzetta F, Dander E, Sarasini A, Revello MG, et al. Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. *J Virol*. 2010 Jan;84(2):1005-13.
16. Sijmons S, Van Ranst M, Maes P. Genomic and functional characteristics of human cytomegalovirus revealed by next-generation sequencing. *Viruses*. 2014 Mar 5;6(3):1049-72.
17. Mancebo FJ, Parras-Moltó M, García-Ríos E, Pérez-Romero P. Deciphering the Potential Coding of Human Cytomegalovirus: New Predicted Transmembrane Proteome. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 2;23(5):2768.
18. Patro ARK. Subversion of Immune Response by Human Cytomegalovirus. *Front Immunol*. 2019 Jun 10;10:1155.
19. Zhang L, Yu J, Liu Z. MicroRNAs expressed by human cytomegalovirus. *Virol J*. 2020 Mar 12;17(1):34.
20. Abdalla AE, Mahjoob MO, Abosalif KOA, Ejaz H, Alameen AAM, Elsaman T. Human cytomegalovirus-encoded MicroRNAs: A master regulator of latent infection. *Infect Genet Evol*. 2020 Mar;78:104119.
21. Bernier A, Sagan SM. The Diverse Roles of microRNAs at the Host-Virus Interface. *Viruses*. 2018 Aug 19;10(8):440.

22. S Stegmann C, Hochdorfer D, Lieber D, Subramanian N, Stöhr D, Laib Sampaio K, et al. A derivative of platelet-derived growth factor receptor alpha binds to the trimer of human cytomegalovirus and inhibits entry into fibroblasts and endothelial cells. *PLoS Pathog.* 2017 Apr 12;13(4):e1006273.
23. Wu Y, Prager A, Boos S, Resch M, Brizic I, Mach M, et al. Human cytomegalovirus glycoprotein complex gH/gL/gO uses PDGFR- α as a key for entry. *PLoS Pathog.* 2017 Apr 12;13(4):e1006281.
24. Soroceanu L, Akhavan A, Cobbs CS. Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature.* 2008 Sep 18;455(7211):391-5.
25. Kabanova A, Marcandalli J, Zhou T, Bianchi S, Baxa U, Tsybovsky Y, et al. Platelet-derived growth factor- α receptor is the cellular receptor for human cytomegalovirus gHgLgO trimer. *Nat Microbiol.* 2016 Jun 6;1(8):16082.
26. Feire AL, Koss H, Compton T. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Oct 26;101(43):15470-5.
27. Zhou M, Lanchy JM, Ryckman BJ. Human Cytomegalovirus gH/gL/gO Promotes the Fusion Step of Entry into All Cell Types, whereas gH/gL/UL128-131 Broadens Virus Tropism through a Distinct Mechanism. *J Virol.* 2015 Sep;89(17):8999-9009.
28. Martinez-Martin N, Marcandalli J, Huang CS, Arthur CP, Perotti M, Foglierini M, et al. An Unbiased Screen for Human Cytomegalovirus Identifies Neuropilin-2 as a Central Viral Receptor. *Cell.* 2018 Aug 23;174(5):1158-1171.e19.
29. E X, Meraner P, Lu P, Perreira JM, Aker AM, McDougall WM, et al. OR14I1 is a receptor for the human cytomegalovirus pentameric complex and defines viral epithelial cell tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Apr 2;116(14):7043-7052.
30. Ryckman BJ, Jarvis MA, Drummond DD, Nelson JA, Johnson DC. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol.* 2006 Jan;80(2):710-22.
31. Gerna G, Kabanova A, Lilleri D. Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Host Cell Receptors. *Vaccines (Basel).* 2019 Jul 22;7(3):70.

32. Malito E, Chandramouli S, Carfi A. From recognition to execution-the HCMV Pentamer from receptor binding to fusion triggering. *Curr Opin Virol.* 2018 Aug;31:43-51.
33. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol.* 2006 Jul;87(Pt 7):1763-1779.
34. Lilleri D, Gerna G. Maternal immune correlates of protection from human cytomegalovirus transmission to the fetus after primary infection in pregnancy. *Rev Med Virol.* 2017 Mar;27(2).
35. Hammer Q, Rückert T, Borst EM, Dunst J, Haubner A, Durek P, et al. Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells. *Nat Immunol.* 2018 May;19(5):453-463.
36. Chung AW, Kumar MP, Arnold KB, Yu WH, Schoen MK, Dunphy LJ, et al. Dissecting Polyclonal Vaccine-Induced Humoral Immunity against HIV Using Systems Serology. *Cell.* 2015 Nov 5;163(4):988-98.
37. Chung AW, Ghebremichael M, Robinson H, Brown E, Choi I, Lane S, et al. Polyfunctional Fc-effector profiles mediated by IgG subclass selection distinguish RV144 and VAX003 vaccines. *Sci Transl Med.* 2014 Mar 19;6(228):228ra38.
38. Costa-Garcia M, Vera A, Moraru M, Vilches C, López-Botet M, Muntasell A. Antibody-mediated response of NKG2Cbright NK cells against human cytomegalovirus. *J Immunol.* 2015 Mar 15;194(6):2715-24.
39. Chinta P, Garcia EC, Tajuddin KH, Akhidenor N, Davis A, Faure L, et al. Control of Cytokines in Latent Cytomegalovirus Infection. *Pathogens.* 2020 Oct 21;9(10):858.
40. Maidji E, Nigro G, Tabata T, McDonagh S, Nozawa N, Shiboski S, et al. Antibody treatment promotes compensation for human cytomegalovirus-induced pathogenesis and a hypoxia-like condition in placentas with congenital infection. *Am J Pathol.* 2010 Sep;177(3):1298-310.
41. Gabanti E, Bruno F, Lilleri D, Fornara C, Zelini P, Cane I, et al. Human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD4+ and CD8+ T cells are both required for prevention of HCMV disease in seropositive solid-organ transplant recipients. *PLoS One.* 2014 Aug 28;9(8):e106044.
42. Derhovanessian E, Maier AB, Hähnel K, Beck R, de Craen AJM, Slagboom EP, et al. Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of late-differentiated CD4+ and CD8+ T-cells in humans. *J Gen Virol.* 2011 Dec;92(Pt 12):2746-2756.

43. Kabanova A, Perez L, Lilleri D, Marcandalli J, Agatic G, Becattini S, et al. Antibody-driven design of a human cytomegalovirus gHgLpUL128L subunit vaccine that selectively elicits potent neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Dec 16;111(50):17965-70.
44. Novak Z, Ross SA, Patro RK, Pati SK, Reddy MK, Purser M, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay method for detection of cytomegalovirus strain-specific antibody responses. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Feb;16(2):288-90.
45. Moseley P, Klenerman P, Kadambari S. Indirect effects of cytomegalovirus infection: Implications for vaccine development. *Rev Med Virol*. 2023 Jan;33(1):e2405.
46. Ljungman P, Bermudez A, Logan AC, Kharfan-Dabaja MA, Chevallier P, Martino R, et al. A randomised, placebo-controlled phase 3 study to evaluate the efficacy and safety of ASP0113, a DNA-based CMV vaccine, in seropositive allogeneic haematopoietic cell transplant recipients. *EClinicalMedicine*. 2021 Mar 19;33:100787.
47. Kadambari S, Evans C, Lyall H. Congenital Infections: Priorities and Possibilities for Resource-limited Settings. *Pediatr Infect Dis J*. 2023 Feb 1;42(2):e45-e47.
48. Cui X, Meza BP, Adler SP, McVoy MA. Cytomegalovirus vaccines fail to induce epithelial entry neutralizing antibodies comparable to natural infection. *Vaccine*. 2008 Oct 23;26(45):5760-6.
49. Moses S, Malathi J, Singha NR, Bagyalakshmi R, Madhavan HN. Determination of human cytomegalovirus pp65 antigenemia among renal transplant patients. *Indian J Nephrol*. 2012 Sep;22(5):347-52.
50. Strang BL, Sinigalia E, Silva LA, Coen DM, Loregian A. Analysis of the association of the human cytomegalovirus DNA polymerase subunit UL44 with the viral DNA replication factor UL84. *J Virol*. 2009 Aug;83(15):7581-9.
51. Kiehl A, Huang L, Franchi D, Anders DG. Multiple 5' ends of human cytomegalovirus UL57 transcripts identify a complex, cycloheximide-resistant promoter region that activates oriLyt. *Virology*. 2003 Sep 15;314(1):410-22.
52. Marou E, Liaskos C, Simopoulou T, Efthymiou G, Dardiotis E, Katsiari C, et al. Human cytomegalovirus (HCMV) UL44 and UL57 specific antibody responses in anti-HCMV-positive patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2017 Apr;36(4):863-869.
53. Lerner AM, Beqaj SH, Deeter RG, Fitzgerald JT. IgM serum antibodies to human

cytomegalovirus nonstructural gene products p52 and CM2(UL44 and UL57) are uniquely present in a subset of patients with chronic fatigue syndrome. *In Vivo*. 2002 May-Jun;16(3):153-9.

54. Shibamura M, Yoshikawa T, Yamada S, Inagaki T, Nguyen PHA, Fujii H, et al. Association of human cytomegalovirus (HCMV) neutralizing antibodies with antibodies to the HCMV glycoprotein complexes. *Virol J*. 2020 Aug 3;17(1):120.

55. Parsons AJ, Ophir SI, Duty JA, Kraus TA, Stein KR, Moran TM, et al. Development of broadly neutralizing antibodies targeting the cytomegalovirus subdominant antigen gH. *Commun Biol*. 2022 Apr 25;5(1):387.

56. Krzyzaniak MA, Mach M, Britt WJ. HCMV-encoded glycoprotein M (UL100) interacts with Rab11 effector protein FIP4. *Traffic*. 2009 Oct;10(10):1439-57.

57. Shen S, Wang S, Britt WJ, Lu S. DNA vaccines expressing glycoprotein complex II antigens gM and gN elicited neutralizing antibodies against multiple human cytomegalovirus (HCMV) isolates. *Vaccine*. 2007 Apr 30;25(17):3319-27.

58. Lesniewski M, Das S, Skomorowska-Prokvolit Y, Wang FZ, Pellett PE. Primate cytomegalovirus US12 gene family: a distinct and diverse clade of seven-transmembrane proteins. *Virology*. 2006 Oct 25;354(2):286-98.

59. Lu Y, Ma Y, Liu Z, Han L, Gao S, Zheng B, et al. A cluster of 3' coterminal transcripts from US12-US17 locus of human cytomegalovirus. *Virus Genes*. 2016 Jun;52(3):334-45.

60. Kim HJ, Lee Y, Lee S, Park B. HCMV-encoded viral protein US12 promotes autophagy by inducing autophagy flux. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023 Apr 30;654:94-101.

61. Fielding CA, Weekes MP, Nobre LV, Ruckova E, Wilkie GS, Paulo JA, et al. Control of immune ligands by members of a cytomegalovirus gene expansion suppresses natural killer cell activation. *Elife*. 2017 Feb 10;6:e22206.

62. Lilley BN, Ploegh HL, Tirabassi RS. Human cytomegalovirus open reading frame TRL11/IRL11 encodes an immunoglobulin G Fc-binding protein. *J Virol*. 2001 Nov;75(22):11218-21.

63. Atalay R, Zimmermann A, Wagner M, Borst E, Benz C, Messerle M, et al. Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcγ receptor homologs. *J Virol*. 2002 Sep;76(17):8596-608.

64. Vezzani G, Pimazzoni S, Ferranti R, Calò S, Monda G, Amendola D, et al. Human immunoglobulins are transported to HCMV viral envelope by viral Fc gamma receptors-dependent and independent mechanisms. *Front Microbiol.* 2023 Jan 16;13:1106401.
65. Wu H, Kropff B, Mach M, Britt WJ. Human Cytomegalovirus Envelope Protein gpUL132 Regulates Infectious Virus Production through Formation of the Viral Assembly Compartment. *mBio.* 2020 Sep 29;11(5):e02044-20.
66. Pajenda S, Kapps S, Gerges D, Hoermann G, Wagner L, Buchtele N, et al. Cytomegalovirus in urinary sediment in patients with acute kidney injury. *BMC Nephrol.* 2021 May 8;22(1):169.
67. Cui X, Snapper CM. Development of novel vaccines against human cytomegalovirus. *Hum Vaccin Immunother.* 2019;15(11):2673-2683.
68. Thomas M, Kropff B, Schneider A, Winkler TH, Görzer I, Sticht H, et al. A Novel Strain-Specific Neutralizing Epitope on Glycoprotein H of Human Cytomegalovirus. *J Virol.* 2021 Aug 25;95(18):e0065721.
69. Cui X, Freed DC, Wang D, Qiu P, Li F, Fu TM, et al. Impact of Antibodies and Strain Polymorphisms on Cytomegalovirus Entry and Spread in Fibroblasts and Epithelial Cells. *J Virol.* 2017 Jun 9;91(13):e01650-16.
70. Zelini P, Fornara C, Furione M, Sarasini A, Klemens J, Arossa A, et al. Determination of anti-p52 IgM and anti-gB IgG by ELISA as a novel diagnostic tool for detection of early and late phase of primary human cytomegalovirus infections during pregnancy. *J Clin Virol.* 2019 Nov;120:38-43.
71. Zavaglio F, Rivela F, Cassaniti I, Arena F, Gabanti E, Asti AL, et al. ELISPOT assays with pp65 peptides or whole HCMV antigen are reliable predictors of immune control of HCMV infection in seropositive kidney transplant recipients. *J Med Virol.* 2023 Feb;95(2):e28507.
72. Busse C, Strubel A, Schnitzler P. Combination of native and recombinant cytomegalovirus antigens in a new ELISA for detection of CMV-specific antibodies. *J Clin Virol.* 2008 Oct;43(2):137-41.
73. Miller H, Simpson P, Forman M, Prigan A, Kehl S, Mesich B, et al. A Novel Multiplexed Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of IgG Seroreactivity to Cytomegalovirus (CMV) UL144. *J Clin Microbiol.* 2021 Jul 19;59(8):e0096421.

74. Pagnon A, Piras F, Gimenez-Fourage S, Dubayle J, Arnaud-Barbe N, Hessler C, et al. Optimized enzyme-linked immunosorbent assay for detecting cytomegalovirus infections during clinical trials of recombinant vaccines. *J Clin Virol*. 2017 Nov;96:99-104.
75. Lévêque MF, Albaba S, Arrada N, Avignon M, Sasso M, Fillaux J, et al. Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: No Benefit of IgA Antibody Detection by Platelia ELISA in a Tricentric Evaluation. *J Clin Microbiol*. 2022 May 18;60(5):e0011622.
76. Brasil PEAA, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LHC, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2010 Nov;10:337.
77. Yoshihara N. [ELISA for diagnosis of infections by viruses]. *Nihon Rinsho*. 1995 Sep;53(9):2277-82. Japanese.

8. ANEXO

Tabla 1. Secuencia, tamaño, temperatura de fusión y tiempo de extensión (T_m) de los *primers* utilizados para la amplificación y clonación de los ORFs que codifican las proteínas utilizadas en este estudio.

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Size (pb)	T _m	Extension time
UL44	CCGCTCGAGCGGCCACCATGGATCGC AAGACGCGCCT (XhoI)	CGGGGTACCCGAGCCGCACTTT TGCTTCTTGG (KpnI)	1302	65°	2'
UL57	AAATATGCGGCCGCTATAAACCACCAT GAGCCACGAGGAACTAAC (NotI)	CGCGGATCCGCGTCAACCGGCTG CGTTTGCCG (BamHI)	3708	62°	4'
UL75	CCGCTCGAGCGGCCACCATGCGGCC GGCCTCCCCC (XhoI)	CGGGGTACCCGGCATGTCTTGA GCATGCGGT (KpnI)	2232	66°	3'
UL83	CCGCTCGAGCGGCCACCATGGAGTCGC GCGGTCGCCG (XhoI)	CGGGGTACCCGATCAACCTCGG TGCTTTTTGG (KpnI)	1686	67°	2'
UL100	CCGCTCGAGCGGCCACCATGGCCCCCTC GCACGTGGA (XhoI)	CGGGGTACCCGAAGCGTCCTCG AAGTCTTCAT (KpnI)	1119	64°	2'
UL132	CGCGGATCCACGCCACCATGCCGGCCC CGCGGGGTCT (BamHI)	CGGGGTACCCGAGTCGTACTCG GGATCTCTGA (KpnI)	813	63°	1'
US12	CCGCTCGAGCGGCCACCATGGTACAGA TCCAGTTTCA (XhoI)	CGGGGTACCCGATTTATGAAAA AGCCAGTGTG (KpnI)	846	57°	1'
US30	CCGCTCGAGCGGCCACCATGGGGAACC CCCGGAGCCC (XhoI)	CGGGGTACCCGATACAGGCGG AAACACAGACG (KpnI)	1050	65°	1'
RL11	CCGCTCGAGCGGCCACCATGCAGACCT ACAGCACCCC (XhoI)	CGGGGTACCCGACTGTAAATCC CCGTCCACCG (KpnI)	705	65°	1°

Tabla 2. *Primers* utilizados para la comprobación por secuenciación de los genes clonados

Primer	Secuencia
pcDNA_seq_F	GTAGGCGTGACGGTGGGAG
pcDNA_seq_R	CAGTCGAGGCTGATCAGCGG
UL57_seq_IntA	TTTGTGGAGGCGCGAGGGCT
UL57_seq_IntB	TGAATCGTGTCTCGGTGTAC
UL57_seq_IntC	GGCCTCCAGCCGCTGCTAG
UL57_seq_IntD	TTCCTCACGTGTTAGGTGCT
UL75_seq_IntA	GAAAGATACCAACAGAGACT
UL75_seq_IntB	CCTGGTACTAGTTAAGAAAG
UL75_seq_IntC	ATCACCAGCCTCGTACGCCT
UL75_seq_IntD	ATCTACCATGCAACCAAGCA
UL83_seq_IntA	GTTTCCCACCAAGGACGTGG

UL44			UL57			UL75		
Paciente	Reductor	Nativo	Paciente	Reductor	Nativo	Paciente	Reductor	Nativo
1			1			1		
2			2			2		
3			3			3		
4			4			4		
5			5			5		
6			6			6		
7			7			7		
8			8			8		
9			9			9		
10			10			10		
11			11			11		
12			12			12		
Total	6	9		7	6		2	9

US12			US30			RL11		
Paciente	Reductor	Nativo	Paciente	Reductor	Nativo	Paciente	Reductor	Nativo
1			1			1		
2			2			2		
3			3			3		
4			4			4		
5			5			5		
6			6			6		
7			7			7		
8			8			8		
9			9			9		
10			10			10		
11			11			11		
12			12			12		
	2	3		4	2		4	0

Paciente	UL83		Paciente	UL100		Paciente	UL132	
	Reductor	Nativo		Reductor	Nativo		Reductor	Nativo
1			1			1		
2			2			2		
3			3			3		
4			4			4		
5			5			5		
6			6			6		
7			7			7		
8			8			8		
9			9			9		
10			10			10		
11			11			11		
12			12			12		
	3	8		5	6		4	7

Figura 1. Resumen de las proteínas reconocidas por cada paciente. En verde se muestran aquellas proteínas que son reconocidas por los sueros post-inmunización y que son significativas con respecto a la señal obtenida con el suero basal. En rojo se muestran aquellas que no son significativas. En azul más claro aparecen las proteínas reconocidas por alguno de los 2 sueros, basal o post-inmunización. En azul oscuro aparecen aquellas que fueron reconocidos por ambos sueros. Se empleó el test de T-de Student y se dio como significativo cuando el p valor era menos a 0,05.