

2



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
REGISTRE GENERAL
ENTRADA
21 SET. 2000
N.º 134600
HORA 12.45
OFICINA AUXILIAR NÚM. 14

Anticuerpos funcionales contra el Citomegalovirus humano (CMVH) en el paciente infectado por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1) en presencia y en ausencia de enfermedad orgánica causada por el CMVH.



TD-B
00718



50001408071
Biblioteca de Ciències

R. 22141

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES
Nº Registre22141.....
DATA19-I-01.....
SIGNATURA
TD-B 00718
Nº LIBIS: 1408071

31 cm.

Memoria presentada por Juan Alberola Enguïdanos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Valencia, Septiembre de 2000

UMI Number: U603064

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603064

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

D. David Navarro Ortega, Profesor Titular de Microbiología de la Universitat de València, certifica que: la Tesis Doctoral titulada *"Anticuerpos funcionales contra el Citomegalovirus humano (CMVH) en el paciente infectado por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1) en presencia y en ausencia de enfermedad orgánica causada por el CMVH"*, presentada por D. Juan Alberola Enguídanos, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido llevada a cabo bajo mi dirección.

Y para que así conste, firmo el presente en Valencia a 4 de Septiembre de 2000

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'D' followed by a smaller 'N' and a horizontal line.

Fdo. David Navarro Ortega

A Amparo
A mi familia

Agradecimientos:

Al personal de los Servicios de Microbiología del Hospital Clínico y del Hospital Dr. Peset de Valencia.

Al personal del Servicio de Medicina Interna del Hospital La Fe de Valencia.

Al personal del Servicio de Laboratorio y Medicina Preventiva del Hospital Militar de Valencia.

A aquellos que en mayor o menor medida han contribuido al final de un viaje.

1 Introducción	1
1.1 Taxonomía	3
1.2 Morfología y organización estructural del virión del CMVH	5
1.3 El genoma del CMV	7
1.4 Las proteínas del CMVH	11
1.5 Ciclo replicativo del CMVH	17
1.5.1 Adsorción y penetración	17
1.5.2 Expresión y regulación de los genes virales	19
1.5.3 Ensamblaje y liberación de nuevas partículas víricas	22
1.6 Patogenia de la infección por el CMVH y respuesta inmunitaria contra el virus	23
1.7 Manifestaciones clínicas de la infección por el CMVH	32
1.7.1 En el paciente inmunocompetente	32
1.7.2 Infección congénita y perinatal	32
1.7.3 Infección en el paciente inmunocomprometido	33
1.7.3.1 Síndrome febril y leucotrombopenia	34
1.7.3.2 Neumonitis	34
1.7.3.3 Enfermedad gastrointestinal	36
1.7.3.4 Enfermedad hepatobiliar	37
1.7.3.5 Retinitis	38
1.7.3.6 Enfermedad del Sistema Nervioso central y Periférico	39
1.7.3.7 Enfermedad Glandular	39
1.8 El CMVH en el marco de la infección por el VIH-1	39
1.9 Diagnóstico de la infección por el CMVH	42
1.9.1 Diagnóstico de la infección por el CMVH	43
1.9.2 Diagnóstico de la enfermedad orgánica por el CMVH	47
1.10 Tratamiento de la infección por el CMVH	50
1.11 Prevención de la infección y de la enfermedad orgánica producida por el CMVH	52
2 Material y Métodos	53
2.1 Grupos de estudio y muestras analizadas	55

2.1.1 Estudio transversal _____	55
2.1.2 Estudio longitudinal _____	62
2.2 Células utilizadas en el estudio y su manejo _____	66
2.2.1 Fibroblastos humanos _____	66
2.2.2 Células de glioblastoma _____	69
2.2.3 Subcultivo de células _____	70
2.2.4 Preparación de placas para los ensayos biológicos _____	71
2.2.5 Conservación de las células _____	72
2.2.6 Descongelación de las células _____	73
2.3 Virus _____	74
2.3.1 Cepa utilizada _____	74
2.3.2 Propagación del virus _____	74
2.3.3 Recogida y conservación del virus _____	75
2.3.4 Titulación de las preparaciones de virus _____	75
2.4 Procedimientos virológicos _____	76
2.4.1 Técnica rápida para la detección del CMVH en los leucocitos de sangre periférica (Viremia) _____	76
2.4.2 Detección de la proteína pp65 en los leucocitos polimorfonucleares de la sangre periférica (prueba de la Antigenemia pp65) _____	79
2.4.3 Carga viral del VIH-1 _____	82
2.5 Procedimientos inmunológicos _____	84
2.5.1 Recuento de células T CD4+ _____	84
2.5.2 Cuantificación de inmunoglobulinas totales en el suero _____	84
2.5.3 Cuantificación de los anticuerpos IgG anti-CMVH (completo) _____	85
2.5.4 Cuantificación de los anticuerpos IgG (totales) frente a la glucoproteína B (gB) del CMVH _____	85
2.5.5 Cuantificación de las subclases de anticuerpos IgG frente a la glucoproteína B (gB) del CMVH _____	87
2.5.6 Cuantificación de los anticuerpos que neutralizan al CMVH libre _____	87
2.5.7 Cuantificación de los anticuerpos que neutralizan virus adsorbido a las células _____	89
2.5.8 Cuantificación de los anticuerpos que inhiben el desarrollo de sincitios inducidos por el CMVH en células de glioblastoma _____	90

2.5.9 Cuantificación de los anticuerpos que bloquean la transmisión intercelular del CMVH (inhibición de la formación de placas)	91
2.6 Métodos Estadísticos	92
3 Objetivos	95
4 Resultados	101
4.1 Caracterización de la respuesta de anticuerpos funcionales frente al CMVH en pacientes infectados por el VIH-1	103
4.1.1 Anticuerpos IgG frente al CMVH (virus completo)	103
4.1.2 Anticuerpos IgG anti-gB	108
4.1.3 Anticuerpos que neutralizan al CMVH	120
4.1.3.1 Caracterización del modo de acción de los anticuerpos séricos anti-CMVH neutralizantes	126
4.1.3.1.1 Anticuerpos que neutralizan el CMVH adsorbido a las células (ANPA-Anticuerpos neutralizantes postadsorción)	127
4.1.3.1.2 Anticuerpos que impiden la fusión de células de glioblastoma mediada por el CMVH	135
4.1.4 Anticuerpos que inhiben la expansión intercelular del CMVH	144
4.2 Análisis comparativo de la respuesta de anticuerpos funcionales frente al CMVH en pacientes infectados por el VIH-1 en el estadio del SIDA con o sin una enfermedad orgánica por el CMVH	152
4.2.1 Anticuerpos IgG contra el CMVH (virus completo)	155
4.2.2 Anticuerpos anti-gB	156
4.2.3 Anticuerpos neutralizantes	165
4.2.4 Anticuerpos que inhiben la expansión intercelular del virus (AIP)	171
4.3 Análisis longitudinal de la respuesta de anticuerpos frente a la gB y neutralizantes en pacientes con SIDA con y sin enfermedad orgánica por el CMVH y en pacientes VIH-1 asintomáticos	179
4.3.1 Pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH en comparación con pacientes con SIDA sin enfermedad invasiva por el CMVH	179
4.3.2 Efecto del tratamiento antirretroviral de gran eficacia (TAGE) en los niveles séricos de anticuerpos anti-gB y neutralizantes en pacientes con SIDA y VIH-1 asintomáticos	184
5 Discusión	199

5.1 Caracterización de la respuesta de anticuerpos funcionales contra el CMVH en el paciente infectado por el VIH-1 _____	206
5.2 Respuesta de anticuerpos funcionales contra el CMVH en pacientes que desarrollan una enfermedad orgánica por el CMVH _____	217
5.3 Efecto de las terapias antirretrovirales de gran eficacia sobre la inmunidad humoral frente al CMVH _____	222
6 Conclusiones _____	225
7 Bibliografía _____	231

1. INTRODUCCIÓN

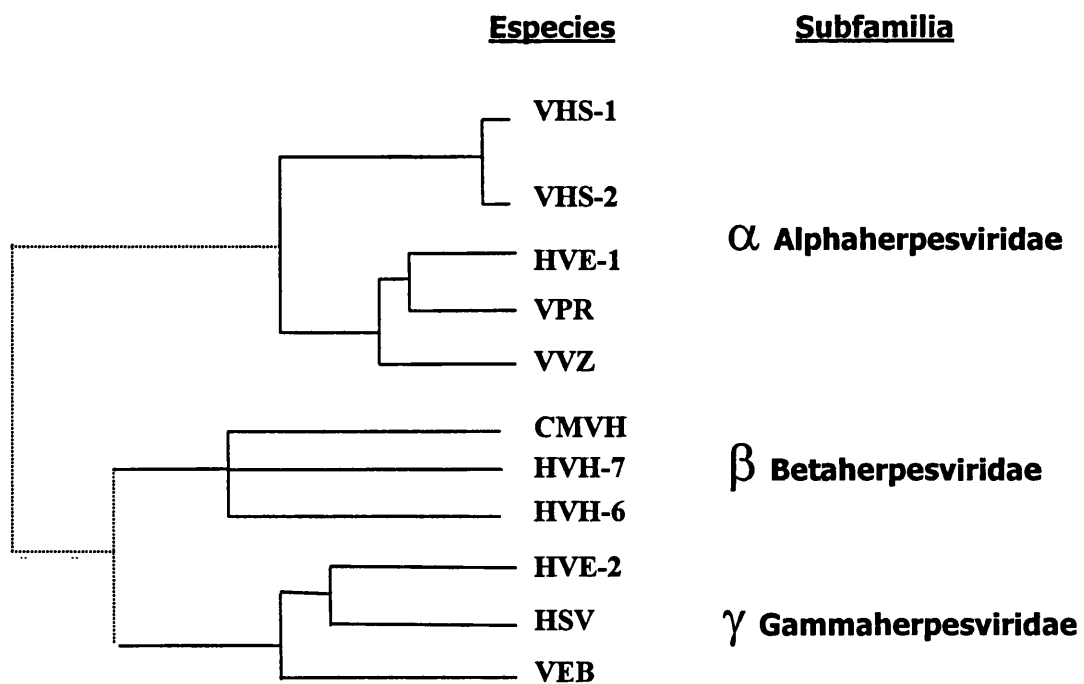
El Citomegalovirus humano (CMVH) fue aislado y multiplicado en cultivo celular por primera vez por Smith (1956), Rowe *et al.* (1956), y Weller *et al.* (1957) en laboratorios diferentes. Smith lo consiguió a partir de la orina de dos niños que padecían la denominada enfermedad de inclusión citomegálica, entidad clínica conocida desde mucho antes de este acontecimiento y cuya vinculación patogénica con un agente viral había sido postulada por Cole y Kuttner (1926). El grupo de Rowe aisló de forma accidental el CMVH a partir de tejido adenoidal de varios niños adenectomizados; por su parte Weller y sus colaboradores recuperaron el CMVH (la cepa AD169) a partir de la orina de varios recién nacidos con enfermedad citomegálica generalizada. Los investigadores mencionados consiguieron cultivar el CMVH en fibroblastos humanos y constatar el efecto citopatógeno que este virus induce en las células infectadas, cuyo aspecto se correspondía con el observado por Jesionek y Kiolemenglou (1904) en muestras biópsicas de hígado, riñón y pulmones de un recién nacido con enfermedad citomegálica. El término Citomegalovirus fue acuñado en 1960 por Weller en virtud del particular aspecto que ofrecen las células infectadas por el virus.

1.1 Taxonomía

El CMVH humano pertenece a la familia *Herpesviridae*, en la que se incluyen virus ampliamente distribuidos en la naturaleza que infectan a varias especies animales y que comparten, entre otras, las siguientes características estructurales y biológicas: contener un ácido nucleico ADN lineal de doble cadena de longitud y capacidad de codificación variables, una cápside de simetría icosaédrica rodeada de una matriz proteica amorfa denominada tegumento, poseer una membrana bilaminar de envoltura

en la que se insertan glucoproteínas esenciales para la replicación del virus, y ser capaces de establecer infecciones latentes en el hospedador.

En concreto el CMVH pertenece a la subfamilia *β-herpesviridae* (Roizman *et al.*, 1981) en la que se incluye a varios virus de amplia distribución en la naturaleza que comparten diversas propiedades genómicas (contenido en G+C de 56% y una densidad de 1.716 g/cm³ -Huang *et al.*, 1973; Ebeling *et al.*, 1983-) biológicas, y patogénicas, aunque infectan restrictivamente a especies animales diferentes (Roizman *et al.*, 1981). A esta subfamilia de herpesvirus pertenecen igualmente el HVH 6 y el HVH 7 a tenor de la secuencia, composición y organización funcional de sus genomas (Lawrence *et al.*, 1990).



VHS-1, VHS-2: Virus Herpes simplex tipos 1 y 2; HEV-1: Herpesvirus equino tipo 1; VPR: Virus de la Pseudorabia; VVZ: Virus Varicella-Zoster; CMVH: Citomegalovirus Humano; HVH-6: Herpes virus humano 6; HVH-7: Herpes virus humano 7; EHV-2: Herpesvirus equino tipo 2; HSV: Herpesvirus saimiri; VEB: Virus Epstein-Barr.

Figura 1.1 Arbol Filogenético de los *Herpesviridae* (Modificado de McGeoch *et al.*, 1995).

Aunque conocido desde hace varias décadas, el CMVH ha adquirido un gran protagonismo en la actualidad debido a su frecuente implicación en infecciones graves en los pacientes inmunocomprometidos, particularmente en los trasplantados y en los enfermos de SIDA.

1.2 Morfología y organización estructural del virión del CMVH

La estructura del virión del CMVH es común a la de los otros *Herpesviridae*. Incluye un core, en el que se encuentra el ADN viral contenido en una cápside de simetría icosaédrica de aproximadamente 100 nm de diámetro e integrada por 162 capsómeros, rodeado por una matriz proteica amorfa denominada tegumento (Wright *et al.*, 1964; McGravan y Smith, 1965). Estos elementos se encuentran envueltos en una membrana bilaminar en la que se incrustan varias glucoproteínas codificadas en el genoma viral. Los viriones maduros son mayoritariamente esféricos y tienen un diámetro aproximado de 150-200 nm, aunque, a diferencia de otros herpesvirus, son muy pleomórficos (Wright *et al.*, 1964). No obstante, en las células infectadas por el CMVH se generan otros tipos de partículas víricas que no son infectivas y cuyo papel en la biología del virus es desconocido (Irmiere y Gibson, 1983); se trata de los denominados cuerpos densos, de aproximadamente 300 nm de diámetro, constituidos por una matriz y una envoltura pero sin nucleocápside, producidos y liberados de las células infectadas en idéntica proporción a los viriones maduros, y de los viriones envueltos no infecciosos los cuales carecen de ADN (Sarov y Abady, 1975; Irmiere y Gibson, 1985).

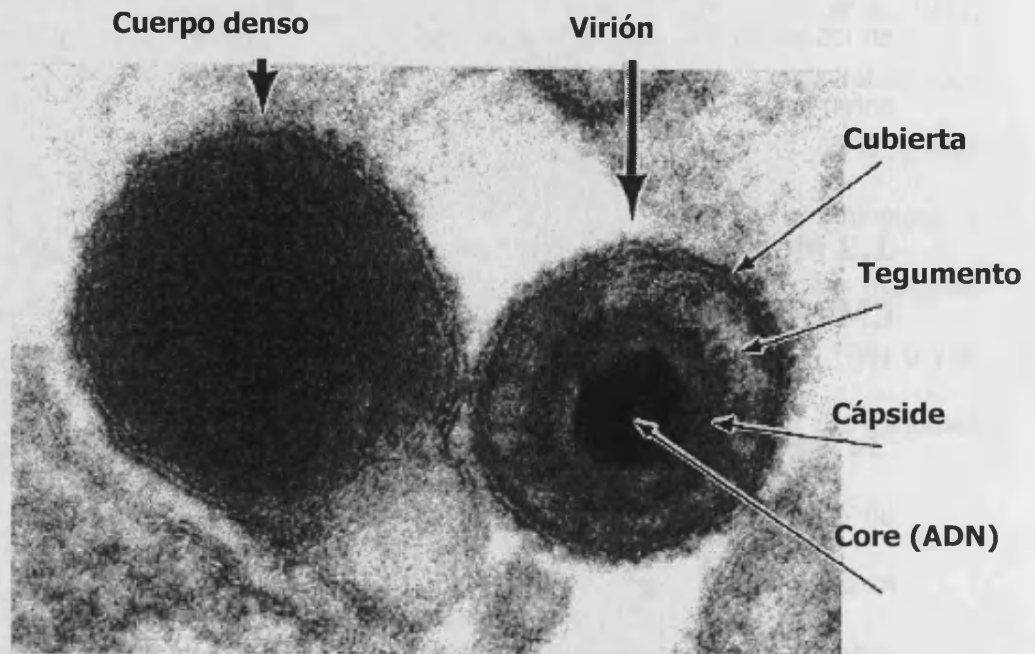


Figura 1.2. Cuerpo denso y virión del CMVH.

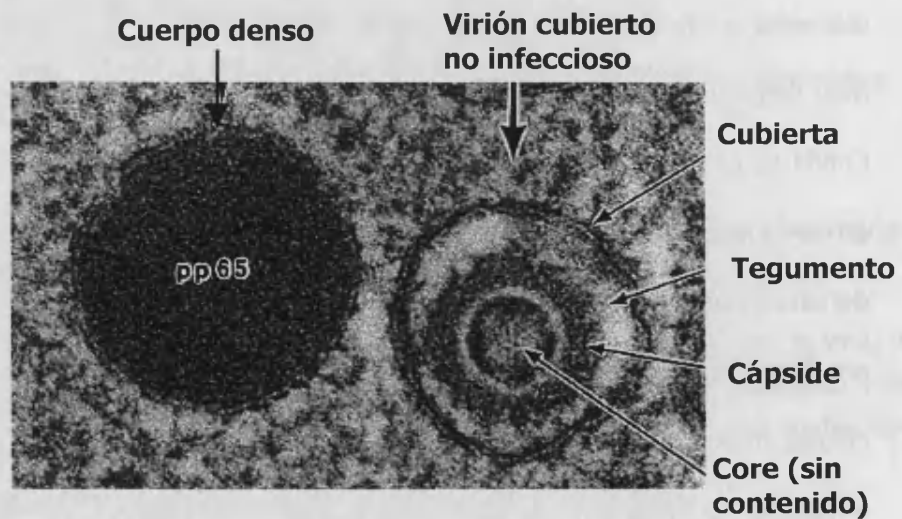


Figura 1.3. Cuerpo denso y virión cubierto no infeccioso (VCNI) del CMVH.

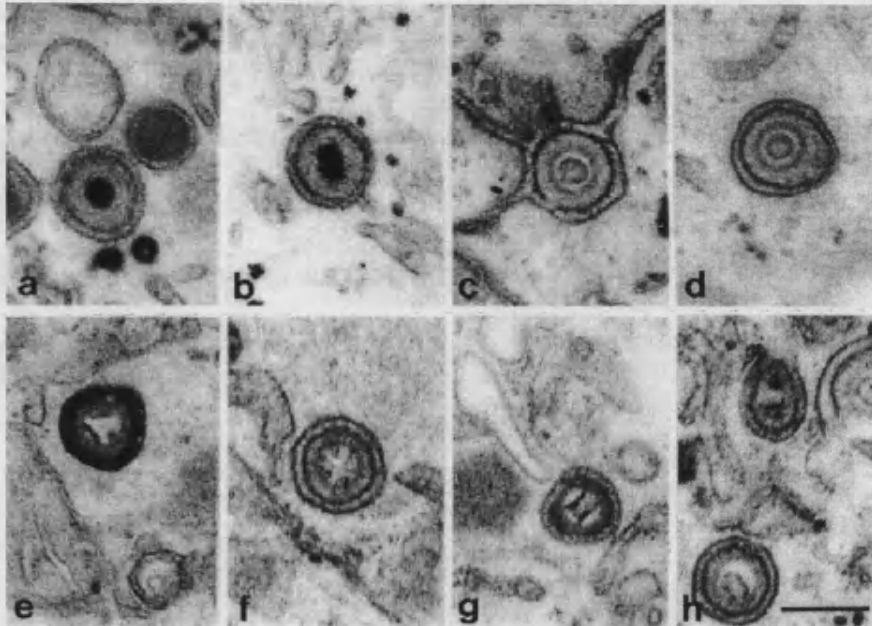


Figura 1.4. Partículas víricas maduras (a,b), partículas cubiertas no envueltas (c,d), partículas deficientes (e-h) (Hemmo *et al.*, 1997).

1.3 El genoma del CMVH

El ADN bicatenario del CMVH contiene entre 230 y 240 Kbp, según la cepa considerada; es el de mayor tamaño y complejidad funcional de entre los herpesvirus (Geelen *et al.*, 1978). El peso molecular del ADN de CMVH es de $1.50-1.55 \times 10^8$ D y su longitud de 65-68 nm (Geelen *et al.*, 1978). Los primeros mapas de restricción del genoma del CMVH fueron obtenidos a principios de la década de los 80, los que junto a la información obtenida mediante el estudio de la ultraestructura del ADN viral purificado tras desnaturalización con álcalis, permitieron dilucidar su organización estructural y funcional; ésta no difiere, en esencia, de la de otros *Herpesviridae* (colinealidad de los genomas de los herpesvirus): contiene dos regiones únicas llamadas L (larga) y C (corta) limitadas por secuencias repetidas denominadas "b" y

Introducción

"c" respectivamente, y una pequeña secuencia denominada "a" que se sitúa en ambos extremos del genoma y en la unión de los segmentos L y C en orientación invertida (Kilpatrick y Huang, 1977; Greenaway *et al.*, 1982; Spector *et al.*, 1982). Varias copias de esta secuencia "a", hasta diez, pueden encontrarse en un mismo genoma como consecuencia de un proceso de amplificación (Mocarski *et al.*, 1987). El componente "a" del genoma del CMVH y de otros herpesvirus contiene dos secuencias "consenso" denominadas pac1 y pac2 necesarias para el correcto ensamblaje del virión en la célula infectada (Kemble y Mocarski, 1989).

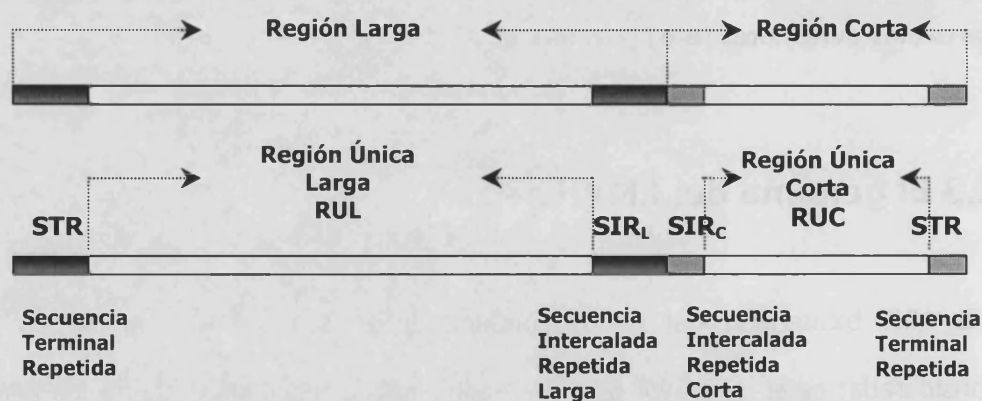


Figura 1.5. Organización del genoma del CMVH.

Los componentes L y C del genoma de CMVH pueden invertirse uno respecto al otro y originar, como consecuencia, 4 isómeros genómicos que se generan en idéntica proporción en las células infectadas (Kilpatrick y Huang, 1977). Se desconoce, sin embargo, la significación biológica de este hecho.

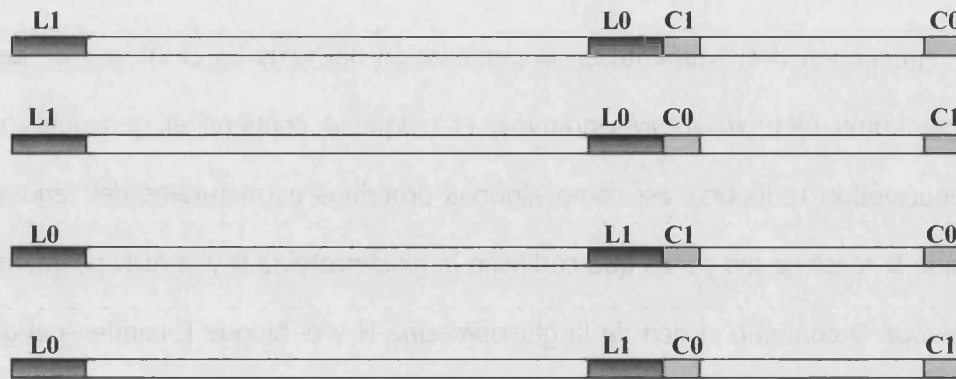


Figura 1.6. Estructura de los isómeros del ADN del CMVH.



El genoma del CMVH ha sido completamente secuenciado (Chee *et al.*, 1990), lo que ha permitido inferir el número de proteínas que es capaz de codificar. En este sentido, sabemos que el genoma del CMVH puede codificar hasta 208 proteínas distintas de al menos 100 aminoácidos (208 marcos de lectura abiertos-ORF-), aunque hasta el momento, sólo una cuarta parte de estos productos ha sido caracterizada.

El estudio comparativo de la secuencia de nucleótidos de los diferentes herpesvirus junto con el análisis de los resultados obtenidos a partir de experimentos de hibridación cruzada entre ellos ha permitido saber que existe muy poca homología genómica, alrededor de un 5%, entre el CMVH y los α y γ -herpesvirus (Kouzarides *et al.*, 1987; Chee *et al.*, 1990); sin embargo, segmentos extensos del genoma de estos virus presentan una organización funcional común. En este sentido, el genoma del CMVH contiene siete bloques de genes (denominados con las letras A hasta G) cuyas secuencias y organización funcional se encuentran conservadas en los genomas de los otros herpesvirus, si bien, su alineación es distinta (Chee *et al.*, 1990; Kouzarides *et*

Introducción

al., 1987). Los productos de estos genes son proteínas implicadas en la replicación y reparación del ADN viral y en el metabolismo de nucleótidos, integrantes del virión, o que intervienen decisivamente en la penetración del virus en el interior de las células diana. Como ejemplos representativos, el bloque A contiene el gen que codifica la ribonucleótido reductasa así como algunas proteínas estructurales del tegumento; el bloque B contiene los genes que codifican la glucoproteína B y la ADN polimerasa viral; el bloque D contiene el gen de la glucoproteína H y el bloque E contiene el gen de la proteína mayor de la cápside vírica (Chee *et al.*, 1990).

Por otra parte, la homología de secuencia entre los diferentes aislados del CMVH se aproxima al 90% (Huang *et al.*, 1976; Pritchett, 1980), lo que indica que la secuencia del genoma del CMVH es muy estable. No obstante, existen pequeñas variaciones de secuencia, fundamentalmente en la unión de los segmentos L y C, que permiten distinguir a los diferentes aislados entre sí mediante el análisis de los patrones de restricción del ADN viral (Weststrate *et al.*, 1983; Chou *et al.*, 1984). Sin embargo, varias evidencias experimentales recientemente obtenidas permiten aventurar que las diferencias de secuencia entre los diferentes aislados pueden ser mayores y más relevantes de lo inicialmente previsto. En este sentido, se ha descrito la existencia de secuencias de hasta 15 Kbp presentes en aislados recientes del virus y ausentes en cepas de laboratorio sometidas a numerosos ciclos replicativos (Towne y AD169). Estas secuencias contienen al menos 19 genes cuyos productos no han sido todavía caracterizados y que, aun siendo prescindibles para la replicación del virus, podrían ser determinantes del tropismo y, en general, de las propiedades patogénicas del virus (Cha *et al.*, 1996).

1.4 Las proteínas del CMVH

El análisis electroforético de viriones purificados mediante centrifugación en gradiente ha revelado que el virión maduro del CMVH contiene al menos 30 proteínas diferentes cuyos pesos moleculares se encuentran comprendidos entre 20-200 kDa (Kim *et al.*, 1976; Stinski, 1976; Gibson, 1983).

La cápside vírica está constituida mayoritariamente por dos proteínas denominadas proteína mayor (MCP-1370 aminoácidos) y proteína menor (mCP-290 aminoácidos) de la cápside (Irmiere y Gibson, 1983, 1985; Gibson, 1983), codificadas en los genes UL86 y UL46 respectivamente. Ambas proteínas tienen sus respectivas homólogas en el resto de los *Herpesviridae* (Chee *et al.*, 1990).

El tegumento del CMVH está constituido por al menos 20 proteínas distintas, en su mayoría fosfoproteínas (Kim *et al.*, 1976). Las proteínas mayoritarias del tegumento del CMVH han sido caracterizadas exhaustivamente. Éstas son: la pp65 y la pp150, codificadas en los ORF UL83 y UL32, respectivamente (Jahn *et al.*, 1987a, 1987b; Jahn y Mach, 1990). Desde un punto de vista funcional ambas proteínas son rápidamente fosforiladas tras la infección de la célula diana por una kinasa de codificación viral (Jahn y Mach, 1990). En su estado fosforilado, pp65 y pp150 parecen intervenir en la regulación de la expresión génica del virus, así como en la modulación del metabolismo de la célula infectada (Jahn y Mach, 1990). Por otra parte, ambas fosfoproteínas son muy inmunogénicas, particularmente la pp150, generando una potente respuesta humoral fácilmente evidenciable mediante western-blot (Landini *et al.*, 1985; 1991; Jahn *et al.*, 1987b; Jahn y Mach, 1990). Otras fosfoproteínas de la matriz viral caracterizadas estructuralmente son las siguientes: pp71, pp28 y pp67

(Jahn y Mach, 1990). No se conoce con precisión, sin embargo, su papel en la biología del virus.

Las proteínas de la envoltura del CMVH han sido objeto de numerosos estudios, los cuales han permitido localizar los genes que las codifican, determinar el modo en que se sintetizan, y conocer su función en el ciclo biológico del virus. Aunque los primeros estudios realizados sobre la envoltura del CMVH aventuraban la existencia de hasta ocho glucoproteínas de superficie distintas (Kim *et al.*, 1976; Stinski, 1976; Gibson, 1983; Farrar y Oram, 1984; Farrar y Greenaway, 1986), actualmente existe el convencimiento de que este número es mayor de acuerdo con el hecho de que el genoma del CMVH tiene capacidad suficiente para codificar 50 glucoproteínas diferentes (Chee *et al.*, 1990). A pesar de ello, sólo unas pocas han sido caracterizadas.

La glucoproteína de envoltura mejor caracterizada es la denominada gB, producto del ORF UL55, a la que también se refiere la literatura como gA (Pereira *et al.*, 1982; Pereira *et al.*, 1984), gp55-116 (Britt, 1984) o gC1 (Gretch *et al.*, 1988a). Se trata de una proteína de 908 aminoácidos glucosilada en sitios de N-glucosilación y de O-glucosilación (Cranage *et al.*, 1986; Chee *et al.*, 1990). Aunque se sintetiza en forma de un único polipéptido precursor (Britt y Auger, 1986), su forma madura es la de un heterodímero sujeto por enlaces covalentes- puentes disulfuro- cuyas unidades son la gp116 (porción aminoterminal del polipéptido precursor) y la gp55 (porción carboxiterminal del polipéptido precursor), esta última contiene una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos que permite el anclaje del heterodímero a la membrana de envoltura (Cranage *et al.*, 1986). El polipéptido precursor, de 105 KDa, es modificado en el retículo endoplásmico rugoso mediante la adición de azúcares ricos en manosa a los sitios de N-glucosilación. La molécula resultante, de 130 KDa, se organiza en

oligómeros que migran al aparato de Golgi por vía intracanalicular donde se produce una nueva modificación consistente en la eliminación de azúcares ricos en manosa y su sustitución por azúcares complejos. Allí mismo se produce la escisión por proteólisis de los oligómeros por la actuación de un enzima celular, la furina, que de este modo genera el heterodímero funcional de la molécula (Britt y Auger, 1986; Spaete *et al.*, 1988; Britt y Vugler, 1989). La molécula queda inserta en la membrana plasmática y orientada del siguiente modo: el extremo aminoterminal proyectado hacia el exterior (extracelular) y el carboxiterminal en situación intracelular.

La gB tiene proteínas homólogas en el resto de los herpesvirus (Cranage *et al.*, 1986; Chee *et al.*, 1990); en todos ellos su papel parece esencial para la replicación del virus, aunque este extremo sólo ha sido demostrado en el HSV-1 entre los herpesvirus humanos (Little *et al.*, 1981).

La gB es una proteína multifuncional que interviene decisivamente en el proceso de fusión de membranas (envoltura viral-membrana plasmática celular) necesario para la penetración del virus en el interior de la célula diana (Navarro *et al.*, 1993; Tugizov *et al.*, 1994; Tugizov *et al.*, 1995); probablemente también participa en el proceso de adsorción del virus sobre las células (Compton *et al.*, 1993) y en la activación del proceso que permite al CMVH transmitirse entre células contiguas sin necesidad de salir al exterior de ellas (Navarro *et al.*, 1993).

Por otra parte, la gB es una proteína muy inmunogénica que genera una fuerte y mantenida respuesta de anticuerpos (Cremer *et al.*, 1985; Pereira *et al.*, 1984; Pereira *et al.*, 1993a; Pereira *et al.*, 1993b), muchos de los cuales son capaces de neutralizar al CMVH en ausencia del complemento (Pereira *et al.*, 1982; Gonczol *et al.*, 1986; Britt *et al.*, 1988; Britt y Vugler, 1990; Gonczol *et al.*, 1990; Rasmussen *et al.*, 1991;

Marshall *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 1997), por lo que se está utilizando como inmunógeno en diferentes prototipos de vacunas contra el CMVH.

La estructura antigénica de la gB ha sido investigada exhaustivamente utilizando diversas estrategias moleculares (Utz *et al.*, 1989; Meyer *et al.*, 1990; Kniess *et al.*, 1991; Basgoz *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 1992; Qadri *et al.*, 1992). Los estudios realizados han permitido localizar en la molécula varios sitios antigénicos inmunodominantes. En este sentido cabe destacar el sitio antigénico denominado AD-1 situado en la porción aminoterminal de gp55 que contiene varios epítomos continuos solapados (Meyer *et al.*, 1990; Kniess *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 1992). La secuencia de aminoácidos que constituye AD-1 se encuentra muy conservada en todos los aislados clínicos analizados hasta el momento (Utz *et al.*, 1989). Paralelamente se han localizado en la molécula, tanto en la gp116 como en la gp55, varios determinantes antigénicos conformacionales que generan anticuerpos neutralizantes de extraordinaria eficacia antiviral (Basgoz *et al.*, 1992; Qadri *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 1997).

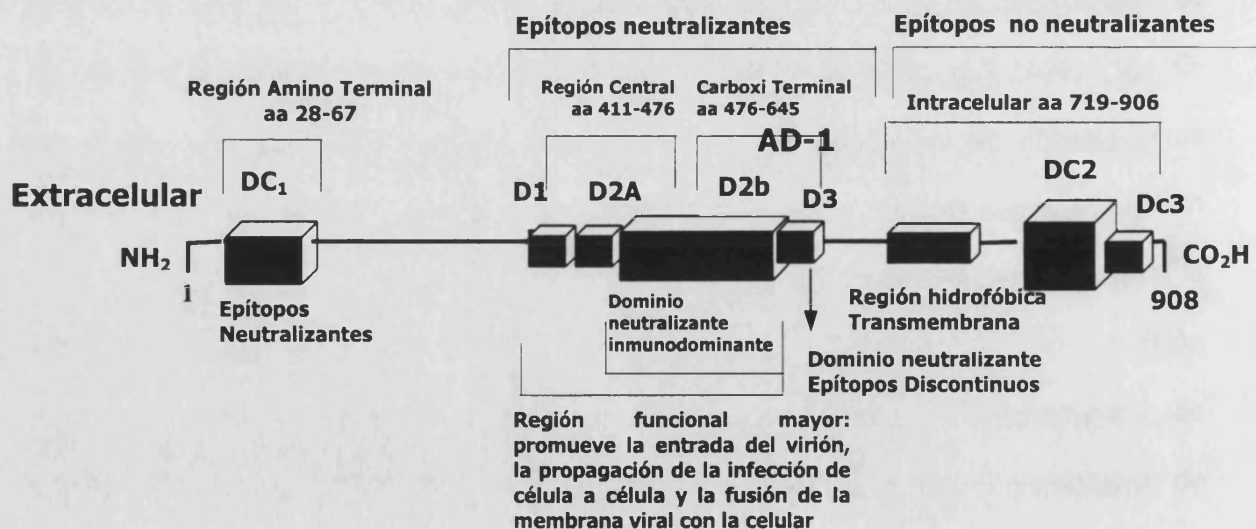


Figura 1.7. Mapa topográfico de los dominios antigénicos y funcionales de la gB del CMVH cepa AD169. "D" = Epítomos discontinuos; "C" = Epítomos continuos.

La gB también parece ser diana de clones de células T CD8+ citotóxicas específicas que se generan tras la infección por el CMVH (Borysiewicz *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1991) y que podrían intervenir decisivamente en la resolución de la primoinfección y de las infecciones activas por reactivación.

La glucoproteína H (gH) (Pachl *et al.*, 1989), producto del ORF UL75, también conocida como gp86 (Rasmussen *et al.*, 1984) o gcIII (Gretch *et al.*, 1988c), es una proteína presente en gran cantidad en la envoltura del virus. A diferencia de la gB presenta una escasa homología de secuencia con sus homólogas en el genoma de otros herpesvirus (Cranage *et al.*, 1988) aunque, al igual que en éstos, podría ser absolutamente necesaria para la replicación del virus, si bien esta posibilidad no ha sido confirmada hasta el momento.

El precursor de la gH contiene 742 ó 743 aminoácidos en función de la cepa estudiada y se glucosila en el retículo endoplásmico rugoso (R.E.R.) (Kaye *et al.*, 1992). Presumiblemente, para que se transporte a la membrana de la célula infectada es necesario que se asocie con otra proteína de codificación viral producto del ORF UL115, denominada gL (Huber y Compton, 1997; 1999); de otro modo la gH queda retenida en el R.E.R.

Al igual que ocurre con la gB, la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la gH está conservada en las cepas naturales analizadas (Chou, 1992).

El papel de la gH en el ciclo infeccioso del virus no está definido con precisión aunque parece intervenir activamente en los sucesos moleculares que conducen a la penetración del CMVH en el interior de la célula diana a través de una interacción de

alta afinidad con una proteína de la membrana de 90 KDa presente en varios tipos celulares (Keay *et al.*, 1989).

Por otra parte, al igual que la gB, la gH induce en el hospedador la síntesis de anticuerpos neutralizantes capaces de actuar en ausencia del complemento, hecho que convierte a esta molécula en un componente potencial de una vacuna subunitaria contra el CMVH (Rasmussen *et al.*, 1984). En concreto, la gH parece poseer un epítipo neutralizante inmunodominante que comprende los aminoácidos del 15 al 142 de la proteína (Urban *et al.*, 1994).

La envoltura del CMVH contiene otras glucoproteínas cuya caracterización es por el momento incompleta. Diversos autores han conseguido purificar un complejo glucoproteico denominado gcII (Gretch *et al.*, 1988b), o gp47-52, constituido por un número indeterminado de subunidades proteicas codificadas en la familia de ORF del componente US6, que contiene al menos 6 ORF distintos (Gretch *et al.*, 1988b, 1988c), algunos de cuyos productos podrían determinar el tropismo del virus. Este complejo parece ser dispensable para la replicación del CMVH *in vitro*, sin embargo es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes en el modelo experimental murino (Gretch *et al.*, 1988c).

Otras glucoproteínas estructurales del virión son la denominada gp148 (gO), codificada en el ORF UL74 (Huber y Compton, 1997) que parece formar un complejo molecular con la gH, la gL codificada en el ORF UL115 que forma un dímero con la anterior y el producto del ORF US9 (Lehrer *et al.*, 1989) una proteína con cierta homología con la gE de HSV-1, proteína esta constitutiva del complejo receptor de Fc de las IgG (Edson *et al.*, 1987). Es probable que en un futuro cercano se caractericen

más glucoproteínas de envoltura puesto que como antes mencionamos el genoma del CMVH tiene suficiente capacidad para codificar 50 glucoproteínas distintas.

1.5 Ciclo replicativo del CMVH

El CMVH es capaz de infectar un espectro limitado de tipos celulares, pero puede hacerlo de forma latente, abortiva o lítica, al igual que los otros miembros de la familia *Herpesviridae*. El CMVH infecta líticamente células diferenciadas y diploides y, excepcionalmente, células indiferenciadas, transformadas o aneuploides, estas últimas suelen comportarse como "semipermissivas" para el CMVH por lo que en ellas se generan infecciones abortivas que por tanto no culminan con la producción de progenie viral (Mocarski, 1993). La duración media del ciclo infectivo del CMVH en las células permisivas es de 48-72 h. El ciclo infectivo lítico ha sido caracterizado durante los últimos años; en cambio, poco se sabe del patrón de expresión génica del CMVH en las infecciones latentes y de los mecanismos moleculares que determinan el modelo infectivo utilizado por el virus.

1.5.1 Adsorción y penetración

El ciclo infectivo del CMVH se inicia con la adsorción del virus sobre la superficie la célula diana a la que sigue su penetración en el interior de la célula a través de un proceso de fusión de membranas pH-independiente (Pereira, 1994). Durante la adsorción, el CMVH interacciona con proteoglicanos (como el heparán sulfato) (Compton *et al.*, 1993) o con glucopolímeros como el ácido glucolilneuramínico (GIneu) o N-acetilglucosamina (GlcNAc) de la membrana celular (Lobert *et al.*, 1995) dependiendo del tipo celular, presumiblemente a través de la gCII y/o gB (Kari y

Gehrz, 1992). Estas interacciones consiguen aglutinar y concentrar un gran número de partículas víricas sobre la superficie celular facilitando así la penetración del virus en el interior de las células, proceso mediado por la gB y el complejo gH-gL (Keay y Baldwin, 1991; Navarro *et al.*, 1993, Tugizov *et al.*, 1994; Milne *et al.*, 1998) a través de un mecanismo de fusión de membranas, el cual se desencadena tras la interacción de estas moléculas con un receptor celular de alta afinidad. En cualquier caso el modo preciso en que se produce la penetración del CMVH en la célula diana es por el momento ignoto.

Varias moléculas, diferentes según el tipo celular estudiado, podrían actuar como receptores de alta afinidad del CMVH. Una de ellas es una proteína de 30-32 Kda presente en la membrana de diversos tipos celulares analizados (Adlish *et al.*, 1990; Taylor y Cooper, 1990; Nowlin *et al.*, 1991), incluyendo células permisivas y semipermisivas para la infección por el CMVH; otra es una glucoproteína de 92.5 Kda que interacciona específicamente con la gH y que se encuentra presente en la superficie de los fibroblastos y los linfocitos B y T (Keay *et al.*, 1989; Keay y Baldwin, 1992); incluso una molécula denominada CD13 (aminopeptidasa N), una metaloproteasa presente en las células sanguíneas (Soderberg *et al.*, 1993), ha sido propuesta como receptor para el virus. Por otra parte, la posibilidad de que el CMVH se recubra de proteínas del hospedador (β -2 microglobulina o anexina II) para facilitar su penetración en la célula diana utilizando los ligandos naturales de aquéllas ha sido sugerida por varios investigadores (Grundy *et al.*, 1987; Beck y Barrell, 1988; Browne *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 1994), aunque no sería en ningún caso el modo fundamental de penetración del virus. Una vez en el citoplasma celular, el virus se decapsida y el ADN viral migra en dirección al núcleo celular donde se inicia la transcripción de varios genes esenciales para la replicación del virus.

1.5.2 Expresión y regulación de los genes virales

La expresión de los genes del CMVH se produce de forma secuencial y ordenada tal y como ocurre en el resto de los herpesvirus (Roizman *et al.*, 1993), y su regulación depende de una compleja interacción de procesos que ocurren tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Mocarski *et al.*, 1991).

Los primeros genes se transcriben unos pocos minutos después de la penetración del virus. La transcripción de esos genes es independiente de la síntesis *de novo* de proteínas y se produce, consiguientemente, en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas tales como la cicloheximida; son los denominados genes α (immediate early) y su transcripción, al igual que la del resto de genes del CMVH, es conducida por la ARN polimerasa II celular (Mocarski, 1993). Los productos de los genes α son proteínas no estructurales y reguladoras de la expresión del resto de los genes del virus (Mocarski *et al.*, 1990). Aunque existen varios genes α localizados en el genoma del CMVH, sólo los genes IE1 e IE2 han sido caracterizados exhaustivamente.

La expresión de los genes α se encuentra regulada por un potente amplificador ("enhancer") situado entre los pares de bases -50 y -550 (en relación con el punto de inicio de la transcripción) (Thomsen *et al.*, 1984; Boshart *et al.*, 1985), que contiene varias secuencias consenso para unirse a factores celulares de transcripción, particularmente NF-KB (Sambuccetti *et al.*, 1989), responsables en última instancia de la activación transcripcional de IE. El producto del gen IE1 (proteína IE1) es una fosfoproteína de 72 KDa (Stinski, 1978; Wathen y Stinski, 1981; Gibson, 1983) cuya función es doble: por un lado activa la expresión de diversos amplificadores de genes virales y también celulares, probablemente en conjunción con diversas proteínas

nucleares capaces de unirse a ADN bicatenario (Stenberg *et al.*, 1990), y por otra se comporta como un transactivador de la expresión del propio gen IE1, en este caso, a través de la inducción de la transcripción de NF-KB, un potente estimulador del amplificador del gen IE1 (Cherrington y Mocarski, 1989; Sambuccetti *et al.*, 1989). El resultado final de la actividad de IE1 es la estimulación de su propia síntesis y la inducción de la transcripción de IE2 y de los genes β y γ .

El producto del gen IE2 (proteína IE2) es un polipéptido de 86 Kda (Stinski, 1978; Gibson, 1983) que se origina como consecuencia de un mecanismo de "splicing" alternativo del ARNm que codifica IE1 (Stenberg *et al.*, 1985; 1990). La función de IE2 en la biología del CMVH es compleja. Por sí misma IE2 puede desactivar la expresión del gen IE1 a través de la interacción con una pequeña secuencia situada en la proximidad del sitio de inicio transcripcional de IE1 (señal de represión en "cis") (Pizzorno *et al.*, 1988; Pizzorno y Hayward, 1990); por otra parte, IE2 se comporta como un transactivador heterólogo, esto es, capaz de activar la expresión tanto de genes virales (β y γ) como celulares, probablemente de forma sinérgica con IE1 en el caso de los genes virales (Hermiston *et al.*, 1987; Pizzorno *et al.*, 1988; Tevethia y Spector, 1989). No se conoce con precisión la forma en que IE2 ejerce su función transactivadora.

A la expresión de los genes α sigue la de los genes β (early-precoces) y después la de los γ (late-tardíos), si bien esta distinción cronológica es en cierto modo artificial si se considera que los productos transcripcionales de los genes virales se acumulan en el tiempo y su traslación puede no producirse concomitantemente, y que algunos de estos genes contienen varios promotores cuya activación se produce en distintos momentos tras la infección (Mocarski *et al.*, 1990). En cualquier caso se acepta que,

entre los genes β , los denominados $\beta 1$, se activan en primera instancia, iniciándose su transcripción entre las 4 y 8 horas siguientes a la penetración del virus, mientras que los genes $\beta 2$ se expresan entre las 8-24 horas postinfección. En general, los genes β codifican proteínas estructurales ($\beta 2$) y no estructurales ($\beta 1$), estas últimas implicadas en la replicación del ADN viral. La síntesis de estas proteínas no puede impedirse con el uso de inhibidores de la replicación del ADN vírico (Mocarski *et al.*, 1990). Entre los productos de los genes β cabe destacar a los siguientes: la ADN polimerasa viral (UL44), la proteína de unión a ADN monocatenario (UL57), la proteína con actividad helicasa-primasa (UL102) y la ADN helicasa (UL 105).



Los genes γ (L-late- o tardíos) también pueden subdividirse en $\gamma 1$ y $\gamma 2$ en función del momento en que se transcriben y de la dependencia de la replicación previa del ADN vírico para su expresión. Los productos transcripcionales de los genes $\gamma 1$ se detectan entre las 12-36 horas postinfección y su expresión se produce, aunque mínimamente, en presencia de inhibidores de la replicación del ADN viral. Los productos de los genes $\gamma 2$ se detectan a las 24-48 horas postinfección y su expresión se encuentra estrictamente supeditada a la replicación previa del ADN viral. Tanto los productos de los genes $\gamma 1$ como $\gamma 2$ codifican la expresión de gran parte de las proteínas estructurales del virión (Mocarski *et al.*, 1990) entre las que cabe destacar a la mayoría de las fosfoproteínas del tegumento y a la totalidad de las glucoproteínas de la membrana viral.

La replicación del ADN del CMVH se desarrolla de modo similar a la de otros herpesvirus, aunque más lentamente, con dos picos de síntesis que se observan a las 18-24 horas y 60-80 horas postinfección (Stinski, 1978). Al igual que en el caso del VHS-1 (Roizman, 1993), el genoma del CMVH se circulariza poco después de la

penetración del virus (LaFemina y Hayward, 1983) y sólo unas pocas proteínas son imprescindibles para su replicación; éstas son: la ADN polimerasa viral (Heilbronn *et al.*, 1987; D'Aquila *et al.*, 1989), una proteína de unión a la secuencia del origen de replicación del ADN viral (Hamzeh *et al.*, 1990), dos proteínas con capacidad para unirse al ADN monocatenario (Kemble *et al.*, 1987; Kemble y Mocarski, 1989) y al ADN bicatenario (Gibson *et al.*, 1981; Mocarski *et al.*, 1985), y un número indeterminado de proteínas que podrían ser los componentes de un complejo helicasa-primasa similar al presente en las células infectadas por el VHS-1 (Crute *et al.*, 1989; Chee *et al.*, 1990).

1.5.3 Ensamblaje y liberación de nuevas partículas víricas

A pesar de los muchos estudios realizados sobre la ultraestructura de las células infectadas por el CMVH (McGhravan y Smith, 1965; Smith y Harven, 1974; Haguenu y Michelson, 1975; Maeda *et al.*, 1979; Cavallo *et al.*, 1981; Fons y Albretch, 1986; Severi *et al.*, 1988; Radsak *et al.*, 1990), todavía no se conocen algunos aspectos de la morfogénesis de los viriones maduros del CMVH. Parece claro que las cápsides víricas se sintetizan en primer lugar y que después se produce el empaquetamiento del ADN viral (Cavallo *et al.*, 1981). El ensamblaje de las nucleocápsides ocurre en el núcleo celular en el interior de unas estructuras fibrilares compuestas por proteínas estructurales y el ADN del virus. Este proceso es el responsable del efecto citopático característico del CMVH (inclusión intranuclear en "ojo de búho") (Fons y Albretch, 1986). Más tarde, las nucleocápsides alcanzan el espacio comprendido entre las dos capas de la membrana nuclear (espacio perinuclear), adquiriendo en este proceso una envoltura que se corresponde con la capa interna de la membrana nuclear y que contiene insertadas las glucoproteínas víricas en estado inmaduro (Radsak *et al.*,

1990). Lo que acontece después no se conoce con precisión; es probable que las partículas víricas se desplacen a través de la vía exocítica celular hasta alcanzar el aparato de Golgi para posteriormente ser transportadas mediante vesículas exocíticas al exterior de la célula. Durante este tránsito, las glucoproteínas de superficie sufrirían varias modificaciones (oligomerización y glucosilación) hasta alcanzar su estructura y composición maduras. Alternativa o simultáneamente las partículas víricas inmaduras podrían alcanzar el citoplasma celular a partir del sistema intracanalicular de membranas de la célula perdiendo la envoltura inicial para recuperarla después a partir de la membrana del aparato de Golgi o de la membrana de las vesículas de exocitosis, ambas conteniendo las glucoproteínas víricas en su estado maduro (Smith y Harven, 1974).

1.6 Patogenia de la infección por el CMVH y respuesta inmunitaria contra el virus

El CMVH se comporta como un virus poco patógeno en el huésped inmunocompetente en el que produce infecciones generalmente inaparentes; sin embargo, su virulencia es extraordinaria en individuos inmunodeprimidos. La primoinfección puede adquirirse por vía parenteral (a través de la sangre, órganos trasplantados y por vía transplacentaria), oral (la saliva es particularmente relevante en la transmisión del virus entre los humanos debido a la frecuencia con que el virus se excreta en ella y a la cantidad de virus presente en dicha secreción, lo que está en relación con el tropismo del CMVH por las glándulas salivares y el hecho de que en ellas el CMVH establece un modelo infectivo persistente -Ho, 1991-) o sexual (Alford y Britt, 1990); en los dos últimos casos, el virus se multiplica localmente en el sitio de infección en células epiteliales y fibroblastos, a partir del cual accede a la circulación

general (viremia) donde es capaz de infectar células sanguíneas (leucocitos) y células endoteliales. Durante la fase virémica el ADN del CMVH puede detectarse en los monocitos, linfocitos y neutrófilos, particularmente en estos últimos (Saltzman *et al.*, 1988; Danker *et al.*, 1990). Al parecer, la infección que el CMVH produce en los neutrófilos es abortiva, y por tanto no tiene como consecuencia la generación de nuevas partículas víricas. La presencia de pp65 y pp150, ambas fosfoproteínas, pero no de los ARNm en que están codificadas, y la ausencia de p72 (IE1) en el interior de los neutrófilos así lo demuestra (Turtinen *et al.*, 1987; Grefte *et al.*, 1994; Grundy *et al.*, 1998). Si bien los leucocitos neutrófilos no son relevantes en la multiplicación del CMVH, sí desempeñan un papel crucial en la diseminación del virus, al actuar como transportadores. Algo similar ocurre con los monocitos. La infección que el CMVH produce en ellos es también abortiva (Einhorn y Ost, 1984; Rice *et al.*, 1984; Taylor-Wiedeman, 1991), no obstante cuando éstos alcanzan los tejidos y se diferencian en macrófagos permiten que se complete el ciclo infectivo y de ese modo se generen nuevas partículas víricas (Weinshenker *et al.*, 1988; Ibañez *et al.*, 1991; Lathey y Spector., 1991; Taylor-Wiedeman *et al.*, 1994), las cuales permanecen asociadas a las membranas intracelulares y no son, en consecuencia, evacuadas al exterior. Esta especial ubicación de los viriones neoformados en el interior de los macrófagos tisulares dificulta enormemente las actuaciones del sistema inmunitario encaminadas a destruirlos (Fish *et al.*, 1996) y sin embargo no impide su extensión a las células endoteliales o fibroblastos adyacentes, transmisión que parece producirse a través de microfusiones transitorias entre las membranas de las células en contacto (Gerna *et al.*, 2000). Una vez en el torrente circulatorio, el CMVH infecta líticamente a las células endoteliales y con ello hace que se desprendan de la pared vascular y circulen libremente por la sangre hasta que quedan atrapadas en algún capilar, contribuyendo de este modo a la diseminación del CMVH (Grefte *et al.*, 1993; Percivalle *et al.*, 1993).

Resulta además particularmente beneficioso para la diseminación del virus el hecho de que las células endoteliales y los leucocitos neutrófilos sean capaces de infectarse mutuamente (en un proceso bidireccional) siempre que estén en contacto, situación que se produce cuando los leucocitos migran a los tejidos a través de la capa de células endoteliales (Waldman *et al.*, 1995; Grundy *et al.*, 1998).

La infección de las células endoteliales por el CMVH tiene como consecuencia adicional la hiperexpresión en éstas de varios genes: unos codifican proteínas de adhesión tales como ICAM (intercellular adhesion molecule) 1 y 2 y VCAM (vascular adhesion molecule membrane) y otros quimioquinas tales como la interleukina 8 (IL-8) y RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed y secreted); las primeras incrementan la capacidad de adhesión de las células endoteliales a los leucocitos neutrófilos y monocitos y de este modo facilitan la migración transendotelial de éstas; las segundas tienen también como efecto la translocación de leucocitos neutrófilos a través de la capa de células endoteliales. El CMVH consigue de este modo potenciar su propia diseminación (Grundy y Downes, 1993; Muruyama *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1996; Shahgasenpour *et al.*, 1997).

A la presencia del CMVH en la sangre sigue su diseminación a distintos órganos y tejidos. Virtualmente cualquiera de ellos puede albergar al CMVH después de la primoinfección. Es particularmente frecuente su presencia en las glándulas salivares y en el epitelio tubular renal por los que tiene un tropismo especial, el hígado, los pulmones, el tracto gastrointestinal, la médula ósea y el bazo y los ganglios linfáticos. Presumiblemente, en la mayoría de estas localizaciones el virus se encuentra en estado de latencia; sin embargo, en las glándulas salivares y en el riñón el CMVH establece una modelo infeccioso persistente por el cual el virus se multiplica aunque sin producir daño aparente en el órgano en que lo hace (Sinzger y Jahn, 1996) y se excreta.

El tipo celular en que el CMVH se establece de forma latente no está firmemente establecido. Es muy probable que distintas células hematopoyéticas, especialmente los monocitos de la sangre periférica y las células progenitoras hematopoyéticas (CD34+) e incluso las células endoteliales alberguen *in vivo* al CMVH en estado de latencia (Stanier *et al.*, 1989; Taylor-Wiedeman *et al.*, 1991; Maciejewski *et al.*, 1992; Kondo *et al.*, 1994; Minton *et al.*, 1994; Mendelsen *et al.*, 1996; Hahn *et al.*, 1998; Slobedman y Mocarski, 1999). No obstante, el mecanismo molecular que mantendría el estado de latencia en estas células es desconocido. Algunos investigadores han comunicado la presencia en estas células de transcritos de los genes IE cuya similitud con el LATS de HSV-1 es manifiesta (Kondo *et al.*, 1994; 1996). A partir de estos focos de latencia el CMVH puede reactivarse ocasionando una infección productiva que puede o no tener repercusión clínica. Las reactivaciones pueden producirse espontáneamente en los individuos inmunocompetentes, en quienes no suelen tener consecuencias clínicas, sin embargo son mucho más frecuentes en los pacientes con un compromiso en el funcionamiento del sistema inmunitario celular, en quienes pueden resultar en una enfermedad orgánica diseminada. Tampoco se conoce el mecanismo molecular que dirige la reactivación del virus a partir de su estado de latencia. Por otra parte, se sabe que un individuo puede infectarse varias veces por diferentes cepas del CMVH, lo que indica que no hay inmunidad cruzada heterotípica (Ho, 1991).

En el control de la primoinfección por parte del sistema inmunitario del huésped parecen tener relevancia tanto los anticuerpos neutralizantes generados frente a glucoproteínas del virus (gB y gH) como las células efectoras NK y las células T CD8+ específicas, aunque ninguno de ellos, ni aislada ni conjuntamente, consiguen eliminar el virus del organismo, donde permanece en estado de infección persistente y latente (Ho, 1995). Distintos estudios realizados en el modelo experimental murino indican

que la respuesta precoz de las células NK frente a la agresión viral en los órganos y tejidos parece determinante en el control de la infección primaria por el CMVH (Quinnan y Manischewitz, 1979; Bancroft *et al.*, 1981; Shellam *et al.*, 1981; Bukowski *et al.*, 1984; Welsh *et al.*, 1991). Sin embargo, el control definitivo de la infección primaria por el CMVH depende de la activación clonal de células T CD8+ y CD4+ específicas, estas últimas tanto citolíticas como reguladoras (Quinnan *et al.*, 1982; Davignon *et al.*, 1996). En todo caso, el papel de las células T CD8+ parece clave no sólo en la terminación de la fase aguda de la infección primaria sino también en la reducción de la cantidad de virus que se instala latentemente en el organismo y por lo tanto del riesgo de recurrencias (Polic *et al.*, 1998; Steffens *et al.*, 1998). La mayor parte de los clones celulares T (ya sean del fenotipo CD8+ o CD4+) específicos contra el CMVH que circulan en la sangre periférica después de la infección natural por el virus reconocen epítomos contenidos en unas pocas proteínas virales, particularmente en la fosfoproteína del tegumento pp65 (UL83) y en la proteína inmediato-precoz IE-1 (exón 4). Concretamente, se han identificado hasta el momento 10 epítomos en pp65 y 7 en IE-1 reconocidos por linfocitos T CD8+ humanos, reconocimiento restringido por distintos haplotipos HLA-I, más frecuentemente HLA-A2, HLA-B35 y HLA-B18 (Reddehase, 2000). Sin embargo, una fracción de ellos, cuya magnitud varía individualmente, reconoce péptidos de otras proteínas virales tales como las glucoproteínas gB y gH y las fosfoproteínas pp150 y pp28 (Borysiewickz *et al.*, 1988; Alp *et al.*, 1991; McLaughlin *et al.*, 1994; Beninga *et al.*, 1995; He *et al.*, 1995; Boppana y Britt, 1996; Gyulai *et al.*, 2000).

El papel de los anticuerpos en el control de la infección primaria, de acuerdo con los datos obtenidos en el modelo murino, parece limitarse a reducir, en la medida de lo posible, la expansión del virus libre circulante (Jonjic *et al.*, 1994); de este modo podrían contribuir a minimizar la gravedad de la infección también en los humanos

(Fowler *et al.*, 1992; Adler *et al.*, 1995; Britt y Mach, 1996). De hecho, parece que los individuos, tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos, que desarrollan una primoinfección claramente sintomática (síndrome mononucleósico) generan una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra el CMVH de menor intensidad que aquellos en los que la primoinfección se presenta como un cuadro oligosintomático (más frecuentemente hepatitis anictérica) o asintomático por completo (Alberola *et al.*, 2000). Sin embargo, la participación de los anticuerpos funcionales contra el CMVH en la resolución de la infección primaria no es determinante; al menos esa conclusión se desprende de los estudios realizados en el modelo experimental murino (Jonjic *et al.*, 1994).

Se ha acreditado que los anticuerpos capaces de neutralizar virus libre extracelular son eficaces frente al CMVH; sin embargo, es posible que anticuerpos con otras capacidades funcionales (mediadores de citotoxicidad celular o inhibidores de la transmisión intercelular del virus) sean también eficaces *in vivo* contra el virus. Esta posibilidad, sin embargo, no ha sido probada todavía. Los anticuerpos funcionales con capacidad para neutralizar el CMVH libre en ausencia del sistema del complemento, como se ha indicado con anterioridad, reconocen mayoritariamente a las glucoproteínas gB y gH. Curiosamente, los anticuerpos neutralizantes representan sólo una mínima fracción del total de los anticuerpos que se generan tras la infección por el CMVH, los cuales reconocen mayoritariamente varias fosfoproteínas del tegumento, particularmente pp150 (Rasmussen *et al.*, 1991; Lyu *et al.*, 1991; Pereira *et al.*, 1993); los anticuerpos de esta última especificidad carecen de actividad funcional contra el CMVH pero su detección es la base de la mayoría de ensayos serológicos que se emplean para el diagnóstico indirecto de las infecciones por el CMVH.

Como se ha mencionado anteriormente, el CMVH establece una infección persistente de bajo nivel replicativo en las glándulas salivares y en el aparato genitourinario, lo

cual justifica el hecho de que la excreción urinaria y genital del virus sea habitual incluso en individuos inmunocompetentes. No puede descartarse, sin embargo, que este modelo infectivo se produzca también en otros órganos tales como el sistema digestivo y el pulmón. Lo particular de esta situación es que el sistema inmunitario parece permitir este estadio infectivo; de hecho, no hay infiltración linfocitaria en los órganos infectados persistentemente por el CMVH.

El control de las reactivaciones del CMVH depende mayormente de las respuestas T CD8+ citotóxica y CD4+ colaboradora de memoria (CD45RA+) específicas; el papel de los anticuerpos neutralizantes sería, al igual que durante la primoinfección, evitar, en la medida de lo posible, la diseminación del virus libre y en consecuencia minimizar la gravedad clínica del proceso. Parece claro, sin embargo, que los anticuerpos funcionales contra el CMVH no pueden impedir la reactivación del virus aunque contribuyan a su resolución.

Por lo que respecta a los determinantes de patogenicidad del virus, se sabe que el CMVH dispone de varios mecanismos para escapar del reconocimiento por parte de las células inmunitarias (Hengel *et al.*, 1998). Como a continuación se explica, estos mecanismos no sólo favorecen la perpetuación, y en ocasiones la progresión, de la propia infección por el CMVH, sino que además potencian la infección por otros microorganismos al provocar un estado de inmunodepresión fundamentalmente celular. En general, estos mecanismos interfieren en la presentación de antígenos tanto a células T CD4+ como CD8+ y protegen al virus de la acción de los anticuerpos dotados de actividad antiviral y de las células NK. Por ejemplo, los productos de los genes US3 y US2/US11, gp32/33 y gp24/gp33, bloquean selectivamente la presentación de antígenos restringida por moléculas de histocompatibilidad de clase I (HLA-I), el primero reteniendo complejos péptido-HLA I en el retículo endoplásmico

(Ahn *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1996) y el segundo favoreciendo la degradación de moléculas HLA I en el proteosoma (Wiertz *et al.*, 1996). El producto del ORF US6, gp21, bloquea la translocación de péptidos al interior del retículo endoplásmico (Lehrer *et al.*, 1997); se impide así la presentación de péptidos a las células T CD8+. El producto del gen US2 también es capaz de degradar varias proteínas que intervienen activamente en la presentación de antígenos restringida por moléculas HLA de clase II a células T CD4+ (Tomazin *et al.*, 1999). El producto del gen UL18 codifica una proteína homóloga a las moléculas HLA de clase I cuya función parece ser impedir el reconocimiento de las células infectadas por las células NK (Farrell *et al.*, 1997). El producto del gen UL33 actúa como un receptor para la fracción Fc de las inmunoglobulinas, se expresa en las células endoteliales y en los fibroblastos infectados y secuestra anticuerpos antivirales impidiendo de este modo su acción (MacCormac y Grundy, 1996).

Otro mecanismo de que dispone el CMVH para evadirse del control inmunitario del hospedador es la producción de proteínas que actúan como receptores para las quimioquinas RANTES y MIP-1. Se trata de las proteínas codificadas en los genes US28 y US27 (proteínas homólogas de receptores ligados a proteínas G). Por este mecanismo se consigue secuestrar a las quimioquinas en la superficie de las células infectadas evitando así su participación en el reclutamiento y concentración de células inmunitarias en el foco de infección (Hengel *et al.*, 1998). A tenor de lo anterior resulta difícil explicar cómo el sistema inmunitario es capaz de contener la infección por el CMVH disponiendo éste de tan variados modos de subvertir los mecanismos de defensa antiviral de aquél. Pues bien, es posible que no todos estos mecanismos sean operativos, y por tanto tengan relevancia, *in vivo*; por otra parte, parece que el sistema inmunitario es capaz de poner en marcha mecanismos compensatorios

destinados a minimizar el efecto de aquellos otros que permiten al CMVH evadirse (Reedhase, 2000).

Un hecho de gran trascendencia en la patogenia del CMVH es que puedan producirse reactivaciones, sintomáticas o no, en presencia de títulos altos de anticuerpos neutralizantes en las mucosas y en el suero. Este hecho podría estar relacionado con la capacidad de interacción del CMVH con proteínas presentes en las secreciones o en el plasma (fibrinógeno, β 2-microglobulina) (Grundy *et al.*, 1987) que protegerían al CMVH del efecto neutralizante de los anticuerpos específicos y con la producción por parte del huésped de anticuerpos bloqueantes que impedirían la unión de anticuerpos neutralizantes al CMVH (Speckner *et al.*, 1999).

Por otra parte, existen evidencias experimentales que sugieren la existencia de cepas de distinto tropismo y virulencia. En esta línea, se ha observado que algunos genotipos gB (Chou y Dennison, 1991) (cuyo análisis se efectúa mediante amplificación del gen gB y su posterior restricción con enzimas) del CMVH parecen asociarse con mayor frecuencia que otros al desarrollo de retinitis en el paciente con SIDA o, en general, a determinadas enfermedades orgánicas asociadas al CMVH en el paciente trasplantado; no obstante, hay investigadores que no encuentran esa asociación (Fries *et al.*, 1994; Bongarts *et al.*, 1996; Shepp *et al.*, 1996; Vogelberg *et al.*, 1996; Rasmussen *et al.*, 1997a; Torok-Storb *et al.*, 1997; Woo *et al.*, 1997; Meyer-König *et al.*, 1998; Peek *et al.*, 1998; Zipeto *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 1999). Igualmente se ha demostrado la existencia de cepas con distinta capacidad replicativa en el modelo experimental murino con inmunodeficiencia combinada (Brown *et al.*, 1995) en linfocitos (Einhorn y Öst, 1984) y en células hematopoyéticas (Simmons *et al.*, 1990). Ahora bien, se desconoce si estas variaciones en el tropismo y virulencia de distintas cepas en modelos experimentales tienen alguna relevancia en la infección natural en humanos.

1.7 Manifestaciones clínicas de la infección por el CMVH

1.7.1 En el paciente inmunocompetente

La primoinfección por el CMVH suele ser asintomática en el individuo con un funcionamiento normal del sistema inmunitario. El cuadro clínico más habitual de las primoinfecciones sintomáticas es el de un síndrome mononucleósico que es difícil de distinguir del que produce el virus de Epstein-Barr (Klemola y Kaarianien, 1965). Clínicamente aparece fiebre moderada o alta, adenopatías y en ocasiones esplenomegalia. No es infrecuente la aparición de un exantema maculopapular asociado o no al consumo previo de ampicilina. Los hallazgos analíticos acompañantes más frecuentes son: linfomonocitosis con abundantes linfocitos atípicos, elevación de las transaminasas, y la aparición ocasional de crioglobulinas o del factor reumatoide. Este cuadro puede asociarse con complicaciones clínicas más graves, aunque éstas pueden formar parte del cuadro clínico inicial: hepatitis granulomatosa con ictericia, neumonitis intersticial, síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalitis, miocarditis o anemia hemolítica asociada con trombocitopenia (Ho *et al.*, 1995). Las reactivaciones o reinfecciones en el individuo inmunocompetente son por lo general asintomáticas o cursan como un síndrome febril inespecífico (Ho *et al.*, 1995).

1.7.2 Infección congénita y perinatal

La infección intrauterina o congénita por el CMVH ocurre en un 0.5-2% de todas las gestaciones. Es menos frecuente que la infección perinatal y suele asociarse con una primoinfección materna en la primera mitad del embarazo (Alford y Britt, 1990). Sin embargo, menos de una cuarta parte de los niños infectados intrauterinamente desarrollan una infección sintomática, aunque ésta puede ser grave. En este último

caso cursa con hepatoesplenomegalia e ictericia, exantema petequiral, y afectación del sistema nervioso central con microcefalia, compromiso del oído interno, alteraciones motoras, coriorretinitis y microcalcificaciones cerebrales (Stagno *et al.*, 1977). Si la enfermedad se resuelve favorablemente suelen persistir secuelas en forma de retraso mental, pérdida de la capacidad de audición y afectación visual de intensidad y gravedad variables (Hanschaw *et al.*, 1976; Stagno *et al.*, 1977). En ocasiones, las secuelas son la forma de presentación de la infección congénita por el CMVH. La infección perinatal por el CMVH es más frecuente que la anterior aunque normalmente menos grave. La afectación multiorgánica y del sistema nervioso central de forma aislada son poco frecuentes. El neonato adquiere la infección al ponerse en contacto con secreciones cervicovaginales que contienen el virus o a través de la leche materna infectada. Clínicamente suele ser asintomática, si bien puede presentarse como un cuadro mononucleósico, o como una neumonitis intersticial de evolución insidiosa (Alford y Britt, 1990).

1.7.3 Infección en el paciente inmunocomprometido

La enfermedad por el CMVH es muy frecuente en el huésped inmunocomprometido y está ligada tanto a primoinfecciones, particularmente en el paciente sometido a trasplante de órganos sólidos, cuanto a infecciones secundarias (reactivación o reinfección). Sin embargo, la frecuencia de aparición y el espectro de las manifestaciones clínicas que se observan varían en función del tipo de inmunosupresión. Los pacientes sometidos a trasplante de órganos experimentan con gran frecuencia infecciones sintomáticas por el CMVH en relación con el tratamiento inmunosupresor que reciben, particularmente los sometidos a trasplante alogénico de médula ósea, trasplante hepático y de riñón (Ho, 1991). Por el contrario, en los

pacientes con enfermedades neoplásicas que reciben tratamiento inmunosupresor la morbilidad y la frecuencia de enfermedad por el CMVH son sustancialmente inferiores a la de los pacientes trasplantados (Ho, 1991). Sin duda, el SIDA es en la actualidad la enfermedad de base en la que se observa con mayor frecuencia la enfermedad por el CMVH en cuyo marco puede adquirir formas muy diversas. La enfermedad orgánica por el CMVH en el SIDA es tardía y suele afectar a enfermos con recuentos de células T CD4+ periféricas inferiores a 50/mm³ (Gallant *et al.*, 1992).

En general, las manifestaciones clínicas más frecuentes asociadas con la infección por el CMVH en los enfermos inmunodeprimidos son las siguientes:

1.7.3.1 Síndrome febril y leucotrombopenia

Se trata de un cuadro clínico relativamente frecuente aunque difícil de diagnosticar. Es particularmente frecuente en el paciente sometido a trasplante de médula ósea. Se define por la presencia de fiebre de 38°C continua o intermitente durante al menos 1 semana sin otra causa que lo justifique y la presencia de leucopenia, trombopenia y en ocasiones linfocitosis atípica (Ho, 1991).

1.7.3.2 Neumonitis

La neumonitis intersticial o alveolar es una entidad frecuente en el paciente sometido a trasplante de médula ósea y pulmón. Es menos frecuente en enfermos que reciben otros trasplantes y en el marco del SIDA. En estos últimos suele asociarse a la infección por *Pneumocystis carinii*. Clínicamente cursa con fiebre, disnea e hipoxia que puede ser severa. La mortalidad de esta infección en el paciente trasplantado es muy alta a pesar de la administración de ganciclovir (Ho, 1991). Radiológicamente suele

mostrarse como un patrón intersticial aunque también puede hacerlo como un patrón alveolar.

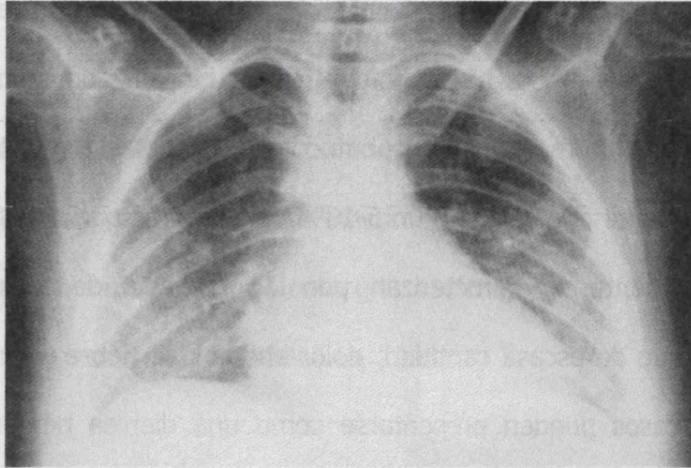


Figura 1.8. Neumonitis por Citomegalovirus. Infiltrado pulmonar bilateral de tipo intersticial.

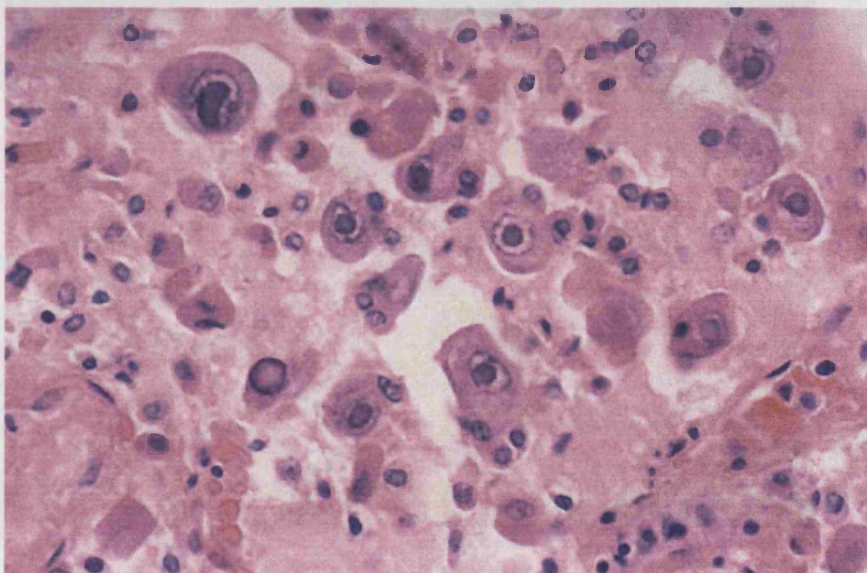


Figura 1.9. Biopsia de pulmón de un paciente con neumonitis por el CMV. Inclusiones típicas producidas por el CMVH.

1.7.3.3 Enfermedad gastrointestinal

Es particularmente frecuente en el marco del SIDA, aunque también se observa en los pacientes trasplantados. Puede afectarse cualquier tramo del tubo digestivo. La imagen endoscópica y la histopatología de la biopsia son comunes a todas ellas, observándose hemorragias en la submucosa y múltiples ulceraciones (Ho, 1995). El CMVH es el agente etiológico en un 5-10% de las colitis que afectan a los enfermos de SIDA. Clínicamente se caracterizan por la presencia de frecuentes deposiciones acuosas aunque de escasa cantidad, dolor abdominal, fiebre y en ocasiones tenesmo. En algunos casos pueden presentarse como una diarrea hemorrágica o como una perforación intestinal. La esofagitis por el CMVH en estos pacientes es menos frecuente que la que produce el VHS-1 de la que es clínicamente indistinguible (Ho, 1995).



Figura 1.10. Visión macroscópica de una úlcera cecal producida por el CMVH.

1.7.3.4 Enfermedad hepatobiliar

Las hepatitis por el CMV son frecuentes en los enfermos inmunodeprimidos, aunque son más "biológicas" que clínicas, cursando con una elevación de las transaminasas y siendo la hiperbilirrubinemia con ictericia poco habitual. Sin embargo en el trasplantado hepático puede adquirir una mayor gravedad ya que incluso puede conducir a un fallo funcional hepático. La afectación de las vías biliares no es común aunque se han descrito varios casos de colangitis esclerosante en pacientes con SIDA, colecistitis alitiásicas e incluso pancreatitis (Ho, 1995).

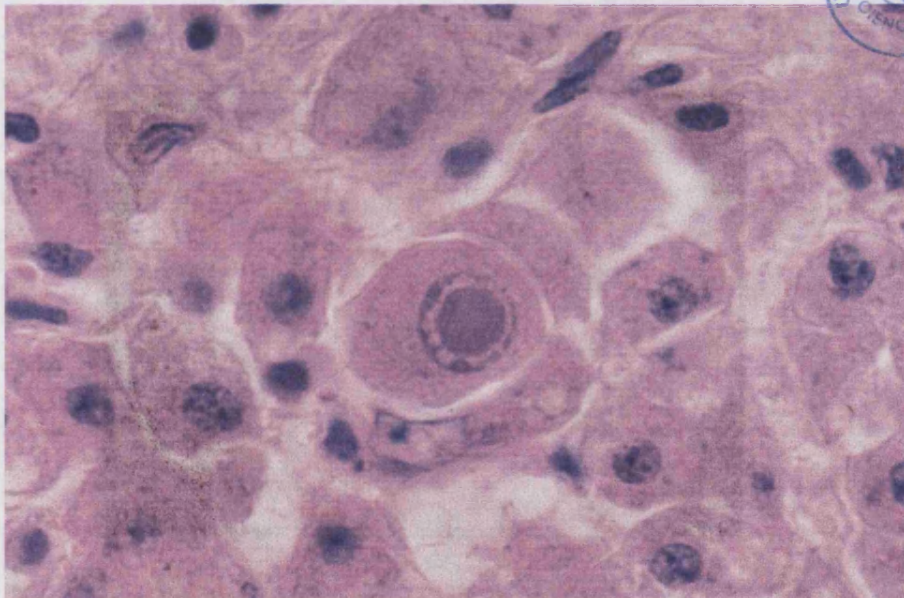


Figura 1.11. Imagen histológica de una hepatitis producida por el CMV.

1.7.3.5 Retinitis

La retinitis por el CMVH es una patología frecuente en estados de inmunodepresión grave. Puede afectar a enfermos trasplantados en cualquier momento tras el trasplante, aunque es más frecuente en enfermos de SIDA con recuentos de células T CD4+ inferiores a $50/\text{mm}^3$. Clínicamente se caracteriza por ser unilateral en su presentación; sin embargo, acaba siendo bilateral en la mayoría de los casos. Aunque puede ser asintomática y constituir un hallazgo de la autopsia, lo habitual es que curse con una pérdida progresiva de la visión, con deformidad de las imágenes y visión borrosa que frecuentemente conduce a la ceguera (Ho, 1995). El examen oftalmoscópico resulta esencial para su diagnóstico. En éste se observan lesiones granulares blanco-grisáceas asociadas a hemorragias más o menos extensas y a una perivasculitis.

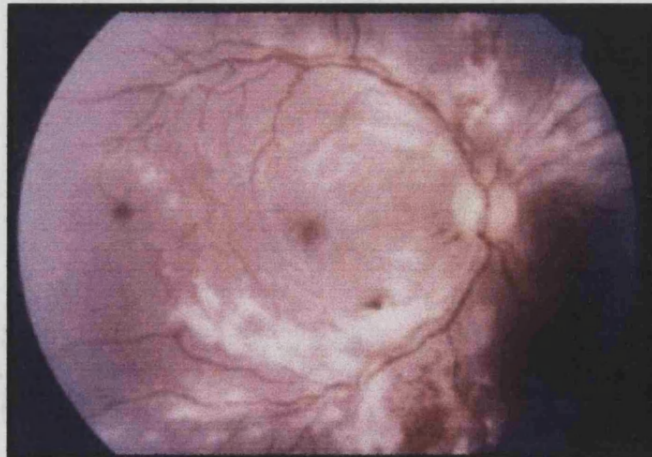


Figura 1.12. Imagen oftalmoscópica de una retinitis producida por el CMVH.

1.7.3.6 Enfermedad del Sistema Nervioso central y Periférico

La forma más grave de afectación del sistema nervioso central en pacientes inmunodeprimidos es la encefalitis, la cual suele acompañarse de necrosis ependimal periventricular. Hay otros cuadros neurológicos producidos por el CMVH, algunos de los cuales son más frecuentes que la propia encefalitis tales como mielitis, neuritis y polirradiculomielopatía subaguda ascendente (Ho, 1995).

1.7.3.7 Enfermedad glandular

La afección de las glándulas endocrinas ha sido observada en pacientes con SIDA como parte de una infección sistémica por el virus. La adrenalitis es el cuadro más frecuentemente encontrado, aunque otros como la ooforitis o la tiroiditis también han sido descritos (Ho, 1995).

1.8 El CMVH en el marco de la infección por el VIH-1

La mayoría de los individuos infectados con el virus VIH-1, particularmente los que se encuentran en el estadio de SIDA, lo están simultáneamente por el CMVH (Gallant *et al.*, 1992; Arrizabalaga *et al.*, 1994). En ellos el CMVH se replica persistentemente en diferentes órganos y tejidos sin generar daño ostensible, tanto más cuanto mayor es el deterioro del sistema inmunitario, y así, a medida que progresa la infección por el VIH-1, es cada vez más frecuente encontrarlo en algunas secreciones (saliva, exudado cervical y semen), diversos líquidos orgánicos (orina y fluido broncoalveolar) e incluso en la sangre periférica (células leucocitarias y plasma) precediendo esta última situación a la aparición de una enfermedad orgánica; de hecho existe una correlación significativa entre la cantidad de ADN viral en el plasma (también en el interior de los

leucocitos polimorfonucleares) y la probabilidad de que se desarrolle una enfermedad orgánica por el CMVH (Spector *et al.*, 1998; Spector *et al.*, 1999). No obstante, es curioso comprobar que, con independencia del grado de inmunosupresión individual, no en todos los pacientes infectados por el VIH-1 se desarrollan infecciones activas con viremia y no en todos los pacientes con SIDA avanzado se declara una enfermedad orgánica sintomática por el CMVH. Estos hechos sugieren que además de la inmunodepresión celular parece necesaria la intervención de otros factores que coadyuven en la génesis de la enfermedad invasiva por el CMVH. Podría aventurarse que uno de ellos es la calidad de la respuesta funcional de anticuerpos contra el CMVH, aunque por el momento no hay pruebas de ello; por otra parte podrían intervenir factores de índole genética: en ese sentido, Schrier *et al.*, (1994) afirman que los individuos con los haplotipos HLA A2B44, B51 y DR7 están predispuestos a desarrollar retinitis y enfermedad del S.N.C. por el CMVH en el marco del SIDA. En un estudio posterior esos mismos autores constatan que la particular predisposición a sufrir retinitis de los enfermos con los haplotipos mencionados se debe a su incapacidad para la presentación de determinados péptidos a las células T (Schrier *et al.*, 1995). Tampoco es descartable que haya cepas de CMVH con mayor tropismo por unos tejidos que por otros o incluso que haya cepas más virulentas que otras. Hay algunos indicios en este sentido (Fries *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995; Rasmussen *et al.*, 1997b; Meyer-Koning *et al.*, 1998) aunque este extremo no haya sido demostrado concluyentemente. Con anterioridad a la implantación de las nuevas terapias antirretrovirales de gran eficacia hasta un 40% de los pacientes con SIDA avanzado (recuentos de células T CD4+ inferiores a 100/mm³) desarrollaban una enfermedad orgánica por el CMVH clínicamente ostensible (Ho, 1995). En un 75-90% de los casos se afectaba la retina, uni o bilateralmente, en un 5-15% el tracto gastrointestinal, generalmente en forma de colitis, y en menos de un 5% la enfermedad afectaba al

sistema nervioso central, al pulmón o a las glándulas endo o exocrinas (Drew, 1992; Fuller, 1992; Ho, 1995). En la actualidad la morbilidad y la mortalidad por la enfermedad invasiva por el CMVH se han reducido considerablemente con la implantación de las combinaciones terapéuticas antirretrovirales de gran eficacia (Palella *et al.*, 1998). Este hecho ha sido vinculado con la recuperación funcional de la inmunidad específica contra el CMVH (Schrier *et al.*, 1996; Komanduri *et al.*, 1998) consecuencia del control farmacológico de la infección por el VIH-1. El efecto supresor de la replicación del CMVH asociado al uso de las combinaciones terapéuticas mencionadas parece incluso alcanzar a pacientes que ya han desarrollado una enfermedad orgánica. En efecto, MacDonald *et al.*, (1998) estudiaron prospectivamente a 11 pacientes afectados de retinitis por el CMVH en estado de inactividad a quienes administraron una combinación de gran eficacia antirretroviral al tiempo que retiraban el tratamiento de mantenimiento con ganciclovir; estos investigadores aseveran que en ninguno de los pacientes que respondieron satisfactoriamente a aquélla se reactivó la retinitis. Tural *et al.*, (1998) por su parte no observaron reactivación de retinitis uni o bilateral en 6 pacientes tratados con combinaciones antirretrovirales de gran eficacia a quienes se les había retirado el tratamiento supresor con ganciclovir oral. Contamos también con datos virológicos que sugieren que estas combinaciones terapéuticas mejoran ostensiblemente la disposición del sistema inmunitario para combatir la infección activa por el CMVH. Gerna *et al.*, (1998) aseguran que la prevalencia de ADNemia intraleucocitaria en 38 pacientes con recuentos de células T CD4+ inferiores a 50/mm³ tratados con combinaciones terapéuticas de gran eficacia disminuyó paralelamente a la reducción de la carga plasmática del VIH-1 y al aumento del número de células T CD4+ periféricas, hasta ser nula 36 semanas después de comenzar el tratamiento. Sólo uno de estos pacientes desarrolló una enfermedad orgánica sintomática por el CMVH. No obstante lo anterior,

la enfermedad orgánica por el CMVH sigue diagnosticándose en los pacientes que no responden a las mencionadas terapias. Del mismo modo se observan otras formas de enfermedad orgánica (que suelen afectar al globo ocular) cuya patogenia parece ligada a la recuperación inmunitaria de estos pacientes, esto es a la activación de linfocitos T CD8+ específicos frente al CMVH (Jacobson *et al.*, 1997; Cassoux *et al.*, 1999; Mitchell *et al.*, 1999).

El CMVH además de ser por sí mismo causa frecuente de morbilidad y mortalidad en el paciente infectado por el VIH-1 potencia a éste y con ello acelera la progresión del paciente seropositivo asintomático hacia el SIDA. Se sabe que las proteínas inmediato-precoces del CMVH, IE-1 e IE-2, transactivan independiente y sinérgicamente con la proteína del VIH-1 tat el promotor del LTR del VIH-1 amplificando la actividad transcripcional del genoma viral en la célula coinfectada (Skolnik *et al.*, 1988; Ghazal *et al.*, 1991; Dal Monte *et al.*, 1997). La proteína producto del ORF US28 del CMVH (estructuralmente relacionada con la familia de los receptores para las quimioquinas) facilita la entrada del VIH-1 en las células previamente infectadas por el CMVH (Pleskoff *et al.*, 1998). Por su parte el VIH-1 potencia la infección por el CMVH no sólo directamente al provocar el consumo de las células T CD4+, necesarias para mantener a éste en estado de latencia, sino también indirectamente, por ejemplo a través de la hiperproducción de IL-8 por parte de los monocitos debida a la estimulación de éstos por la gp120 (glucoproteína de superficie) libre del VIH-1 (Capobianchi *et al.*, 1997).

1.9 Diagnóstico de la infección por el CMVH

El diagnóstico microbiológico de la infección por el CMVH puede realizarse utilizando métodos directos o indirectos. Resulta más difícil, sin embargo, establecer de modo incontrovertible el diagnóstico de enfermedad orgánica, particularmente la secundaria

a reactivación viral en el paciente inmunocomprometido. Esto último debido a la persistencia indefinida del virus en el organismo tras la primoinfección, lo que hace que su detección no implique necesariamente la existencia de enfermedad.

1.9.1 Diagnóstico de la infección por el CMVH.

a. Observación en las muestras clínicas del efecto citopatógeno característico que produce el CMVH en las células infectadas. El diagnóstico citológico o histopatológico de la infección por el CMVH se basa en la observación de las llamadas células citomegálicas. Éstas pueden ser distinguidas fácilmente tras tinción de Giemsa de las muestras clínicas: se caracterizan por ser de gran tamaño (entre 2 a 4 veces el tamaño normal) y contener inclusiones intranucleares típicas (en ojos de "búho") y en ocasiones citoplasmáticas, las primeras rodeadas de un halo claro. Esta técnica es muy poco sensible por lo que su negatividad no excluye la existencia de una infección activa por el CMVH (Ho, 1991).

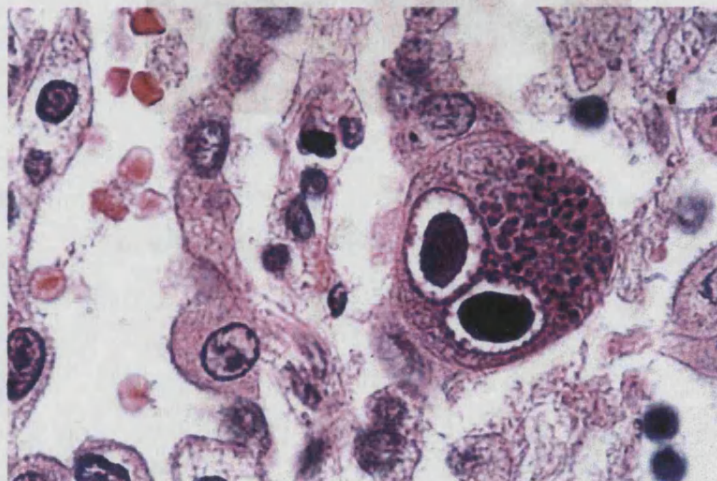


Figura 1.13. Célula citomegálica típica. Tinción de Giemsa.

Introducción

b. Técnicas que detectan en las muestras algún componente estructural del virus (proteínas o ácidos nucleicos).

b.1. Detección de proteínas víricas (IE1-72 Kd, pp150 o pp65) mediante inmunofluorescencia directa o técnicas de inmunoperoxidasa utilizando anticuerpos monoclonales (Alford y Britt, 1990). Estos procedimientos son rápidos, sencillos de realizar y muy específicos, aunque su sensibilidad es inferior a la del cultivo celular. Se utilizan habitualmente sobre material biopsico o autopsico, líquido cefalorraquídeo, lavado broncoalveolar o células de sangre periférica.

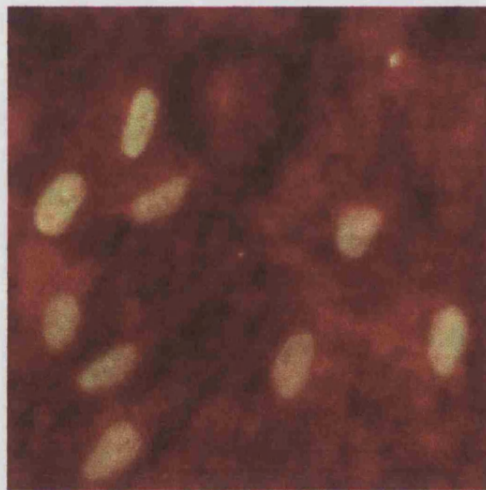


Figura 1.14. Detección de la proteína vírica IE1 mediante inmunofluorescencia directa en cultivos celulares infectados. Técnica del "shell-vial".

b.2. Detección de ácidos nucleicos. Las técnicas de hibridación con sondas específicas han sido utilizadas con éxito en el diagnóstico de la infección por el CMVH, particularmente la hibridación *in situ* sobre muestras tisulares, sin embargo el advenimiento de la PCR ha limitado su uso. La amplificación de ADN mediante PCR es

una técnica muy sensible y específica cuando se utilizan iniciadores complementarios a secuencias conservadas entre las diferentes cepas del CMVH, y puede ser realizada a partir de cualquier muestra clínica (Hsia *et al.*, 1989; Chou, 1990b). Sin embargo esta técnica no permite distinguir entre virus en estado replicativo y virus latente lo que supone un serio problema a la hora de llegar al diagnóstico de enfermedad orgánica como más adelante se discute. Este problema se ha intentado obviar realizando una amplificación cuantitativa del ADN del CMVH, entendiendo que a mayor cantidad de ADN presente en la muestra mayor probabilidad de que se trate de una infección replicativa que de una latente. La detección de ARN mensajero vírico mediante PCR reversa contribuye a resolver este problema puesto que su presencia supone actividad transcripcional en la célula infectada y muy probablemente actividad replicativa del virus (Gozlan *et al.*, 1993).

b.3. Técnicas que permiten recuperar el virus de las muestras. El cultivo celular sigue siendo la técnica diagnóstica de referencia. El CMVH puede recuperarse a partir de cualquier muestra clínica siempre que ésta sea correcta y rápidamente transportada al laboratorio. El CMVH suele cultivarse en fibroblastos humanos recientemente explantados (HFF), o en líneas celulares diploides procedentes de pulmón fetal (WI-38 o MRC-5) (Chou, 1990a). El efecto citopatógeno característico inducido por el CMVH puede observarse en pocos días o varias semanas (media de 2 semanas) dependiendo de la carga viral presente en la muestra procesada. La presencia del CMVH en el cultivo celular puede ponerse de manifiesto 24-48 horas después de la inoculación de la muestra mediante inmunofluorescencia directa utilizando anticuerpos monoclonales frente a la proteína IE1 (Figura 1.14) o tras amplificación del ADN o ARN viral mediante PCR. En sustitución del cultivo convencional, la mayoría de los laboratorios de microbiología utilizan una variante de éste conocida como cultivo-centrifugación o

"shell-vial" (Alpert *et al.*, 1985; Crawford *et al.*, 1988; Chou, 1990a). Esta técnica se basa en el efecto amplificador de la centrifugación a baja velocidad sobre la infectividad de los cultivos celulares por parte del virus presente en las muestras. Se utilizan para ello viales en cuya base reposa un cubreobjetos circular sobre el que se desarrolla una monocapa celular. La muestra se inocula y el vial es centrifugado a baja velocidad. Tras una incubación de 16-24 horas se extrae el cubreobjetos y se tiñe con anticuerpos monoclonales frente a la proteína IE-1 marcados con un enzima o con fluoresceína. Esta técnica es más sensible y de especificidad comparable a la del cultivo celular convencional (Chou, 1990a).

c. Demostración de la existencia de una respuesta específica de anticuerpos frente a proteínas inmunogénicas del virus. Se han descrito numerosas técnicas que permiten poner de la presencia de anticuerpos específicos frente al CMVH, las más utilizadas son el ELISA convencional, el ELISA de inmunocaptura (para la detección de IgM), la inmunofluorescencia indirecta y la aglutinación pasiva con partículas de látex. La serología es útil en el diagnóstico de la primoinfección por el virus en la que se demuestra la presencia de seroconversión o de IgM específicas, sin embargo no lo es tanto en las reactivaciones o reinfecciones por el CMVH, puesto que éstas pueden no acompañarse de una reaparición de IgM o de una elevación consistente en el título de anticuerpos IgG totales. Por otra parte la detección de IgM específica no garantiza la existencia de una primoinfección puesto que ésta puede persistir en suero durante algún tiempo tras el primer contacto con el virus o puede reaparecer en las reactivaciones (Chou, 1990a; Ho, 1995).

Tabla 1.2 Técnicas serológicas utilizadas para el diagnóstico indirecto de la infección por el CMVH.

Técnica	Ventajas	Inconvenientes
Fijación de complemento		Baja sensibilidad, no detecta los diferentes isotipos
Inmunofluorescencia indirecta	Sensible. Detecta isotipos	Falsos positivos IgG
Inmunofluorescencia indirecta anticomplementaria	Muy sensible Evita falsos positivos	Sólo detecta IgG
Aglutinación con partículas de latex	Sencillez, rapidez y sensibilidad	Fenómeno de prozona
Enzimoimmunoensayo IgG	Automatización y sensibilidad	
Enzimoimmunoensayo IgM indirecto	Automatización y sensibilidad	Es necesario absorber sueros positivos con factor reumatoide para evitar falsos positivos. Falsos negativos
Enzimoimmunoensayo IgM de captura	Automatización y sensibilidad	Discordancia con otros resultados

1.9.2 Diagnóstico de la enfermedad orgánica por el CMVH

Existen varios hechos relacionados con la propia biología del CMVH que dificultan el establecimiento de un diagnóstico incontrovertible de enfermedad orgánica por el CMVH. El más importante es la persistencia indefinida del virus en el organismo tras la primoinfección. Como antes se ha mencionado, el CMVH puede establecer una infección persistente de bajo nivel replicativo en las glándulas salivares, o en el aparato genitourinario, por lo que su aislamiento o detección a partir de la saliva, orina, semen o exudado del cérvix uterino no implica indefectiblemente la presencia de enfermedad. El CMVH, además, infecta latentemente determinados tipos celulares presentes en sangre periférica y en órganos como el pulmón, hígado o el bazo, en los cuales no es

descartable que también produzca una infección persistente, por lo que el cultivo del virus o la detección de ADN vírico en muestras procedentes de estas localizaciones no permite asegurar la existencia de enfermedad. Tomando en consideración estos hechos, puede afirmarse que la presencia de inclusiones intranucleares específicas del CMVH en biopsias del epitelio intestinal o de la retina, hígado, cerebro, glándulas endocrinas o pulmón constituye la evidencia más significativa de que el virus está causando o contribuyendo a causar patología en tales órganos (Ho, 1995); sin embargo, la ausencia de células con efecto citopático característico no permite descartar la enfermedad debido a la escasa sensibilidad de las técnicas citológicas. La detección de ARN mensajero viral o de proteínas precoces o tardías en células pertenecientes a estos órganos junto con el cultivo del virus a partir de tales muestras apoya, aunque no es concluyente, el diagnóstico de enfermedad por el CMVH. Por el contrario la detección cualitativa del ADN mediante hibridación o PCR en estas muestras posee por lo general poco valor diagnóstico (Ho, 1995). Quizá una excepción sea en el diagnóstico de la enfermedades del sistema nervioso central y periférico y de la retina en las que existe una correlación directa entre la detección de ADN del CMVH por PCR en el líquido cefalorraquídeo o en el humor vítreo y acuoso, respectivamente, y la existencia de enfermedad orgánica en esas localizaciones (Gozlan *et al.*, 1992; Wolf y Spector, 1992; Arribas *et al.*, 1995).

La presencia del CMVH en la sangre periférica es un buen marcador, aunque no incontrovertible, de infección diseminada, pero en particular lo es de riesgo inminente de afección orgánica, de hecho constituye un criterio de inicio de tratamiento en ciertos pacientes inmunodeprimidos; sin embargo es importante resaltar que el CMVH puede encontrarse en la sangre esporádicamente en ausencia de enfermedad orgánica. Este hallazgo es frecuente en los pacientes infectados por el VIH-1 (Gerna *et al.*, 1990). El cultivo del virus a partir de la capa leucocitaria (viremia) mediante cultivo

convencional o mediante "shell vial" es técnicamente exigente y menos sensible que otro procedimiento denominado prueba cuantitativa de la antigenemia (pp65). Esta última es una técnica de ejecución sencilla y detecta la presencia de la fosfoproteína de matriz (pp65) en las células leucocitarias de la sangre periférica mediante inmunofluorescencia o técnicas de inmunoperoxidasa empleando un anticuerpo monoclonal como revelador (Revello *et al.*, 1989; Pérez *et al.*, 1994). La presencia de más de 50 células fluorescentes (fluorescencia nuclear) en 2×10^5 leucocitos se asocia significativamente con la presencia de enfermedad visceral por el CMVH (Freymuth *et al.*, 1994).

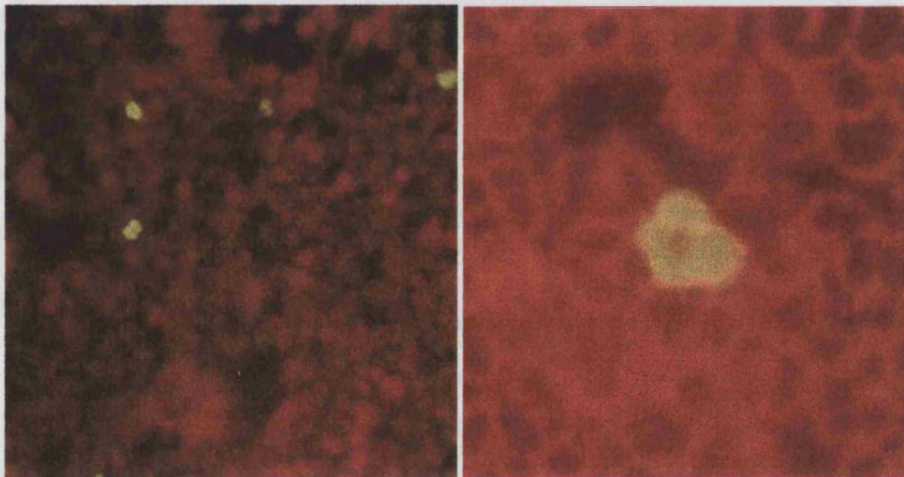


Figura 1.15. Antigenemia pp65 positiva (10X y 40X).

Como alternativa a esta prueba se han desarrollado otras que todavía se encuentran en fase de evaluación y cuya positividad se correlaciona estrechamente con la presencia de enfermedad orgánica por el CMVH; son: la ADNemia cuantitativa, que determina mediante PCR el número de copias de ADN vírico en las células leucocitarias

de sangre periférica (Shibata *et al.*, 1988; Jiwa *et al.*, 1989; Gerna *et al.*, 1991, 1992; Zippeto *et al.*, 1992), la ADNemia en suero o plasma que detecta cualitativamente la presencia de ADN vírico en suero mediante PCR (Brytting *et al.*, 1992; Spector *et al.*, 1992) y la ARNemia en leucocitos que detecta ARN mensajero de genes precoces o tardíos mediante PCR-inversa en leucocitos de sangre periférica (Gozlan *et al.*, 1993; Meyer-Konig *et al.*, 1995). En la actualidad existen varios métodos comercializados capaces de cuantificar el ADN del CMVH en los leucocitos de la sangre periférica mediante PCR convencional que utiliza controles internos (Amplicor, Roche), técnicas de amplificación de señal ("Branched DNA CMV 2.0, Chiron) o de captura de híbridos cuya evaluación está en marcha (Boivin *et al.*, 1998; Boom *et al.*, 1999; Pellegrin *et al.*, 1999). Concretamente, la presencia de enfermedad orgánica se correlaciona directamente con la presencia de un elevado número de copias de ADN viral en la sangre periférica; sin embargo el número de copias umbral no está definido con precisión (Bowen *et al.*, 1997; Shinkai *et al.*, 1997; Rasmussen *et al.*, 1997a; Spector *et al.*, 1998).

1.10 Tratamiento de la infección por el CMVH

Actualmente se dispone de fármacos muy activos frente al CMVH y que han mejorado sensiblemente el pronóstico de las infecciones graves producidas por este virus. Los más representativos son el ganciclovir y el foscarnet y los más recientes cidofovir y valganciclovir (Sia y Patel, 2000). El ganciclovir es un inhibidor competitivo de la ADN polimerasa viral, análogo nucleosídico estructuralmente emparentado con el aciclovir, 10-100 veces más activo frente al CMVH que éste. Las indicaciones de su uso en este momento son: tratamiento de las infecciones agudas graves producidas por el virus, tratamiento preventivo en individuos con elevado riesgo de desarrollar una infección

grave por el CMVH y el tratamiento de la enfermedad orgánica establecida. La eficacia de ganciclovir es variable en función de la patología de que se trate. Así, entre un 70-85% de los pacientes con SIDA y retinitis o afección gastrointestinal mejoran ostensiblemente tras pocas semanas de tratamiento (Ho, 1995); por el contrario las neumonitis, tanto en enfermos con SIDA como en los pacientes sometidos a trasplante de órganos, no responden siempre satisfactoriamente a esta terapia. Su efecto beneficioso como terapia de prevención se basa en su capacidad para suprimir la excreción de virus a través de las secreciones y la presencia del CMVH en la sangre (viremia). El ganciclovir se administra habitualmente por vía intravenosa y se elimina por vía renal, por lo que la dosis debe ajustarse a la función renal del enfermo. El ganciclovir es un fármaco potencialmente tóxico: el efecto secundario más grave es la neutropenia; ésta generalmente revierte tras suprimir el tratamiento. Actualmente se conoce que el uso prolongado de ganciclovir puede tener como consecuencia la selección de mutantes resistentes, por lo que debe restringirse su uso al tratamiento de infecciones graves por el CMVH. El foscarnet (fosfonoformato trisódico) es un inhibidor selectivo de las ADN polimerasas víricas y al mismo tiempo es capaz de inhibir la actividad de la transcriptasa inversa del VIH-1. El foscarnet se administra por vía intravenosa y es potencialmente nefrotóxico. Aunque no existe unanimidad al respecto, el foscarnet está indicado como tratamiento alternativo a ganciclovir en el tratamiento de infecciones agudas severas o de mantenimiento, particularmente en aquellos casos en los que se produzcan efectos adversos al ganciclovir o exista resistencia acreditada a dicho fármaco. El cidofovir es un nuevo análogo nucleósido que a diferencia de ganciclovir no necesita ser fosforilado por la kinasa vírica para ser activo. Se emplea en el tratamiento de la enfermedad por el CMVH en el marco del SIDA. El valganciclovir es un ester valina del ganciclovir. La mayor virtud de este fármaco es su biodisponibilidad.



1.11 Prevención de la infección y de la enfermedad orgánica producida por el CMVH

La prevención de la infección activa por el CMVH es un objetivo primordial en los pacientes trasplantados, los enfermos de SIDA y en las gestantes seronegativas. La utilización de sangre u órganos procedentes de individuos seronegativos elimina el riesgo del receptor de adquirir el CMVH. La administración de ganciclovir de forma preventiva ante la presencia de viremia (terapia "preemptive") se ha demostrado eficaz en reducir el riesgo de desarrollo de enfermedad visceral por el CMVH en los pacientes inmunodeprimidos ya infectados por el virus. Igualmente, la administración de gammaglobulina con alta actividad neutralizante frente al CMVH se ha mostrado eficaz en disminuir la incidencia y la severidad de la enfermedad orgánica por el CMVH en enfermos seronegativos sometidos a trasplante de médula ósea y de riñón (Ho, 1995). Por lo que respecta a la inmunoprofilaxis activa se dispone de una vacuna de virus atenuado (cepa Towne) que ha sido probada en individuos tanto seronegativos como en seropositivos con alto riesgo de sufrir una enfermedad sintomática por el CMVH. La eficacia de esta vacuna es parcial puesto que aminora la sintomatología de la primoinfección y reduce discretamente el riesgo de desarrollo de enfermedad en el paciente de alto riesgo pero no evita la instauración de una infección persistente por el virus o la reactivación de éste en individuos seropositivos. Por esta razón y por el riesgo que supone introducir un virus vivo como el CMVH en el organismo se trabaja actualmente en la optimización de una vacuna subunitaria utilizando como inmunógeno la gB viral y en un prototipo de vacuna ADN (Plotkin, 1999).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Grupos de estudio y muestras analizadas

2.1.1 Estudio transversal

En este estudio se ha analizado una única muestra de suero, y en su caso de sangre anticoagulada con EDTA, de 95 individuos distribuidos en cuatro grupos de población:

El grupo 1 incluyó a 19 personas sanas (grupo control), cuyas edades y sexos se muestran en la Tabla 2.1

Tabla 2.1 Características de los individuos del grupo 1 (control).

<i>Paciente n^o</i>	<i>Edad</i>	<i>Sexo</i>
1	19	V
2	28	V
3	31	H
4	34	H
5	35	H
6	40	H
7	30	V
8	25	H
9	30	V
10	25	H
11	26	H
12	30	V
13	32	V
14	25	H
15	26	V
16	26	H
17	27	V
18	32	V
19	26	H

El grupo 2 incluyó a 26 pacientes infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección. En la Tabla 2.2 se muestran la edad, sexo, factor de riesgo asociado con la infección por VIH-1 y el recuento de células T CD4+ en sangre periférica en el momento de la obtención de las muestras de suero de cada uno de ellos.

Tabla 2.2 Características de los pacientes VIH-1 asintomáticos.

Paciente nº	Edad	Sexo	T CD4+(cel/mm³)	Factor Riesgo
1	29	H	496	ADPV*
2	28	V	320	ADPV
3	29	V	400	ADPV
4	29	V	225	ADPV
5	29	V	350	ADPV
6	26	V	240	ADPV
7	21	H	653	ADPV
8	24	V	842	ADPV
9	24	H	625	ADPV
10	22	V	528	ADPV
11	17	V	427	ADPV
12	34	H	618	ADPV
13	31	H	468	ADPV
14	25	V	583	ADPV
15	25	V	758	ADPV
16	24	V	690	ADPV
17	30	H	362	Contacto Heterosexual
18	28	H	300	ADPV
19	30	V	330	ADPV
20	29	H	349	ADPV
21	26	H	567	ADPV
22	32	H	352	ADPV
23	30	H	585	ADPV
24	40	V	216	Contacto Heterosexual
25	29	V	384	ADPV
26	29	H	564	ADPV

*ADPV: Adicto a drogas por vía parenteral.

De acuerdo con las categorías clínicas del CDC (1993), 11 de estos 26 pacientes pertenecían al subgrupo A1 ($CD4+ >499/mm^3$) y 15 al subgrupo A2 ($CD4+$ entre 200-499/ mm^3).

El factor de riesgo vinculado con la adquisición de la infección por VIH-1 fue la adicción a drogas por vía parenteral (ADVP) en 24 de los 26 individuos, y en los dos restantes uno o varios contactos heterosexuales de alto riesgo. Ninguno de estos pacientes estaba siendo tratado con antirretrovirales en el momento en que se obtuvo la muestra.

El grupo 3 incluyó a 25 pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH. Las características más relevantes de estos pacientes se encuentran en la Tabla 2.3 entre las que se incluyen los recuentos de células T $CD4+$ en el momento de obtención de las muestras de suero.

Tabla 2.3. Características de los pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH.

<i>Paciente n°</i>	<i>Edad</i>	<i>Sexo</i>	<i>CD4+ cel/mm³</i>	<i>Factor de riesgo</i>
1	49	V	7	Contacto Homosexual
2	40	H	25	ADPV*
3	21	V	98	ADPV
4	34	V	80	ADPV
5	31	V	48	ADPV
6	30	V	66	Contacto Heterosexual
7	24	H	25	ADPV
8	46	V	40	ADPV
9	31	H	21	ADPV
10	34	H	40	ADPV
11	38	V	91	ADPV
12	28	V	48	ADPV
13	28	V	21	Contacto Heterosexual
14	36	H	6	ADPV
15	36	V	14	ADPV
16	31	V	54	ADPV
17	34	V	30	ADPV
18	31	V	27	ADPV
19	31	H	28	ADPV
20	30	V	43	ADPV
21	28	H	40	ADPV
22	41	V	15	ADPV
23	31	V	9	ADPV
24	35	V	22	ADPV
25	30	V	42	ADPV

*ADPV: Adicto a drogas por vía parenteral.

Los 25 pacientes pertenecían al grupo C3 de acuerdo con criterios del CDC (1993) ($CD4+ < 200/mm^3$). El factor de riesgo asociado fue la adicción a drogas por vía parenteral en 22 de ellos, y el antecedente de contactos heterosexuales u homosexuales de alto riesgo en 2 y 1 respectivamente. Todos estos pacientes estaban siendo tratados con Zidovudina en el momento en que se obtuvieron las muestras.

Los pacientes infectados por el VIH-1 de los grupos 2 y 3 fueron atendidos en el Hospital San Francisco de Borja de Gandía.

El grupo 4 incluyó a 25 pacientes con SIDA que desarrollaron una enfermedad orgánica por el CMVH. Los criterios diagnósticos de enfermedad orgánica fueron los siguientes:

El diagnóstico de retinitis se basó en la observación de exudados perivasculares y hemorragias retinianas características tras el examen oftalmoscópico.

La enfermedad gastrointestinal por el CMVH se diagnosticó por la demostración de las típicas inclusiones intranucleares que genera el CMVH en muestras biópsicas en ausencia del aislamiento y/o la detección de otros patógenos intestinales frecuentes en los pacientes con SIDA.

El diagnóstico de la encefalitis por el CMVH se basó en la detección de ADN del CMVH en el líquido cefalorraquídeo mediante PCR, o en la detección de efecto citopático en muestras cerebrales obtenidas en la necropsia. El diagnóstico de la polirradiculoneuritis asociada con el CMVH se diagnosticó con base en la sintomatología clínica y la

presencia de ADN del CMVH en el líquido cefalorraquídeo, cuya detección se realizó mediante PCR.

La adrenalitis se diagnosticó a través de la detección de efecto citopático en muestras tisulares de la corteza suprarrenal obtenidas durante la necropsia.

La neumonitis se diagnosticó por la presencia de inclusiones intranucleares características en biopsias pulmonares y la detección del ADN del CMVH mediante PCR en el lavado broncoalveolar.

Estos pacientes fueron atendidos y tratados en uno de los siguientes hospitales: Hospital San Francisco de Borja de Gandía, Hospital "La Fe" de Valencia y Hospital de la Princesa de Madrid. El factor de riesgo asociado fue la adicción a drogas por vía parenteral en 16 de ellos, contactos heterosexuales de alto riesgo en 6 y contactos homosexuales de riesgo en los 3 restantes. Las características más sobresalientes de estos pacientes se muestran en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Características de los pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH.

<i>Paciente n°</i>	<i>Edad</i>	<i>Sexo</i>	<i>CD4+ (cel/mm³)</i>	<i>Enfermedad orgánica</i>	<i>Factor de riesgo</i>
1	31	V	8	Retinitis/Colitis/Adrenalitis	ADPV*
2	36	V	8	Colitis	ADPV
3	30	V	12	Colitis	ADPV
4	31	H	15	Retinitis	ADPV
5	40	H	40	Retinitis	ADPV
6	30	H	10	Retinitis	ADPV
7	30	V	17	Retinitis	ADPV
8	25	V	4	Retinitis	Contacto heterosexual
9	33	H	10	Retinitis	ADPV
10	31	V	24	Retinitis	ADPV
11	40	H	37	Retinitis	Contacto heterosexual
12	37	V	4	Retinitis	ADPV
13	29	V	24	Colitis	ADPV
14	47	V	45	Retinitis/Encefalitis	Contacto heterosexual
15	32	V	1	Retinitis	ADPV
16	41	V	5	Retinitis/Colitis	Contacto bisexual
17	31	V	26	Retinitis/Encefalitis	ADPV
18	30	V	17	Retinitis/Colitis	ADPV
19	40	V	27	Retinitis	Contacto homosexual
20	41	V	10	Retinitis	ADPV
21	28	V	30	Retinitis/Polineuropatía	Contacto heterosexual
22	29	H	32	Polineuropatía	Contacto heterosexual
23	43	V	35	Retinitis/Colitis	Contacto homosexual
24	27	V	10	Retinitis	ADPV
25	29	H	14	Neumonitis	Contacto heterosexual

*ADPV: Adictos a drogas por vía parenteral.

Las muestras de suero se conservaron a -70°C hasta su uso. Antes de llevar a cabo los experimentos que se describen a continuación, los sueros fueron descomplementados por calentamiento a 56°C durante 30 min. Las muestras de sangre anticoagulada fueron procesadas tal y como se indica en los apartados correspondientes (pruebas de viremia y antigenemia).

2.1.2 Estudio longitudinal

En este estudio se analizaron muestras de suero, y en su caso de sangre periférica, obtenidas secuencialmente de 43 pacientes infectados por el VIH-1 distribuidos en cuatro grupos:

El grupo I incluyó a 6 pacientes con SIDA tratados exclusivamente con análogos nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa del VIH-1 que desarrollaron, durante el período de seguimiento, una enfermedad orgánica por el CMVH. En la Tabla 2.5 se muestran las características más relevantes de estos pacientes. Las cifras de células T CD4+ expuestas en la tabla corresponden a las del inicio del periodo de estudio.

Tabla 2.5 Características de los pacientes que desarrollaron enfermedad orgánica por el CMVH durante el estudio longitudinal (Grupo I).

<i>Paciente n^o</i>	<i>Edad</i>	<i>Sexo</i>	<i>T CD4+ (cel/mm³)</i>	<i>Enfermedad orgánica</i>
1	30	V	18	Colitis
2	30	V	41	Retinitis
3	35	V	12	Retinitis y colitis
4	31	H	40	Retinitis
5	28	V	10	Retinitis y colitis
6	40	H	25	Retinitis

El grupo II incluyó a 4 pacientes con SIDA tratados con análogos nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa que no desarrollaron enfermedad invasiva por el CMVH durante el período de seguimiento. Las características más relevantes de estos pacientes se muestran en la Tabla 2.6. Los recuentos de células T CD4+ mostrados en la tabla corresponden a los del comienzo del periodo de estudio.



Tabla 2.6 Características de los pacientes que no desarrollaron enfermedad orgánica por el CMVH dentro del estudio longitudinal (Grupo II).

<i>Paciente n^o</i>	<i>Edad</i>	<i>Sexo</i>	<i>T CD4+(cel/mm³)</i>
1	34	V	14
2	28	V	24
3	35	V	6
4	36	V	39

El grupo III incluyó a 20 pacientes con SIDA que recibieron un tratamiento de gran eficacia antirretroviral (dos análogos nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa y un inhibidor de la proteasa de VIH-1- saquinavir o ritonavir) durante el período de seguimiento. Las características más relevantes de estos pacientes se muestran en la Tabla 2.7. Las cifras de células T CD4+ mostradas en la tabla corresponden a las del inicio del periodo de seguimiento.

Tabla 2.7 Características de los pacientes con SIDA tratados con terapias antirretrovirales de gran eficacia que no desarrollaron enfermedad por el CMVH (Grupo III).

<i>Paciente n°</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>T CD4+ (cel/mm³)</i>
1	H	28	12
2	V	28	14
3	V	35	102
4	V	28	6
5	V	40	18
6	H	24	120
7	H	31	180
8	H	28	64
9	V	32	8
10	V	32	15
11	V	41	39
12	V	28	38
13	V	28	14
14	V	36	92
15	H	28	70
16	H	30	14
17	H	32	240
18	V	29	70
19	H	28	64
20	H	26	74

El grupo IV incluyó a 13 pacientes infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección que recibieron durante el período de seguimiento un tratamiento de gran eficacia antirretroviral. Las características de estos pacientes se muestran en la Tabla 2.8. Las cifras de células T CD4+ mostradas en la tabla corresponden a las del inicio del periodo de seguimiento.

Tabla 2.8 Características de los pacientes infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección y tratados con terapias antirretrovirales de gran eficacia (Grupo IV).

<i>Paciente n°</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>T CD4+ (cel/mm³)</i>
1	V	28	315
2	V	35	280
3	V	38	290
4	V	29	175
5	V	36	492
6	V	27	342
7	H	25	240
8	V	26	140
9	H	24	270
10	V	22	315
11	H	25	380
12	V	31	210
13	V	30	315

2.2 Células utilizadas en el estudio y su manejo

2.2.1 Fibroblastos humanos

Para la propagación *in vitro* del CMVH y la realización de los ensayos funcionales que a continuación se describen se utilizaron fibroblastos humanos (HFF-human foreskin fibroblasts y MRC-5). Estas células son diploides y permiten un número restringido de pases en cultivo.

Para el mantenimiento y crecimiento de estas células se utilizó el medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Life Technologies, UK) que contenía suero bovino fetal, a distintas concentraciones según el propósito, y las siguientes sustancias: penicilina G, estreptomina, anfotericina B, glutamina, aminoácidos no esenciales, bicarbonato sódico al 7.5%, y un tampón hepes. Para la preparación y uso de los anteriores componentes se procedió del siguiente modo:

Suero Bovino Fetal (SBF)

El suero bovino fetal (SBF) (Life Technologies, UK), fue incorporado a los medios a una concentración de un 15% cuando se precisaba el crecimiento rápido de las células o cuando el aspecto de éstas no era óptimo, de un 10% en los medios habituales de crecimiento y de un 2% en los medios de mantenimiento. Antes de ser utilizado, el SBF fue calentado a 56°C durante 30 minutos en un baño termostático con objeto de inactivar los factores del complemento. El SBF se conservó en alícuotas a -20°C.

Penicilina G – Estreptomina

Se utilizó como solución madre una preparación comercial de Life Technologies (UK) que contenía 5000 UI/ml de penicilina G y 5000 µg/ml de estreptomina. Las concentraciones finales de penicilina y estreptomina en el medio DMEM fueron respectivamente 50 UI/ml y 50 µg/ml (1 ml de la solución base por cada 100 ml de DMEM). La solución madre se conservó en alícuotas a -20°C.

Anfotericina B (Fungizona)

Se preparó una solución madre de anfotericina B (Fungizona-Squibb, Industria Farmacéutica S.A.) en agua destilada estéril a una concentración de 250 mg/ml, que fue conservada en alícuotas a -20°C. La concentración final de anfotericina B en el medio DMEM fue de 2,5 mg/ml (1 ml la solución madre por cada 100 ml de medio DMEM).

Glutamina

Se utilizó una solución madre comercial que contenía glutamina 200 mM (Life-Technologies, UK) y que fue conservada en alícuotas a -20°C. La concentración final de glutamina en el medio DMEM fue de 2 mM (1 ml de la solución base por cada 100 ml de medio DMEM).

Aminoácidos no esenciales

Se añadió 1 ml de la solución comercial (Life-Technologies, UK) por cada 100 ml de DMEM. La solución comercial fue mantenida en alícuotas a 4°C.

Tampón Bicarbonato

El tampón bicarbonato (Life Technologies, UK) fue empleado a una concentración del 7.5 %, para lo cual se añadió 1 ml del preparado comercial por cada 100 ml de medio DMEM. La solución comercial fue mantenida en alícuotas a 4°C.

Tampón HEPES

El ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanesulfónico (Life Technologies, UK) fue añadido a razón de 0,5 ml del preparado comercial por cada 100 ml de medio DMEM.

Las células HFF fueron mantenidas en frascos de poliestireno de 25, 80 ó 225 cm² (Nalge Nunc International) de superficie útil, según el propósito, o depositadas en placas de 24 o 96 pocillos (Nalge Nunc International), tal y como se explica posteriormente, para la realización de los ensayos biológicos llevados a cabo en este estudio. En todos los casos, las células fueron incubadas a 37°C en una estufa de CO₂ (5%). Cuando las células alcanzaban una confluencia próxima al 100% eran subcultivadas según se detalla más adelante.

2.2.2 Células de glioblastoma

La línea de células de glioblastoma U373 fue obtenida de la colección de la ATCC. La línea de células de glioblastoma que expresa constitutivamente la glucoproteína B (gB) del CMVH (línea UB373) nos fue suministrada por la Prof. Lenore Pereira (UCSF, USA).

El protocolo empleado para la construcción y selección de la línea UB373 ha sido descrito detalladamente con anterioridad (Tugizov *et al.*, 1994). En resumen, el gen de la gB del CMVH de la cepa AD169 fue clonado en el plásmido pRc/CMV (invitrogen) el cual contiene el promotor-multiplicador inmediato temprano (IE) del CMVH y el gen que codifica la neomicina fosfotransferasa, enzima que confiere resistencia a la neomicina. Los clones celulares que expresaban constitutivamente este plásmido fueron seleccionados, consiguientemente, en DMEM que contenía neomicina. Tras comprobar mediante inmunofluorescencia indirecta que expresaban la gB fueron expandidos en este medio selectivo.

Para el mantenimiento y propagación de las células U373 se utilizó DMEM que contenía un 10 % de SBF suplementado con los componentes enumerados anteriormente para el cultivo de los fibroblastos humanos.

Para el cultivo de la línea celular UB373 se añadió neomicina (Geneticina Life Technologies, UK) al medio anterior a una concentración de 400 µg/ml. La neomicina utilizada nos fue suministrada en dos presentaciones diferentes: geneticina líquida (50 mg/ml) y geneticina en polvo. Esta última fue disuelta en PBS (50 mg/ml) antes de ser usada.

Las células de las líneas U373 y UB373 fueron mantenidas en frascos de poliestireno de 25 ó 80 cm² de superficie útil, según el propósito, o dispuestas en placas de 24 o 96 pocillos tal y como se explica posteriormente, e incubadas a 37°C en una estufa con una atmósfera que contenía CO₂ al 5%. Cuando las células alcanzaban una confluencia próxima al 100% eran subcultivadas según se detalla más adelante.

2.2.3 Subcultivo de las células

Los pases de las células (subcultivos) se llevaron a cabo del siguiente modo: tras retirar el medio que cubría las células, utilizando para ello una pipeta estéril o mediante decantación, se procedió al lavado de éstas con PBS estéril. El PBS fue preparado de acuerdo con la siguiente composición:

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
NaCl	8 g
KCl	0.20 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g
Agua bidestilada	1 l

Tras ajustar el pH de la disolución a 7,2-7,4, el PBS fue esterilizado en el autoclave (120°C durante 20 minutos), fraccionado en alícuotas y conservado a temperatura ambiente.

Una vez decantado el PBS de los frascos, se añadió un volumen suficiente de una solución estéril de tripsina (preparada añadiendo 2,5 g de tripsina –Difco- a 1 l de PBS;

tras disolverse la tripsina, la solución fue esterilizada por filtración a través de una membrana porosa de 0.22 μm -Millipore- y después conservada en alícuotas a -20°C) que se dejó en contacto con la monocapa entre 1-3 minutos en el caso de las células HFF y entre 30 y 45 segundos en el caso de las líneas celulares U373 y UB373 con el fin de que las células se despegaran de la pared de los frascos.

Con el microscopio invertido se controló el proceso de tripsinización. Cuando las células comenzaron a desprenderse se eliminó la tripsina con una pipeta estéril o por decantación. Cuando las células se desprendieron (1 a 5 minutos después) se recogieron en un volumen de 5 ml de medio de DMEM. La suspensión celular fue homogeneizada, pipeteando varias veces, y depositada en un tubo cónico estéril que posteriormente fue centrifugado a 1200 r.p.m. durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento fue resuspendido en 10 ml de medio DMEM con un 10% de SBF. Esa suspensión de células se distribuyó en 2-4 frascos según el estado de las células y el número del pase cuando se trataba de células HFF, y se añadió a cada frasco un volumen suficiente de DMEM con un 10% de SBF. Los frascos se incubaron en una estufa de CO_2 a 37°C .

2.2.4 Preparación de placas para los ensayos biológicos

Se utilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 o de 24 pocillos (Nalge, Nunc International) dependiendo del ensayo biológico programado. En cada uno de los pocillos de estas placas se depositaron aproximadamente 100 (en las placas de 96 pocillos) o 1000 células (en las placas de 24 pocillos) de células HFF o de células U373 o U373B suspendidas en DMEM (150 μl en los pocillos de las placas de 96 pocillos y 300 μl en las de 24, según el caso). Estas células fueron subcultivadas en las placas a

partir de frascos de 80 cm² cuyas células fueron recogidas del mismo modo que se ha descrito con anterioridad en el epígrafe del subcultivo de células. Para depositar la cantidad adecuada de células en cada uno de los pocillos se determinó el número de células presentes en las suspensiones mediante un recuento en una cámara de Neubauer.

Para la realización de algunos de los ensayos biológicos programados en este estudio era necesario depositar en los pocillos, con anterioridad a la suspensión celular, cubreobjetos circulares, de tal forma que la monocapa celular se formara sobre éstos. Este proceso se llevó a cabo utilizando pinzas estériles.

Las placas fueron incubadas a 37°C en una estufa de CO₂ (5%) durante 24-48 horas, tras las cuales las monocapas presentaban una confluencia próxima al 100%, la necesaria para la realización de los ensayos biológicos a los que se aludirá más tarde.

2.2.5 Conservación de las células

Para la conservación de las células se partió de monocapas confluentes: tras retirar el medio que cubría a las células se procedió al lavado de éstas con PBS. Las monocapas fueron tratadas a continuación con tripsina tal y como se ha descrito anteriormente. Una vez desprendidas de la pared del frasco, las células fueron resuspendidas en medio DMEM y centrifugadas a 1200 r.p.m durante 5 minutos. Tras ser desechado el sobrenadante, el sedimento obtenido fue nuevamente suspendido en medio DMEM y vuelto a centrifugar en las mismas condiciones de antes. Este proceso de suspensión-centrifugado se repitió tres veces, tras el último de los cuales, el sedimento se resuspendió en 1,5 ml de SBF. Esa suspensión se repartió en 3 viales de congelación

previamente enfriados en hielo picado, y a cada vial le fue añadido un volumen de 0,5 ml de una solución que contenía un 90% de SBF y un 10% de DMSO (dimetilsulfóxido-Sigma Chemical CO.) estéril previamente atemperado a 4°C. Esta operación se llevó a cabo manteniendo los viales dentro del hielo picado durante el mayor tiempo posible. Los viales con las células fueron mantenidos durante 30 minutos en hielo picado rotándolos suavemente cada 10 minutos con objeto de mantener la suspensión celular lo más homogénea posible.

La congelación de las células se llevó a cabo de forma progresiva, para lo cual los viales se envolvieron en algodón y se colocaron en una caja de poliestireno en la que permanecieron a -70°C durante 24 horas. Al día siguiente, los viales fueron almacenados en los lugares previamente determinados para su conservación a largo plazo en un tanque de nitrógeno líquido (-120°C).

2.2.6 Descongelación de las células

Los viales que contenían las células conservadas en nitrógeno líquido fueron descongelados rápidamente en un baño termostatzado a 37°C. Las células recuperadas de los viales fueron resuspendidas en un volumen de 10 ml de medio DMEM con un 10% de SBF en un tubo cónico estéril que fue posteriormente centrifugado a 1200 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. El sedimento obtenido fue resuspendido en 10 ml de medio DMEM conteniendo SBF al 15%. Las células fueron depositadas en un frasco de cultivo de 25 cm² e incubadas a 37°C en una estufa de CO₂ (5%).

2.3 Virus

2.3.1 Cepa utilizada

La cepa del CMVH AD 169 fue la utilizada en este estudio. Esta cepa fue obtenida de la colección ATCC y amplificada *in vitro* según se detalla a continuación.

2.3.2 Propagación del virus

La cepa suministrada fue inoculada en frascos de poliestireno de 80 cm² que contenían monocapas de células HFF con una confluencia cercana al 100% de acuerdo con el siguiente protocolo:

En primer lugar, el medio del cultivo celular fue retirado, tras lo cual se procedió al lavado de la monocapa celular con PBS. Tras retirar el tampón de lavado, las células fueron inoculadas con la cepa del CMVH con una multiplicidad de infección (M.O.I) de 0,01 (una unidad infectiva por cada 100 células; con este inóculo se generan pocos viriones defectivos). La cepa inoculada había sido descongelada previamente y atemperada a 4°C. El virus se adsorbió durante una hora (en la estufa a 37°C, agitando los frascos suavemente cada 10 minutos, con el fin de distribuir homogéneamente el virus sobre la monocapa celular), posteriormente la monocapa infectada fue lavada con PBS estéril, tras lo cual los frascos fueron incubados en la estufa de CO₂ a 37°C con DMEM que contenía SBF al 2%. Cuando el efecto citopático alcanzaba al 90% de la monocapa celular se procedía a la recogida de los viriones.

2.3.3 Recogida y conservación del virus

Tras retirar el medio que cubría las células, éstas fueron lavadas con PBS estéril. Posteriormente se les añadió tripsina estéril, la cual se mantuvo en contacto con las células entre 1 y 3 minutos a temperatura ambiente. Cuando las células empezaban a retraerse se eliminaba la tripsina. Cuando las células se hubieron desprendido (1 a 5 minutos) se agregaron 2 ml de medio de cultivo para resuspenderlas. Esta suspensión fue homogeneizada (pipeteándola varias veces) y depositada en un tubo cónico estéril preparado al efecto, que fue posteriormente centrifugado a 1200 r.p.m. durante 5 minutos. Utilizando una pipeta estéril se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 0.5 ml de SBF. La suspensión obtenida fue sometida a tres ciclos consecutivos de congelación (-70°C) – descongelación (37°C en baño termostatzado) con objeto de lisar las células y recuperar la mayor cantidad de virus posible.

Posteriormente los lisados fueron colocados en viales de congelación a los cuales se les añadió una cantidad similar de SBF para obtener un volumen final de 1 ml. Estos viales fueron mantenidos a -70°C hasta su uso.

Para obtener preparaciones con gran densidad de partículas víricas se emplearon, en ocasiones, frascos de 225 cm².

2.3.4 Titulación de las preparaciones de virus

Con objeto de conocer la cantidad de virus presente en los stocks producidos se procedió a su titulación. Para ello se prepararon diluciones seriadas de la suspensión

vírica problema (de 10^{-1} a 10^{-9}) en tubos estériles que contenían medio DMEM con un 2% de SBF. Esas diluciones fueron inoculadas en pocillos de placas de 24 pocillos, los cuales contenían monocapas de células HFF crecidas sobre cubreobjetos circulares estériles.

Tras un periodo de adsorción de una hora, se procedió al lavado de las placas con medio DMEM con un 2% de SBF, y posteriormente se las incubó 24 horas a 37°C. Transcurrido el periodo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se procedió a fijar las monocapas con una mezcla de metanol y acetona a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente se llevó a cabo una inmunofluorescencia indirecta utilizando como anticuerpo un monoclonal contra la proteína IE1 del CMVH tal y como se detalla más adelante.

Se consideró que el título de la preparación (en unidades formadoras de placas –UFP- por ml) era igual al número de núcleos fluorescentes en el pocillo correspondiente a la máxima dilución de aquella multiplicado por el factor de dilución.

2.4 Procedimientos virológicos

2.4.1 Técnica rápida para la detección del CMVH en los leucocitos de sangre periférica (Viremia)

Para la detección de virus infeccioso en sangre (viremia) se inocularon shell vials (Vircell, SL) de células HFF con leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

Separación de leucocitos de sangre periférica

La sangre fue obtenida por punción venosa empleándose Heparina o EDTA como anticoagulantes. Para separar los leucocitos polimorfonucleares del resto de los componentes de la sangre se mezcló ésta con una solución de dextrano (al 6% en cloruro sódico 0,9 %) en una proporción aproximada de 4 partes de sangre (4,5 ml) por 1.3 partes de dextrano (1,5 ml) en un tubo estéril. Se incubó la mezcla a 37°C entre 30 y 45 minutos, tras lo cual se observaban dos fases claramente diferenciadas en el tubo: una superior de apariencia clara formada mayoritariamente por leucocitos polimorfonucleares, que fue recogida en un tubo estéril con la ayuda de una pipeta, y una fase inferior más oscura en la que se habían depositado los hematíes. La fracción recogida fue lavada con PBS (vol/vol) y centrifugada a 1200 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el sedimento fue resuspendido en 1 ml de medio de transporte para el CMVH preparado de acuerdo con la siguiente composición:

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
Sorbitol	500 g
Suero Bovino Fetal	50 ml
Bicarbonato sódico	20 ml
Fungizona	25 mg
Estreptomicina sulfato	200 mg
Penicilina G	100.000 unidades
Solución de Earle	Hasta completar 1 l

Inoculación de los shell vials

Tras ser retirado el medio de cultivo de los viales, éstos fueron inoculados con un volumen de 0,3 de la suspensión anterior y centrifugados posteriormente a 1000 r.p.m. durante 45 minutos, tras lo cual se les añadió 1 ml de medio DMEM con un 2% de SBF, incubándose a continuación a 37°C durante 24 horas en una estufa de CO₂.

Fijación y Preparación de las monocapas

Tras retirar el medio de cultivo de los viales, las monocapas fueron lavadas tres veces con 2 ml de PBS. Las células fueron después fijadas con acetona (1,5 ml) a 4°C durante 15 minutos, tras lo cual se procedió a extraer los cubreobjetos de los viales con la ayuda de unas pinzas. A continuación los cubreobjetos fueron pegados por su reverso a un portaobjetos para su posterior tinción.

Tinción Inmufluorescente

Los cubreobjetos fueron cubiertos con 100 µl de una solución que contenía un anticuerpo monoclonal específico frente a una proteína inmediato-precoz del CMVH (IE-1 72 KD) (Murine Monoclonal Anti-CMV IgG Bio-Whittaker) diluido en PBS en una proporción 1:1000 el cual se mantuvo en contacto con las monocapas celulares durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda. Posteriormente las monocapas fueron lavadas 3 veces con PBS, y más tarde se añadieron 100 µl de un conjugado Anti-IgG de ratón marcado con fluoresceína y que contenía Azul de Evans (al 0.2%) (Chemicon International Inc.) a cada preparación. El conjugado se mantuvo en contacto con la monocapa 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda. A continuación se lavaron las

monocapas 3 veces con PBS y se dejaron secar. Finalmente, a cada preparación se le añadió una gota de glicerina tamponada con azida de sodio al 0.1% (Chemicon International Inc.) y posteriormente un cubreobjetos. Las preparaciones fueron observadas en el microscopio de fluorescencia a 10X y a 40X. La observación de núcleos celulares fluorescentes reveló la presencia de virus infeccioso en la muestra (viremia positiva).

2.4.2 Detección de la proteína pp65 en los leucocitos polimorfonucleares de la sangre periférica (prueba de la Antigenemia pp65)

Para la detección de la proteína pp65 del CMVH en el interior de los leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica se procedió del siguiente modo:

Obtención de leucocitos polimorfonucleares

La sangre obtenida por punción venosa con heparina o EDTA como anticoagulante se mezcló con una solución de dextrano al 6% en cloruro sódico 0,9 %, en una proporción aproximada de 4 partes de sangre (4,5 ml) por 1.3 partes de dextrano (1,5 ml) en un tubo estéril.

La mezcla fue incubada entre 30 y 45 minutos a 37°C, tras lo cual se observaron 2 fases claramente diferenciadas en el tubo, se procedió entonces a recoger en un tubo la fase superior de apariencia clara con la ayuda de una pipeta estéril, evitando arrastrar la fase oscura inferior y el sedimento, en el que se habían depositado los hematíes. La fase superior estaba formada mayoritariamente por leucocitos polimorfonucleares. Esta

fracción fue recogida y a continuación lavada, para lo cual se colocó una parte de ella, aproximadamente 2-3 ml, en un tubo estéril de 5 ml al que se añadió un volumen similar de PBS. Posteriormente el tubo fue centrifugado a 1200 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue decantado y el sedimento se resuspendió en 4 ml de una solución de cloruro amónico al 0.8% (5 minutos) con objeto de lisar los hematíes presentes. A continuación el tubo fue centrifugado a 1200 r.p.m. durante 10 minutos, más tarde se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 3 ml de PBS.

Preparación de los portaobjetos

Con la ayuda de una cámara Neubauer se ajustó el número de células de la suspensión a una concentración de $1-2 \times 10^6$ células/ml tras lo cual se depositaron 200 μ l de ésta en un portaobjetos para lo que se empleó una citocentrífuga (900 r.p.m. durante 5 minutos). Tras secar la preparación a temperatura ambiente se procedió a su fijado, utilizando para ello una solución fijadora (durante 10 minutos) cuya composición se detalla a continuación:

<i>Solución Fijadora</i>	
Componente	Cantidad
Sacarosa	2 g
Formol	5 ml
PBS	hasta 100 ml

Posteriormente las preparaciones fueron lavadas con PBS y a continuación permeabilizadas (10 minutos) con la siguiente solución:

<i>Solución Permeabilizadora</i>	
<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
Sacarosa	50 g
Formol	5 ml
Nonident P-40	2,5 ml
PBS	Hasta 500 ml

Finalmente, las preparaciones fueron lavadas con PBS y dejadas secar a temperatura ambiente.

Tinción inmunofluorescente

Las preparaciones fueron cubiertas con 100 μ l de un anticuerpo monoclonal frente a la fosfoproteína pp65 del CMVH (Chemicon International Inc) y después incubadas a 37°C durante 30 minutos en una cámara húmeda. Tras ser lavadas 3 veces con PBS se les añadió un volumen de 100 μ l de un conjugado anti-ratón IgG (Chemicon International Inc) que contenía Azul de Evans al 0,02% y a continuación fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos en una cámara húmeda. Tras ser lavadas 3 veces con PBS, las preparaciones fueron sumergidas brevemente en una cubeta que contenía agua destilada o agua desionizada y posteriormente secadas con papel de filtro. Las preparaciones fueron montadas y observadas después en el microscopio de fluorescencia con los objetivos primero de 10X y más tarde de 40X. Se consideró que la prueba era positiva cuando se observaban células cuyos núcleos mostraban una fluorescencia específica.

2.4.3 Carga viral del VIH-1

Para la determinación de la carga viral del VIH-1 se utilizó el ensayo comercial AMPLICOR MONITOR (Roche Diagnostics). La secuencia diana de la amplificación tiene 142 bases y pertenece a una región muy conservada del gen *gag*. Este ensayo permite la detección de un mínimo de 200 (log <2,3) y un máximo de 750000 copias (log >5,9) de ARN del VIH-1 por ml de plasma. Para la realización de este método se procedió del siguiente modo:

Obtención del plasma de los pacientes

La sangre del enfermo se recogió en tubos estériles que contenían EDTA como anticoagulante. El plasma fue separado del resto de componentes de la sangre mediante centrifugación a 1.000 g durante 20 minutos; posteriormente el plasma se transfirió a un tubo estéril.

Extracción del ARN

Para la extracción del ARN contenido en las muestras de plasma se mezclaron 200 μ l del plasma problema con 600 μ l de tampón de lisis (previamente preparado y que contenía un patrón de cuantificación en cantidad conocida para cada lote y que sirve de testigo para los procesos de extracción y amplificación), la mezcla se mantuvo 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 725 μ l de Propanol-2 (Merck) y las muestras fueron centrifugadas a 13500 rpm. durante 15 minutos. Tras ser retirado el sobrenadante se añadió etanol frío al 70%, y se procedió a una segunda

centrifugación durante 5 minutos a 13000 rpm. con lo que se consiguió la precipitación del ARN.

Transcripción Inversa y Amplificación

El ARN obtenido fue disuelto en un tampón específico y 50 µl de la disolución se mezclaron en un tubo de PCR con 50 µl de una mezcla que contenía los dinucleótidos, los iniciadores biotinilados, la ADN polimerasa y acetato de manganeso.

El programa utilizado para el termociclador (GenAmp PCR System 9600, Perkin Elmer) fue el siguiente

<i>Acción</i>	<i>Tiempos y Temperaturas</i>
Constante	2 minutos a 50°C
Constante	30 minutos a 60°C
4 Ciclos	10 segundos a 95°C, 10 segundos a 55°C, 10 segundos a 72°C
6 Ciclos	10 segundos a 90°C, 10 segundos a 60°C, 10 segundos a 72°C
Constante	15 minutos a 72°C

Una vez finalizado el programa de amplificación se añadieron 100 µl de una solución de desnaturalización (NaOH) a cada tubo de PCR que contenía los amplicones obtenidos.

Hibridación y Detección

Para la hibridación fueron utilizadas microplacas que tenían los pocillos cubiertos con sondas oligonucleótidas para el VIH-1 y el patrón de cuantificación. Se añadieron 25 µl de los amplicones obtenidos a los pocillos de las microplacas que correspondían al HIV

tras lo cual se realizaron diluciones seriadas de cada uno de ellos, y se añadieron 25 μ l a los pocillos correspondientes al patrón de cuantificación. Tras incubar la placa durante una hora y ser lavarla posteriormente, se añadieron 100 μ l del conjugado de avidina peroxidasa y se incubó durante 15 minutos. La placa fue lavada, se le añadió el sustrato activo y fue finalmente incubada durante 10 minutos en oscuridad. Como último paso se añadieron 100 μ l de la solución de frenado y se paso a la lectura de las placas.

Para la lectura de las placas se determinó la densidad óptica a 450 nm y se realizaron los correspondientes cálculos matemáticos. Los resultados se informaron como número de copias de ARN del VIH-1 por ml de plasma.

2.5 Procedimientos inmunológicos

2.5.1 Recuento de células T CD4+

La cuantificación de los linfocitos T CD4+ se llevó a cabo por citometría de flujo empleando el anticuerpo monoclonal Leu-3 conjugado con fluoresceína (Becton-Dickinson, Sunnyvale, CA) en un analizador FACS-II (Becton- Dickinson)

2.5.2 Cuantificación de inmunoglobulinas totales en el suero

La concentración sérica de inmunoglobulinas de clase G fue determinada mediante un ensayo nefelométrico comercial (Behring Diagnostic, Germany). Las concentraciones entre 800 y 1000 mg/dl fueron consideradas normales.

2.5.3 Cuantificación de los anticuerpos IgG anti-CMVH (completo)

Los anticuerpos IgG totales frente al CMVH completo se cuantificaron mediante un inmunoensayo comercial de micropartículas (MEIA-IMX, Abbott Diagnostics, Germany). Los niveles de IgGs anti-CMVH se cuantificaron en UI (Unidades Internacionales)/ml.

2.5.4 Cuantificación de los anticuerpos IgG (totales) frente a la glucoproteína B (gB)

Los anticuerpos frente a la glucoproteína B (gB) del CMVH fueron cuantificados mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta utilizando como sustrato antigénico la línea celular UB373 que expresa la gB constitutivamente.

Los ensayos fueron realizados en placas de 24 pocillos que contenían cubreobjetos estériles en los que previamente había sido crecida una monocapa celular tal y como se ha descrito con anterioridad. A las 24 horas de incubación se obtuvieron monocapas crecidas sobre los cubreobjetos estériles que ya eran utilizables para la experimentación. Tras retirar el medio de cultivo de los pocillos, se añadió 1 ml de una mezcla fría de metanol y acetona (1:1) a cada pocillo que se mantuvo durante 15 minutos con objeto de fijar las células a los cubreobjetos; tras retirar la mezcla de fijación las células se lavaron 3 veces con PBS.

Paralelamente, los sueros problema fueron diluidos en PBS (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:640, 1:1280). Posteriormente, se añadieron 200 μ l de cada dilución de los sueros a los pocillos correspondientes, tras lo cual las placas fueron incubadas durante una hora a 37°C. Tras retirar las muestras, se procedió a lavar cada pocillo 3 veces con PBS. A

Material y Métodos

continuación se añadieron a cada pocillo 200 μ l de una dilución de un conjugado anti-IgG humano marcado con fluoresceína (Sanofi Diagnostics Pasteur) de acuerdo con la siguiente composición:

Componente	Cantidad
PBS	9.9 ml
Anti-IgG Total marcada	0.1 ml
Azul de Evans	1.0 ml

A continuación, las placas fueron incubadas durante una hora a 37°C. Finalmente las monocapas fueron lavadas tres veces con PBS. Con la ayuda de una aguja y unas pinzas se extrajeron los cubreobjetos del interior de los pocillos evitando en lo posible el deterioro de la monocapa celular. Los cubreobjetos se colocaron sobre portaobjetos en cuya superficie se habían depositado previamente 3 gotas de medio de montaje, a razón de 1 por cubreobjeto, de modo que las monocapas estuvieran en contacto con los portaobjetos. Finalmente, los portaobjetos montados fueron observados en el microscopio de fluorescencia a 400 aumentos (40X).

El título de anticuerpos séricos frente a la gB fue definido como la máxima dilución en que se observaba fluorescencia de localización específica (en el citoplasma y membrana nuclear con patrón punteado correspondiente a la localización de la proteína en el aparato de Golgi).

Como controles negativos de la reacción los sueros fueron incubados en paralelo con células de glioblastoma que no expresaban constitutivamente la gB. Asimismo se

utilizaron 5 sueros obtenidos de pacientes no infectados por el CMVH (ausencia de reactividad en inmunoensayos comerciales) como controles negativos adicionales.

2.5.5 Cuantificación de las subclases de anticuerpos IgG frente a la glucoproteína B (gB) del CMVH

La cuantificación de las subclases de IgG 1, 2, 3 y 4 frente a la gB se realizó mediante una inmunofluorescencia indirecta que se llevó a cabo como se ha descrito en el epígrafe 2.5.4 pero en lugar de utilizar un conjugado anti-IgG policlonal se emplearon conjugados específicos (anticuerpos monoclonales) de subclase (Sigma Chemical CO.), todos ellos marcados con fluoresceína. Las diluciones de uso de los distintos conjugados fueron las siguientes: IgG1 (1:300), IgG2 (1:64), IgG3 (1:100) e IgG4 (1:64).

2.5.6 Cuantificación de los anticuerpos que neutralizan al CMVH libre

La cuantificación de anticuerpos que neutralizan al CMVH libre en ausencia del sistema del complemento se llevó a cabo mediante un método rápido basado en la detección por inmunofluorescencia indirecta de la proteína IE en el núcleo de las células infectadas por el CMVH (Navarro *et al*, 1993).

Los ensayos de neutralización se realizaron en placas de 24 pocillos que contenían cubreobjetos sobre los cuales se había crecido con anterioridad una monocapa de células HFF como se ha detallado anteriormente. En algunos experimentos se utilizaron células de glioblastoma en vez de fibroblastos humanos. En primer lugar se realizaron diluciones (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:640) de los diferentes sueros problema en 150 μ l de medio DMEM con un 2% de SBF. De forma paralela se preparó una dilución del virus en

Material y Métodos

medio DMEM con un 2% de SBF, con una concentración del CMVH de aproximadamente 300 UFP/ml. Posteriormente se mezclaron 150 µl de la dilución correspondiente de suero y 150 µl de la suspensión viral, por lo que las diluciones finales de los sueros problema fueron 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:640 y 1:1280 y 50 UFP (aproximadamente) el inóculo de virus sometido a la acción neutralizante de los anticuerpos (por pocillo).

Las mezclas se incubaron durante una hora a 37°C; tras ese periodo fueron añadidas a los pocillos correspondientes y después las placas incubadas a 37°C durante 1 hora en estufa de CO₂. Posteriormente se realizaron 3 lavados consecutivos de las monocapas con medio DMEM con un al 2% de SBF y finalmente se añadieron a cada pocillo 300 µl de medio DMEM con un 2% de SBF y se incubaron las placas durante 48 horas a 37°C en estufa de CO₂.

Tras retirar el medio de cultivo de los pocillos las monocapas fueron tratadas con una mezcla fría de metanol y acetona (1:1) durante 15 minutos con objeto de fijarlas y posteriormente lavadas 3 veces con PBS.

Para la tinción inmunofluorescente se preparó una dilución 1:6000 del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CMVH IE-1 (Chemicon International Inc) en PBS. Se depositaron 120 µl de esa dilución en cada pocillo, tras lo cual las placas se incubaron durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda. Tras retirar el anticuerpo monoclonal, las monocapas fueron lavadas 3 veces con PBS. Finalmente se procedió a la extracción de los cubreobjetos con la ayuda de una aguja y unas pinzas, a su posterior fijación a la superficie de los portaobjetos preparados al efecto. Para revelar la reacción se añadieron a cada cubreobjetos 300 µl de un anticuerpo anti-IgG de ratón (Chemicon International Inc.) marcado con tioisocianato de fluoresceína en PBS con azul de Evans a

una dilución 1:1000. La reacción fue incubada durante 30 minutos en una cámara húmeda a 37°C. Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS y se montaron las preparaciones; éstas fueron más tarde observadas en el microscopio de fluorescencia con el objetivo 10X. Para el cálculo del título de anticuerpos neutralizantes se observaron al menos 20 campos microscópicos. En cada ensayo se incluyeron 2 pocillos que contenían únicamente virus y que constituían por lo tanto el control del experimento. El título de anticuerpos neutralizantes fue definido como la máxima dilución capaz de reducir en un 50% el número de núcleos fluorescentes en los pocillos en relación con los presentes en los pocillos de control de virus. Los experimentos de neutralización se llevaron a cabo por duplicado.

2.5.7 Cuantificación de los anticuerpos que neutralizan virus adsorbido a las células

Este ensayo fue realizado en placas de 24 pocillos que contenían cubreobjetos sobre los cuales se había hecho crecer con anterioridad una monocapa de células HFF, tal y como se ha descrito en el apartado 2.5.6. Antes de comenzar el ensayo, las placas se dispusieron sobre una base de hielo picado durante unos 20 minutos con objeto de que se enfriaran y así permitieran la adsorción del CMVH sobre las células pero no su penetración. Posteriormente las monocapas fueron inoculadas con 300 µl de una suspensión viral preparada en medio DMEM con un 2% de SBF que contenía 50 UFP (1 hora a 4°C). Después las monocapas fueron lavadas 3 veces con DMEM sin SBF.

Paralelamente se realizaron diluciones (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:640 y 1:1280) de los diferentes sueros problema en medio DMEM con un 2% de SBF. Las distintas diluciones de los sueros problema fueron añadidas a los pocillos correspondientes (200 µl

por pocillo). Finalmente las placas fueron incubadas 1 hora a 4°C. Transcurrido el periodo de incubación, las placas fueron lavadas con DMEM sin SBF. Finalmente se añadió DMEM con 2% de SBF a cada uno de los pocillos y las placas se incubaron 24 horas a 37°C en la estufa de CO₂. Posteriormente se procedió a la fijación de las monocapas y al revelado de la reacción mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta tal y como se ha descrito en el apartado anterior. El título de anticuerpos séricos neutralizante de virus adsorbido fue definido como la máxima dilución capaz de reducir en un 50% el número de núcleos fluorescentes en los pocillos en relación con los presentes en los pocillos del control de virus. Los experimentos de neutralización de virus adsorbido se llevaron a cabo por duplicado.

2.5.8 Cuantificación de los anticuerpos que inhiben el desarrollo de sincitios inducidos por el CMVH en células de glioblastoma

Para los ensayos de inhibición de la fusión inducida por el CMVH se emplearon placas de 96 pocillos en los que previamente se habían crecido monocapas de células de glioblastoma con una confluencia de un 70-80%.

Las monocapas fueron infectadas con 50 UFP del CMVH por pocillo en un volumen de 150 µl de DMEM con un 2 % de SBF. El virus fue adsorbido a las monocapas durante 1 hora a 37°C. Paralelamente se realizaron diluciones dobles seriadas de los sueros problema (1:10 a 1:1280) en 150 µl de DMEM con un 2% de SBF. Las diluciones fueron añadidas por duplicado a los pocillos correspondientes y las placas fueron incubadas a 37°C en una estufa con CO₂ (5%) durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo se eliminó el contenido de los pocillos y se añadió a cada uno de ellos 150 µl de la dilución de suero problema correspondiente preparada en ese mismo

momento. A los 5 días de la infección se procedió al lavado de los pocillos con medio DMEM con un 2% de SBF y después a la fijación de las monocapas con metanol frío al 70%. Una vez eliminado el metanol las monocapas fueron teñidas con colorante de Giemsa (Merck) 1:10 en agua destilada, durante 20-30 minutos. Tras lavar con agua destilada las placas fueron observadas en el microscopio invertido. En todos los experimentos se incluyeron al menos dos pocillos de control de virus sin suero y otros dos a los que se añadió un suero carente de anticuerpos anti-CMVH. El título de anticuerpos séricos inhibidores de la fusión celular inducida por el CMVH fue definido como la máxima dilución capaz de reducir en un 50% el número de sincitios presentes en los pocillos del control de virus, considerando como verdaderos sincitios a aquellos que al menos contenían 5 núcleos. Los experimentos de inhibición de la fusión inducida por el CMVH se llevaron a cabo por duplicado.

2.5.9 Cuantificación de los anticuerpos que bloquean la transmisión intercelular del CMVH (inhibición de la formación de placas)

Para la realización de este ensayo biológico se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos en cuya base se había hecho crecer con anterioridad una monocapa de células HFF.

Cada pocillo fue inoculado con 20-50 UFP (según el experimento programado) del CMVH en un volumen de 100 μ l de DMEM con SBF al 2%. El inóculo fue mantenido una hora en contacto con las monocapas. Tras una hora de incubación a 37°C, las placas fueron incubadas a 37°C en una estufa de CO₂ (5%) durante 18 horas.

Paralelamente se efectuaron diluciones seriadas (diluciones dobles desde 1:10 a 1:1260) de los sueros problema en medio DMEM con SBF al 2%. Se añadieron 100 μ l de cada una de las diluciones (en duplicado) a los pocillos correspondientes, y las placas fueron incubadas a 37°C en una estufa de CO₂ durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo se retiró el contenido de los pocillos, que fue renovado añadiendo nuevamente 100 μ l de los sueros problema diluidos en DMEM con un 2% de SBF. Las placas fueron incubadas otras 48 horas, y transcurrido este tiempo, el contenido de los pocillos fue renovado nuevamente. Finalmente las placas fueron incubadas otras 48-72 horas al cabo de las cuales los focos de infección (placas) generados por el CMVH en las monocapas ya eran visibles con el microscopio invertido.

Para conocer el título de anticuerpos séricos inhibidores de la formación de placas se procedió en primera instancia a determinar el número medio de células que constituían las placas en los pocillos de los controles (que contenían únicamente virus). El título de anticuerpos fue la máxima dilución capaz de reducir a la mitad el número de células que constituían las placas (reducción del 50% de su tamaño).

2.6 Métodos estadísticos

La comparación de las medianas de los títulos de anticuerpos y demás parámetros sometidos a estudio entre los distintos grupos de población se llevó a cabo utilizando el test de Mann-Whitney dada la distribución no paramétrica de los datos. Para efectuar los cálculos se utilizó el programa informático Instat (San Diego, CA). Este test compara estadísticamente la mediana de dos muestras independientes (grupos). Los valores de $P = <0,05$ son considerados como estadísticamente significativos. La correlación entre los valores de los rangos de los diferentes parámetros se calculó

utilizando el test de Spearman (Rank test) también por medio del programa informático Instat. Las correlaciones fueron consideradas óptimas si $r = > 0,5$.

3. OBJETIVOS

Las infecciones activas por el CMVH son más frecuentes en el paciente infectado por el VIH-1, incluso en el estadio asintomático de la infección, que en el individuo sano. Se desconoce si ese hecho se debe, al menos en parte, a que los pacientes infectados por el VIH-1 generan una respuesta de anticuerpos con función antiviral contra el CMVH cuantitativamente deficitaria o cualitativamente anormal en comparación con la que desarrollan los individuos inmunocompetentes.

Los pacientes con SIDA y cifras de linfocitos T CD4+ periféricos inferiores a 50/mm³ presentan un riesgo elevado de desarrollar una enfermedad orgánica por el CMVH; sin embargo, ésta no se objetiva en todos los pacientes con SIDA en el estadio terminal. Se desconoce si en la patogénesis de la enfermedad invasiva por el CMVH en el marco del SIDA se encuentran implicados factores predisponentes de índole distinta de la inmunosupresión celular inherente al progreso de la infección por el VIH-1 relacionados con la respuesta inmunitaria de anticuerpos funcionales contra el virus; en este sentido es posible que los pacientes con SIDA que desarrollan una enfermedad orgánica por el CMVH generen una respuesta deficitaria de anticuerpos funcionales anti-CMVH en comparación con la de los pacientes en los que aquélla no se presenta.

La incidencia de la enfermedad orgánica por el CMVH en los pacientes con SIDA ha disminuido notablemente como consecuencia de la prescripción de las denominadas combinaciones terapéuticas antirretrovirales de gran eficacia ("TAGE"), presumiblemente porque con ellas se consigue restituir, al menos parcialmente, la capacidad del sistema inmunitario celular para combatir las infecciones por los microorganismos oportunistas, entre ellos el CMVH. Nada se sabe, sin embargo, del efecto de estas terapias sobre la inmunidad humoral frente al CMVH.

Objetivos

Son anticuerpos con acreditada función anti-CMVH los que reconocen la glucoproteína B (gB) del virus y los que son capaces de neutralizar la infección por el virus en ausencia del complemento. Creemos que además de los anteriores, los anticuerpos que inhiben la transmisión intercelular del CMVH son también funcionales *in vivo*.

Con base en lo anterior, los objetivos del presente estudio son los siguientes:

1. Determinar si los pacientes infectados por el VIH-1 generan una respuesta de anticuerpos contra el CMVH anormal en relación con la de los individuos inmunocompetentes; se analizará cuantitativa y cualitativamente la respuesta de anticuerpos funcionales contra el CMVH en el paciente infectado por el virus VIH-1, tanto en el que se encuentra en el estadio asintomático de la infección cuanto en el que ya ha desarrollado el SIDA, la cual será comparada con la de un grupo de individuos inmunocompetentes (controles).

El análisis cuantitativo consistirá en lo siguiente:

1.1 Cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos IgG (totales) frente al CMVH completo mediante un inmunoensayo comercial.

1.2 Cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos IgG (totales) frente a la glucoproteína B (gB) del CMVH mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta.

1.3 Cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos que neutralizan el CMVH en ausencia del complemento mediante un ensayo rápido de neutralización.

1.4 Cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos que impiden la transmisión intercelular del CMVH mediante un ensayo de bloqueo de formación de placas en monocapas de células HFF.

El análisis cualitativo consistirá en practicar las siguientes determinaciones:

1.5 Análisis de la respuesta isotípica de anticuerpos de clase IgG frente a la glucoproteína B (gB) del CMVH; esto es, la cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos de los isotipos IgG1, 2, 3 y 4 frente a la gB mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta.

1.6 Caracterización funcional de la respuesta de anticuerpos neutralizantes anti-CMVH a través de la cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos capaces de neutralizar al CMVH impidiendo específicamente el proceso de penetración viral mediante un ensayo de neutralización postadsorción y otro de inhibición de la fusión inducida por el CMVH en células de glioblastoma.

2. Averiguar si los pacientes con SIDA que desarrollan una enfermedad orgánica por el CMVH presentan una respuesta de anticuerpos funcionales anti-CMVH deficiente en comparación con la de quienes teniendo un grado comparable de inmunodepresión no lo hacen. Con ese fin se realizarán un estudio transversal y otro longitudinal en los que se practicarán a cada individuo las siguientes determinaciones:

2.1 Cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos IgG totales contra la gB.

Objetivos

2.2 Cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos que neutralizan el CMVH en ausencia del complemento.

2.3 Cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos que bloquean la transmisión intercelular del CMVH.

3. Investigar el efecto de las combinaciones terapéuticas antirretrovirales de gran eficacia sobre la respuesta de anticuerpos funcionales anti-CMVH. Con ese fin, se cuantificarán periódicamente los niveles séricos de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes en ausencia de complemento en pacientes VIH-1 asintomáticos y en el estadio de SIDA que responden a las terapias combinadas de elevada eficacia antirretroviral (reducción significativa de la carga viral plasmática del VIH-1 y recuperación del número de células T CD4+ periféricas), los cuales serán comparados con los niveles medidos en un grupo de pacientes en el que aquéllas fracasan.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización de la respuesta de anticuerpos funcionales frente al CMVH en pacientes infectados por el VIH-1

El objeto de la primera parte de este estudio fue caracterizar cuantitativa y cualitativamente la respuesta de anticuerpos funcionales frente al CMVH en un grupo de pacientes infectados por el VIH-1 en distintos estadios evolutivos de la infección y compararla con la de un grupo control constituido por individuos inmunocompetentes. En esta fase del estudio se analizó un total de 70 sueros pertenecientes a 26 individuos infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección, 25 pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica aparente debida al CMVH y 19 individuos sanos (control).

4.1.1 Anticuerpos IgG frente al CMVH (virus completo)

En primera instancia se cuantificó la respuesta de anticuerpos de la clase IgG (policlonal) frente al CMVH (virus completo) mediante un enzimoanálisis (ELISA) comercial. Conviene resaltar que los anticuerpos cuantificados mediante este procedimiento reconocen tanto las proteínas de la membrana que envuelve al virus cuanto las fosfoproteínas del tegumento, éstas en particular, y otras proteínas estructurales de la cápside vírica.

Los resultados de estos experimentos se muestran en las Tablas 4.1 a 4.3.

Tabla 4.1 Anticuerpos IgG séricos frente al CMVH (virus completo) en los individuos del grupo control.

<i>Paciente n°</i>	<i>UI/ml*</i>
1	220
2	180
3	16
4	17
5	250
6	204
7	16
8	182
9	0
10	250
11	250
12	15
13	250
14	15
15	160
16	180
17	15
18	16
19	15

***UI = Unidades Internacionales.**

Tabla 4.2 Anticuerpos IgG séricos frente al CMVH (virus completo) en los individuos infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección.

<i>Paciente n^o</i>	<i>UI/ml*</i>
1	59
2	250
3	73
4	92
5	138
6	89
7	250
8	250
9	105
10	85
11	86
12	96
13	250
14	95
15	115
16	250
17	97
18	250
19	218
20	236
21	145
22	250
23	216
24	250
25	250
26	97

***UI = Unidades Internacionales.**

Tabla 4.3 Anticuerpos IgG séricos frente al CMVH (virus completo) en los individuos infectados por el VIH-1 en el estadio del SIDA (sin enfermedad orgánica por el CMVH).

<i>Paciente n°</i>	<i>UI/ml*</i>
1	250
2	250
3	80
4	250
5	250
6	113
7	250
8	250
9	250
10	250
11	125
12	62
13	250
14	63
15	250
16	250
17	71
18	18
19	250
20	250
21	250
22	250
23	250
24	250
25	250

***UI = Unidades Internacionales.**

La absorbancia de algunos sueros excedió el límite superior de cuantificación del sistema. En esos casos no se realizaron diluciones para determinar con precisión la

cantidad de anticuerpos presentes sino que, a efectos del análisis estadístico a que se sometieron los datos, se les asignó el valor de 250 UI/ml.

Los niveles séricos de anticuerpos IgG anti-CMVH (virus completo) en la población infectada por el VIH-1, especialmente en el grupo de los pacientes con SIDA, fueron mayores que en los individuos del grupo control; sin embargo, sólo la diferencia registrada entre el grupo de pacientes con SIDA y el de individuos control alcanzó significación estadística. En la Figura 4.1 se muestran en conjunto los niveles séricos de anticuerpos IgG frente al CMVH completo de los distintos individuos estudiados y en la Tabla 4.4 se muestran los resultados del análisis estadístico de las comparaciones entre los distintos grupos.

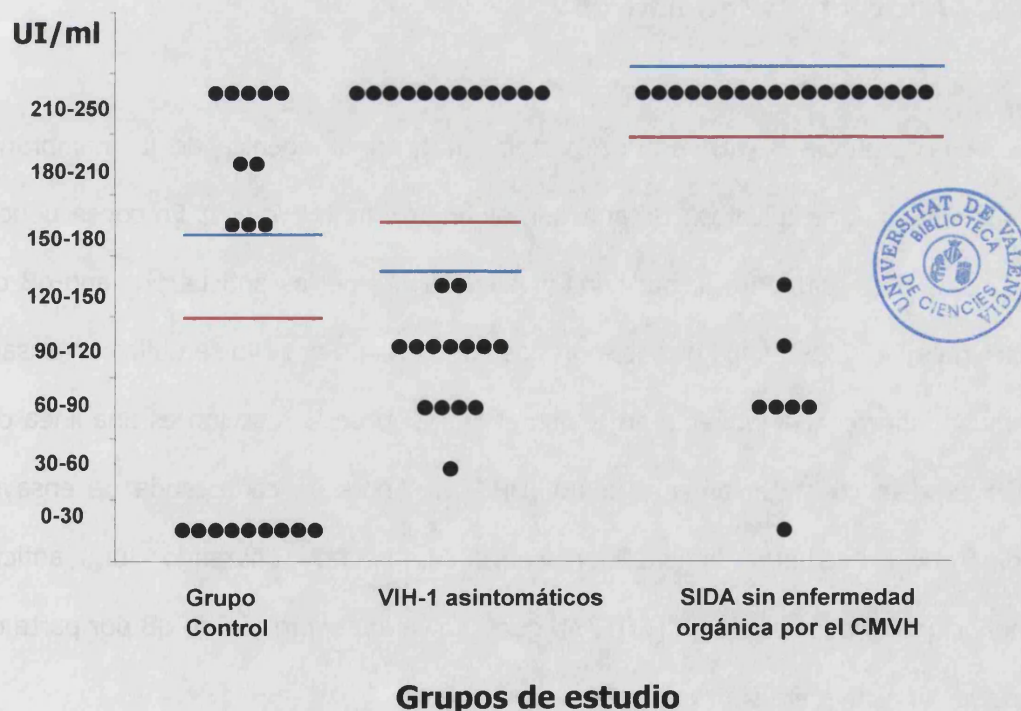


Figura 4.1 Niveles séricos de anticuerpos IgG anti-CMVH (virus completo) medidos mediante ELISA de los distintos individuos objeto de estudio. La barra horizontal de color azul se corresponde con la mediana y la de color rojo con la media aritmética.

Tabla 4.4 Análisis estadístico de la comparación de los niveles séricos de anticuerpos IgG frente al CMVH (virus completo) entre los distintos grupos de estudio.

Grupos comparados	Valor de P
SIDA sin enfermedad por el CMVH/VIH-1 asintomáticos	0.0878
SIDA sin enfermedad por el CMVH/Inmunocompetentes	0.0018
VIH-1 asintomáticos/Inmunocompetentes	0.0863

Significativo estadísticamente si $P < 0.05$.

Es relevante mencionar que no se observó una correlación significativa ($P = > 0.5$) entre los niveles de anticuerpos IgG frente al CMVH medidos por ELISA y los recuentos de células T CD4+ en los pacientes infectados por el VIH-1 (tanto en el estadio asintomático de la infección como en el del SIDA.)

4.1.2 Anticuerpos IgG anti-gB

La glucoproteína B (gB) es una proteína muy inmunogénica de la membrana del CMVH que induce la síntesis de anticuerpos neutralizantes *in vivo*. En consecuencia, se procedió posteriormente a medir los niveles séricos de los anticuerpos anti-gB de los pacientes incluidos en los distintos grupos de estudio. Para ello se utilizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta en el que el antígeno de la reacción es una línea celular que expresa constitutivamente la gB (UB3T3). Antes de cada tanda de ensayos se comprobó mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando un anticuerpo monoclonal específico de gB (CH177), que el nivel de expresión de gB por parte de las células en cultivo era suficiente.

Se constató la especificidad de este ensayo al observar la ausencia de reacción (fluorescencia) de 3 sueros (control) pertenecientes a otros tantos pacientes no infectados por el CMVH (sueros que no reaccionaron en el ELISA comercial que detecta

anticuerpos contra el CMVH completo) y al comprobar que ninguno de los sueros que reaccionaban con las células que expresaban la gB lo hacían con las células de glioblastoma parentales las cuales no expresaban la glucoproteína viral.

En la Figura. 4.2 se muestra una reacción de inmunofluorescencia positiva. El patrón de fluorescencia que se observa es mixto: citoplasmático/perinuclear (tipo Golgi-Retículo endoplásmico rugoso) y de membrana.

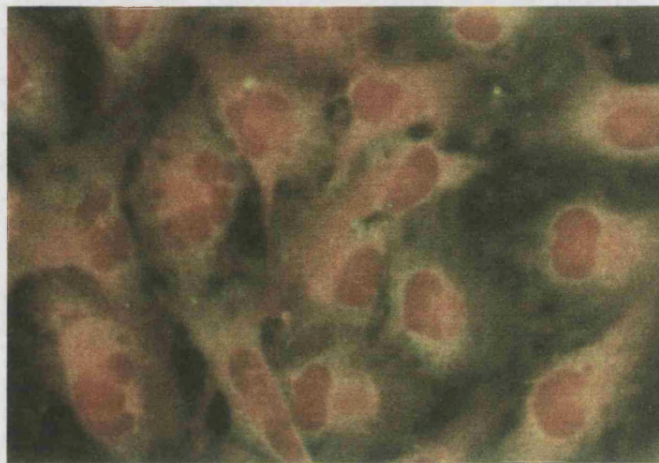


Figura 4.2 Ensayo de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos anti-gB. Reacción positiva.

En la Figura 4.3 se muestra la ausencia de fluorescencia específica observada cuando se utilizó un suero que carecía de anticuerpos anti-gB (control).



Figura 4.3 Ensayo de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos anti-gB. Reacción negativa.

Resultados

En las Tablas 4.5 a 4.7 se muestran los títulos de anticuerpos anti-gB medidos en los sueros problema de los tres grupos de estudio.

Tabla 4.5 Títulos de anticuerpos séricos anti-gB en los individuos del grupo control.

<i>Paciente n^o</i>	<i>Inversa del título</i>
1	80
2	160
3	160
4	40
5	80
6	80
7	80
8	160
9	20
10	80
11	160
12	80
13	160
14	40
15	80
16	40
17	20
18	40
19	40

Tabla 4.6 Títulos de anticuerpos séricos anti-gB en los individuos infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección.

<i>Paciente n°</i>	<i>Inversa del título</i>
1	160
2	160
3	80
4	40
5	160
6	80
7	80
8	160
9	40
10	160
11	40
12	40
13	320
14	80
15	160
16	40
17	160
18	160
19	80
20	320
21	160
22	320
23	640
24	1280
25	160
26	320

Tabla 4.7 Títulos de anticuerpos séricos anti-gB en los pacientes con SIDA (sin enfermedad orgánica debida al CMVH).

<i>Paciente nº</i>	<i>Inversa del título</i>
1	640
2	1280
3	160
4	80
5	640
6	320
7	640
8	640
9	160
10	320
11	80
12	160
13	160
14	160
15	160
16	320
17	320
18	160
19	320
20	320
21	160
22	320
23	160
24	320
25	320

Se observó una correlación estadísticamente significativa ($r = 0.4073$; $P = 0.00046$; Intervalo de Confianza (IC) 95% 0.070-0.238) entre los títulos de los anticuerpos séricos anti-gB y los niveles séricos de anticuerpos anti-CMVH completo medidos mediante el ELISA comercial al que se ha aludido anteriormente.

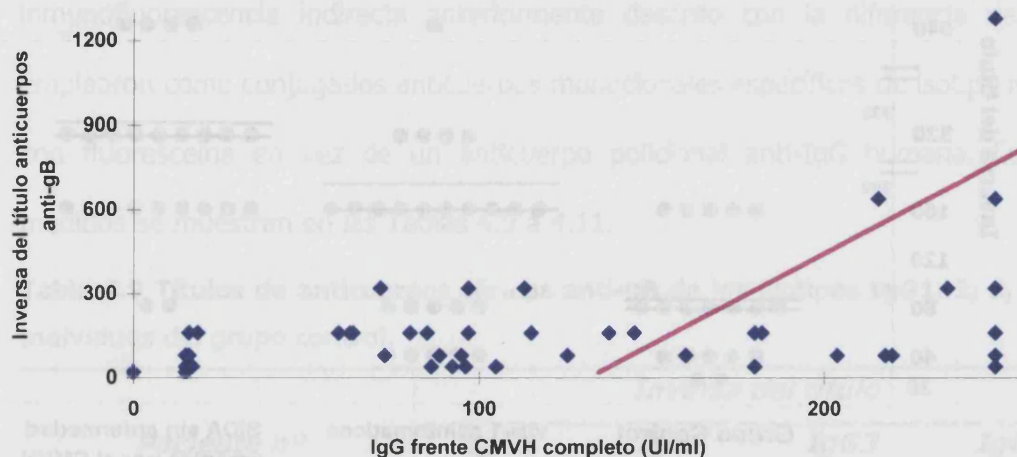


Figura 4.4 Correlación entre los niveles séricos de anticuerpos anti-gB y los de los anticuerpos frente al CMVH completo. Recta de regresión.

En la Figura 4.5 se muestran los títulos de anticuerpos séricos anti-gB de los individuos de los tres grupos de estudio y en la Tabla 4.8 los resultados del análisis estadístico de las comparaciones entre los distintos grupos.

La mediana del título de anticuerpos séricos anti-gB en el grupo de los pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica debida al CMVH fue significativamente mayor que las de los otros dos grupos de estudio. Asimismo, los niveles séricos de anticuerpos anti-gB fueron significativamente mayores en el grupo de individuos infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección que en el grupo de individuos control.

La diferencia observada entre el grupo de enfermos con SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH y el de individuos VIH-asintomáticos no se debió a la presencia

Resultados

en el primero de un nivel sérico significativamente mayor de inmunoglobulinas totales de la clase IgG (P = 0.2381).

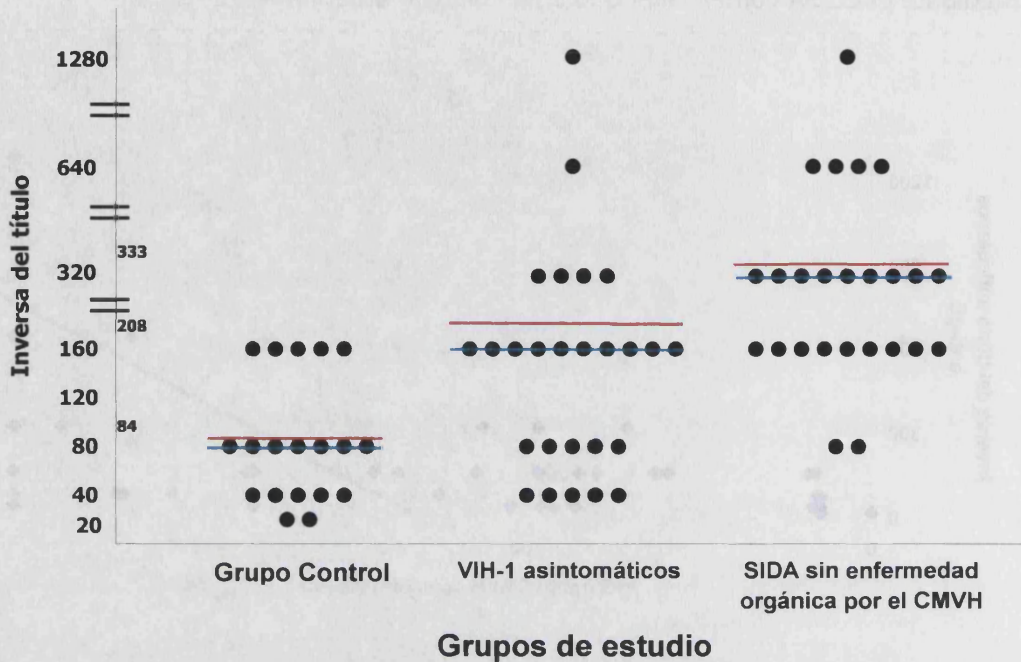


Figura 4.5 Títulos de anticuerpos séricos anti-gB en los distintos individuos objeto de estudio. La barra horizontal de color azul se corresponde con la mediana y la de color rojo con la media aritmética.

Tabla 4.8 Análisis estadístico de la comparación de anticuerpos séricos anti-gB entre los distintos grupos de estudio.

Grupos comparados	Valor de P
SIDA sin enfermedad por el CMVH/VIH-1 asintomáticos	0.0057
SIDA sin enfermedad por el CMVH/Inmunocompetentes	<0.0001
VIH-1 asintomáticos/Inmunocompetentes	0.0139

Significativo estadísticamente si P<0.05.

Puesto que no se observó déficit cuantitativo alguno en la respuesta de anticuerpos anti-gB en los individuos infectados por el VIH-1, ni siquiera en los pacientes con SIDA, se analizó posteriormente, la respuesta isotípica de anticuerpos anti-gB con objeto de

averiguar si ésta era anormal en los pacientes infectados por el VIH-1 en comparación con la de los individuos del grupo control. Es sabido que las propiedades biológicas de las IgG, entre ellas la actividad antiviral, varían según el isotipo considerado.

Se procedió por tanto a cuantificar los niveles séricos de anticuerpos anti-gB de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Para ello se utilizó el método de inmunofluorescencia indirecta anteriormente descrito con la diferencia de que se emplearon como conjugados anticuerpos monoclonales específicos de isotipo marcados con fluoresceína en vez de un anticuerpo policlonal anti-IgG humana. Los títulos medidos se muestran en las Tablas 4.9 a 4.11.

Tabla 4.9 Títulos de anticuerpos séricos anti-gB de los isotipos IgG1, 2, 3, 4 en los individuos del grupo control.

<i>Paciente n^o</i>	<i>Inversa del título</i>			
	<i>IgG1</i>	<i>IgG2</i>	<i>IgG3</i>	<i>IgG4</i>
1	80	10	0	0
2	160	10	0	0
3	160	0	10	0
4	80	20	0	0
5	80	0	0	0
6	80	0	0	0
7	160	0	0	0
8	160	0	0	0
9	40	0	0	0
10	80	0	0	0
11	160	0	0	0
12	80	0	0	0
13	160	0	0	0
14	80	0	0	0
15	80	0	0	0
16	40	0	0	0
17	20	0	0	0
18	80	0	0	0
19	40	0	10	0

Tabla 4.10 Títulos de anticuerpos séricos anti-gB de los isotipos IgG1, 2, 3, 4 en los individuos infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección.

<i>Paciente n°</i>	<i>Inversa del título</i>			
	<i>IgG1</i>	<i>IgG2</i>	<i>IgG3</i>	<i>IgG4</i>
1	160	0	0	0
2	160	10	0	0
3	80	0	0	0
4	40	20	0	0
5	160	10	0	0
6	80	0	0	0
7	160	20	10	0
8	160	10	0	0
9	40	0	0	0
10	160	0	10	0
11	40	0	0	0
12	40	0	0	0
13	80	0	0	0
14	80	0	0	0
15	80	0	0	0
16	40	0	0	0
17	80	0	0	0
18	80	0	0	0
19	80	0	0	0
20	160	10	10	0
21	80	0	10	0
22	160	0	0	0
23	160	0	0	0
24	1280	0	0	0
25	160	0	0	0
26	160	10	0	0

Tabla 4.11 Títulos de anticuerpos séricos anti-gB de los isotipos IgG1, 2, 3, 4 en los paciente con SIDA sin enfermedad orgánica debida al CMVH.

<i>Paciente n°</i>	<i>Inversa del título</i>			
	<i>IgG1</i>	<i>IgG2</i>	<i>IgG3</i>	<i>IgG4</i>
1	640	0	10	0
2	1280	0	20	0
3	80	0	0	0
4	80	0	40	0
5	640	0	20	0
6	160	0	10	0
7	640	0	0	0
8	640	0	20	0
9	80	0	10	0
10	160	0	20	0
11	160	0	10	0
12	160	0	10	0
13	80	0	10	0
14	80	0	0	0
15	160	10	0	0
16	160	0	10	0
17	80	10	0	10
18	80	0	0	0
19	80	0	0	0
20	160	0	0	0
21	160	0	10	0
22	640	0	0	0
23	160	0	0	0
24	640	0	0	0
25	640	0	0	0

La respuesta de anticuerpos anti-gB del isotipo IgG1 fue dominante en todos los sueros con independencia del grupo a que perteneciera el paciente objeto de estudio; de hecho, en todos los sueros se detectaron anticuerpos IgG1 anti-gB. De acuerdo con lo que cabía esperar a tenor de los resultados obtenidos en la cuantificación de anticuerpos IgG totales anti-gB, la mediana del título de anticuerpos séricos anti-gB del isotipo IgG1 en el grupo de pacientes con SIDA fue significativamente mayor que la de los grupos de individuos infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección y control (ver la Figura 4.6 y la Tabla 4.12 en la que se muestra el análisis estadístico de las comparaciones entre los grupos de estudio). Se detectaron anticuerpos anti-gB del isotipo IgG3 en 13 de los 25 sueros de los pacientes con SIDA y sólo en 4 y 2 de los sueros de los pacientes infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección y del grupo control respectivamente; sin embargo la mediana del título de anticuerpos anti-gB de este isotipo fue similar (1/10) en todos los grupos de estudio. Sólo en unos pocos sueros de cada grupo se detectaron anticuerpos anti-gB de las subclases IgG2 e IgG4 y en todo caso las medianas de los títulos no difirieron de unos grupos a los otros.

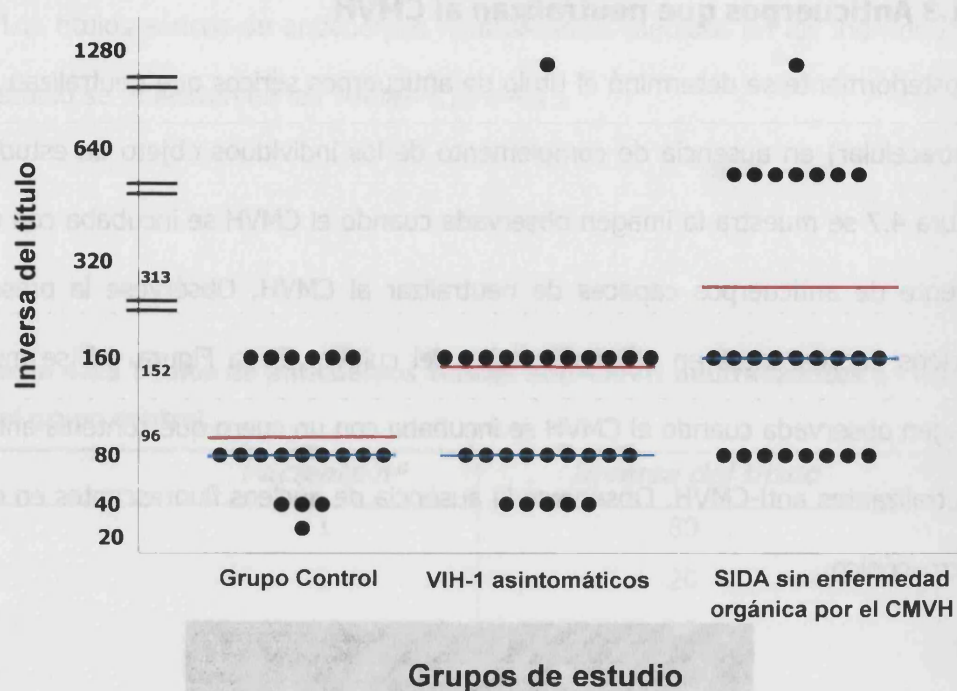


Figura 4.6 Títulos de anticuerpos anti-gB del isotipo IgG1 en los distintos grupos de estudio. La barra horizontal de color azul se corresponde con la mediana y la de color rojo con la media aritmética.

Tabla 4.12 Análisis estadístico de la comparación de anticuerpos séricos anti-gB del isotipo IgG1 entre los distintos grupos de estudio.

Grupos comparados	Valor de P
SIDA sin enfermedad por el CMV/VIH-1 asintomáticos	0.0164
SIDA sin enfermedad por el CMV/Inmunocompetentes	0.0026
VIH-1 asintomáticos/Inmunocompetentes	0.3968

Significativo estadísticamente si $P < 0.05$.

En resumen, el patrón de la respuesta isotípica IgG anti-gB en los pacientes infectados por el VIH-1, en los distintos estadios de la infección, no difirió de la de los individuos del grupo control.

4.1.3 Anticuerpos que neutralizan al CMVH

Posteriormente se determinó el título de anticuerpos séricos que neutralizan al CMVH (extracelular) en ausencia de complemento de los individuos objeto de estudio. En la Figura 4.7 se muestra la imagen observada cuando el CMVH se incubaba con un suero carente de anticuerpos capaces de neutralizar al CMVH. Obsérvese la presencia de núcleos fluorescentes en algunas células del cultivo. En la Figura 4.8 se muestra la imagen observada cuando el CMVH se incubaba con un suero que contenía anticuerpos neutralizantes anti-CMVH. Obsérvese la ausencia de núcleos fluorescentes en el campo microscópico.

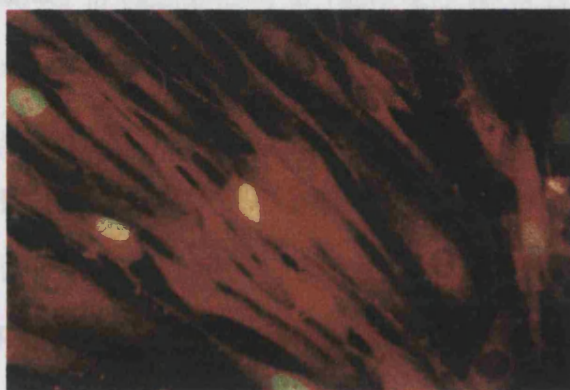


Figura 4.7 Ensayo de anticuerpos anti-CMVH neutralizantes. Ausencia de neutralización.

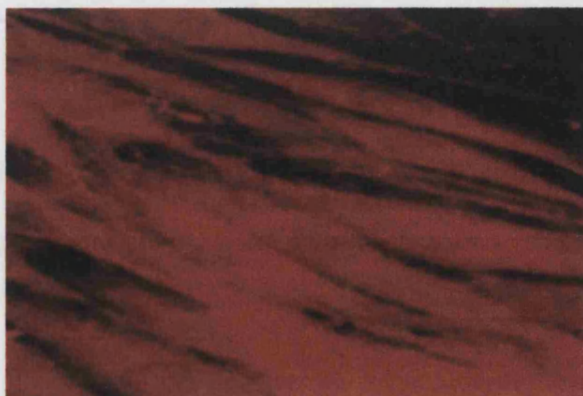


Figura 4.8 Ensayo de anticuerpos anti-CMVH neutralizantes. Control positivo de neutralización.

Los títulos séricos de anticuerpos neutralizantes medidos en los individuos objeto de estudio se muestran en las Tablas 4.13 a 4.15.

Tabla 4.13 Títulos de anticuerpos séricos anti-CMVH neutralizantes en los individuos del grupo control.

<i>Paciente n^o</i>	<i>Inversa del título</i>
1	80
2	20
3	20
4	40
5	80
6	80
7	80
8	160
9	20
10	80
11	160
12	20
13	80
14	160
15	80
16	80
17	20
18	20
19	20

Tabla 4.14 Títulos de anticuerpos séricos anti-CMVH neutralizantes en los individuos infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección.

<i>Paciente n°</i>	<i>Inversa del título</i>
1	160
2	80
3	80
4	40
5	80
6	80
7	80
8	80
9	160
10	80
11	40
12	80
13	320
14	80
15	320
16	20
17	640
18	160
19	640
20	160
21	80
22	160
23	160
24	1280
25	80
26	80

Tabla 4.15 Títulos de anticuerpos séricos anti-CMVH neutralizantes en los pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica debida al CMVH.

<i>Paciente n^o</i>	<i>Inversa del título</i>
1	320
2	640
3	80
4	320
5	160
6	320
7	160
8	320
9	320
10	640
11	40
12	40
13	640
14	160
15	320
16	320
17	320
18	640
19	80
20	160
21	160
22	320
23	160
24	320
25	320

Resultados

Se constató la existencia de una correlación estadísticamente significativa ($r = 0.6114$; $P = < 0.0001$; IC 95% 0.467-0.894) entre los títulos de anticuerpos anti-CMVH neutralizantes y los títulos de anticuerpos anti-gB (Figura 4.9).

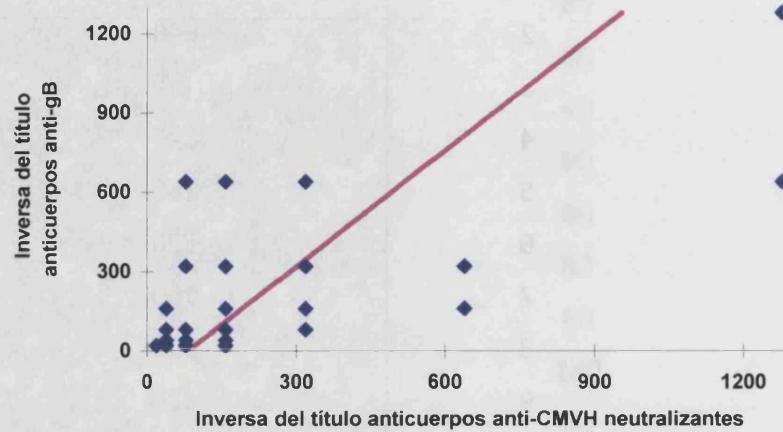


Figura 4.9 Correlación entre los niveles séricos de anticuerpos anti-CMVH neutralizantes y los de anticuerpos anti-gB. Recta de regresión.

Sin embargo la correlación (ver la Figura 4.10) observada entre los títulos de anticuerpos anti-CMVH neutralizantes y los niveles de anticuerpos IgG frente al CMVH completo (cuantificados mediante ELISA) no alcanzó significación estadística ($r = 0.2972$; $P = 0.0124$; IC 95% 0.156-1.251).

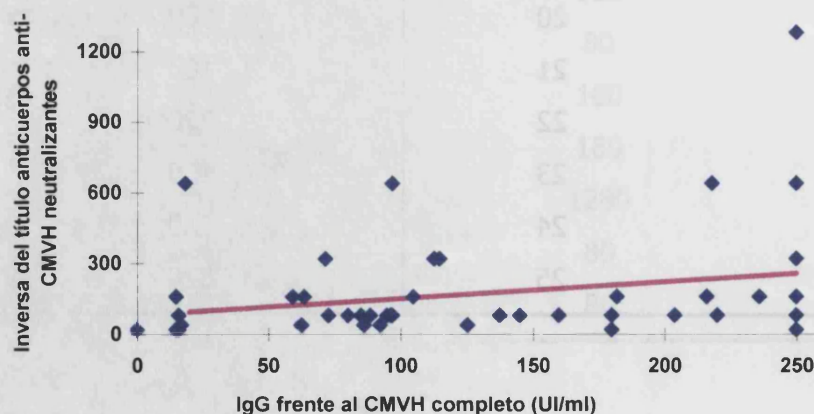


Figura 4.10 Correlación entre los niveles séricos de anticuerpos anti-CMVH neutralizantes y los de anticuerpos anti-CMVH completo. Recta de regresión.

Tabla 4.16 Análisis estadístico de la comparación de anticuerpos séricos anti-CMVH neutralizantes entre los distintos grupos de estudio.

Grupos comparados	Valor de P
SIDA sin enfermedad por el CMVH/VIH-1 asintomáticos	0.0071
SIDA sin enfermedad por el CMVH/Inmunocompetentes	<0.0001
VIH-1 asintomáticos/Inmunocompetentes	0.0079

Significativo estadísticamente si $P < 0.05$.

En resumen, en los pacientes infectados por el VIH-1 tanto en el estadio asintomático de la infección como en el de SIDA no se observó déficit cuantitativo alguno en la respuesta de anticuerpos anti-CMVH neutralizantes en relación con la de los individuos control.

4.1.3.1 Caracterización del modo de acción de los anticuerpos séricos anti-CMVH neutralizantes

Los datos experimentales mencionados en los apartados anteriores demostraban con claridad que los pacientes infectados por el VIH-1, particularmente aquellos que ya habían desarrollado el SIDA, mostraban una respuesta de anticuerpos anti-gB y anti-CMVH neutralizante de mayor magnitud que los individuos inmunocompetentes del grupo control. Con los experimentos que se detallan a continuación se pretendió caracterizar con mayor precisión la naturaleza de la respuesta neutralizante en los distintos grupos de estudio con objeto de determinar si había alguna diferencia cualitativa, esto es en el modo de acción de los anticuerpos neutralizantes séricos, entre los pacientes infectados por el VIH-1, en los distintos estadios evolutivos de la infección, y el grupo control. Es necesario mencionar que con el ensayo clásico de neutralización del CMVH (el realizado hasta este momento) no puede precisarse el/los mecanismo/s que median el bloqueo de la infección (neutralización) por el CMVH.

Con objeto de analizar cualitativamente la respuesta de anticuerpos anti-CMVH neutralizantes se llevaron a cabo experimentos de neutralización de virus adsorbido y de inhibición de la fusión inducida por el CMVH en células de glioblastoma, tal y como se detalla a continuación.

4.1.3.1.1 Anticuerpos que neutralizan el CMVH adsorbido a las células (ANPA-Anticuerpos neutralizantes postadsorción)

Con el uso de este método se pretendió cuantificar la fracción de los anticuerpos séricos que neutralizan al CMVH en una etapa posterior a la de la adsorción del virus a la superficie celular (presumiblemente impidiendo la penetración del virus en el interior de las células o quizá algún paso inmediatamente posterior a éste). Este método, por lo tanto, soslaya la detección de los anticuerpos que neutralizan al CMVH impidiendo la adsorción viral y los que lo hacen agregando viriones.

En este ensayo, tal y como se describe en la sección de los métodos, los viriones del CMHV se incuban con las monocapas celulares a 4°C, temperatura a la que las partículas víricas consiguen adsorberse a las células pero no penetrar en ellas. Posteriormente las monocapas celulares con los virus adsorbidos a su membrana se exponen a distintas diluciones del suero problema y se incuban a 37°C. A esta temperatura los viriones que no hayan sido neutralizados por los anticuerpos del suero problema penetrarán en el interior de la células a las que se habían fijado.

Los títulos de anticuerpos séricos capaces de neutralizar al CMVH adsorbido de los individuos incluidos en los distintos grupos de estudio se muestran en las Tablas 4.17 a 4.19.

Tabla 4.17 Títulos de anticuerpos séricos anti-CMVH neutralizantes postadsorción (ANPA) en los individuos del grupo control.

<i>Paciente n°</i>	<i>Inversa del título</i>
1	80
2	20
3	20
4	20
5	80
6	20
7	80
8	80
9	20
10	40
11	20
12	20
13	20
14	20
15	40
16	40
17	20
18	20
19	20

Tabla 4.18 Títulos de anticuerpos séricos anti-CMVH neutralizantes postadsorción (ANPA) en los individuos infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección.

<i>Paciente n°</i>	<i>Inversa del título</i>
1	80
2	20
3	20
4	20
5	40
6	80
7	80
8	40
9	40
10	20
11	20
12	20
13	80
14	20
15	20
16	20
17	40
18	80
19	320
20	20
21	20
22	80
23	40
24	320
25	40
26	40

Tabla 4.19 Títulos de anticuerpos séricos anti-CMVH neutralizantes postadsorción (ANPA) en los pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica causada por el CMVH.

<i>Paciente n°</i>	<i>Inversa del título</i>
1	80
2	80
3	40
4	160
5	160
6	160
7	20
8	40
9	80
10	160
11	20
12	20
13	40
14	20
15	20
16	40
17	40
18	40
19	20
20	80
21	80
22	20
23	20
24	40
25	40

Observamos que había una correlación significativa entre los títulos de anticuerpos medidos por ambos ensayos de neutralización ($r = 0.6490$; $P = <0.0001$; IC 95% 0.125-0.224) (Ver Figura 4.12).

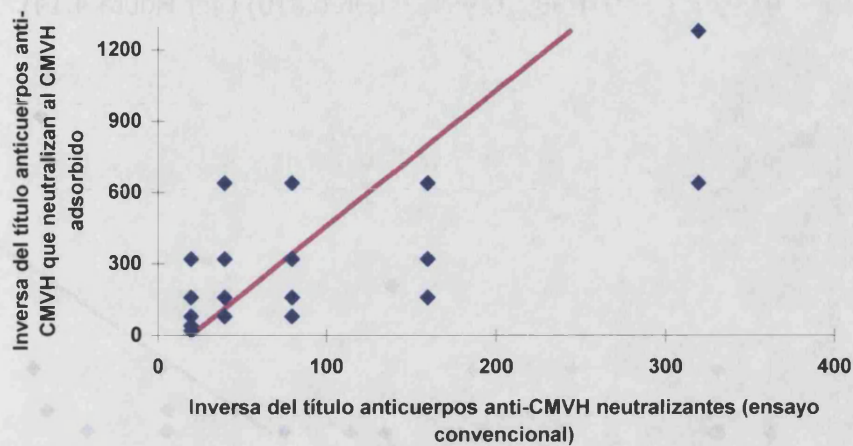


Figura 4.12 Correlación entre los niveles séricos de anticuerpos anti-CMVH que neutralizan al CMVH adsorbido (ANPA) y neutralizantes medidos por el método convencional. Recta de regresión.

También se observó una correlación significativa entre los títulos séricos de ANPA y de los anticuerpos anti-gB ($r = 0.4088$; $P = 0.000441$; IC 95% 0.776-2.600) (Ver Figura 4.13).

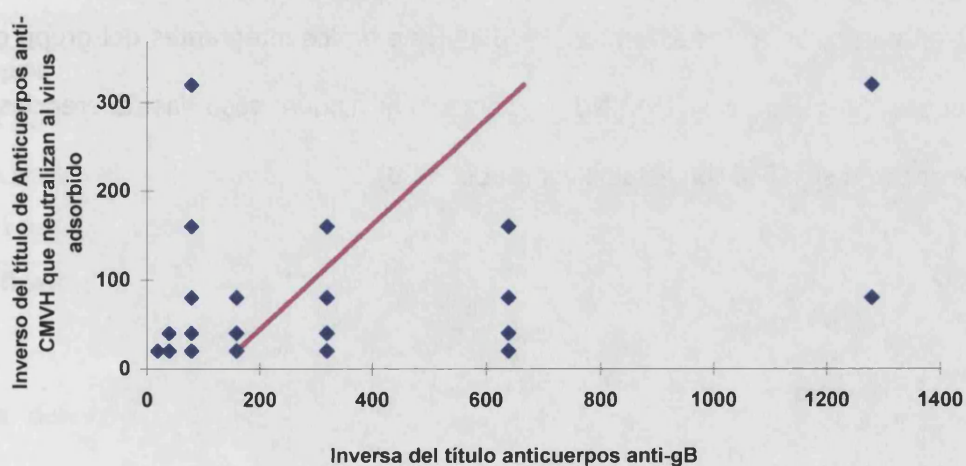


Figura 4.13 Correlación entre los niveles séricos de anticuerpos anti-CMVH que neutralizan al CMVH adsorbido (ANPA) y anticuerpos anti-gB. Recta de regresión.

Resultados

Contrariamente, sin embargo, se observó una escasa correlación entre los niveles séricos de ANPA y los de los anticuerpos anti-CMVH (virus completo) medidos por ELISA ($r = 0.2930$; $P = 0.0138$; IC 95% 0.096-0.820) (Ver Figura 4.14).

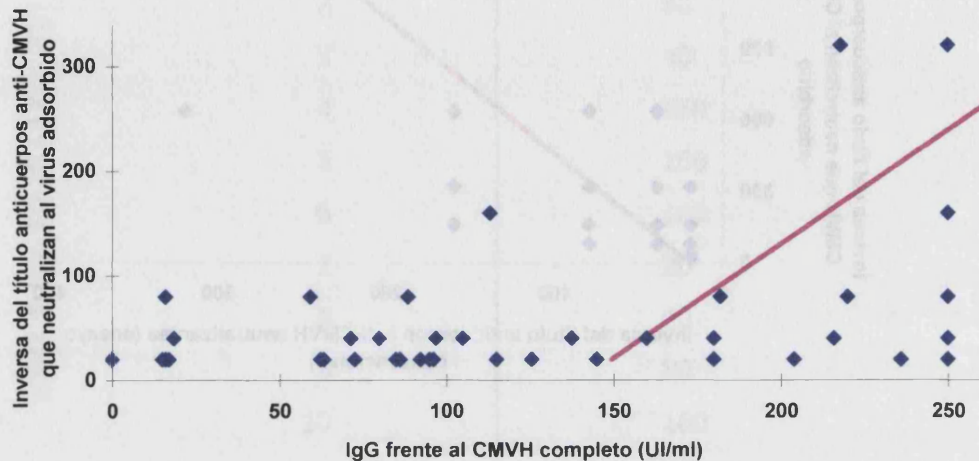


Figura 4.14 Correlación entre los niveles séricos de anticuerpos anti-CMVH que neutralizan al CMVH adsorbido (ANPA) y anticuerpos IgG frente al CMVH (virus completo). Recta de regresión.

Los niveles séricos de ANPA fueron superiores en los individuos infectados por el VIH-1, en particular en los enfermos de SIDA, que en los integrantes del grupo de estudio control (ver Figura 4.15). No obstante, en ningún caso las diferencias halladas alcanzaron significación estadística (Tabla 4.20).

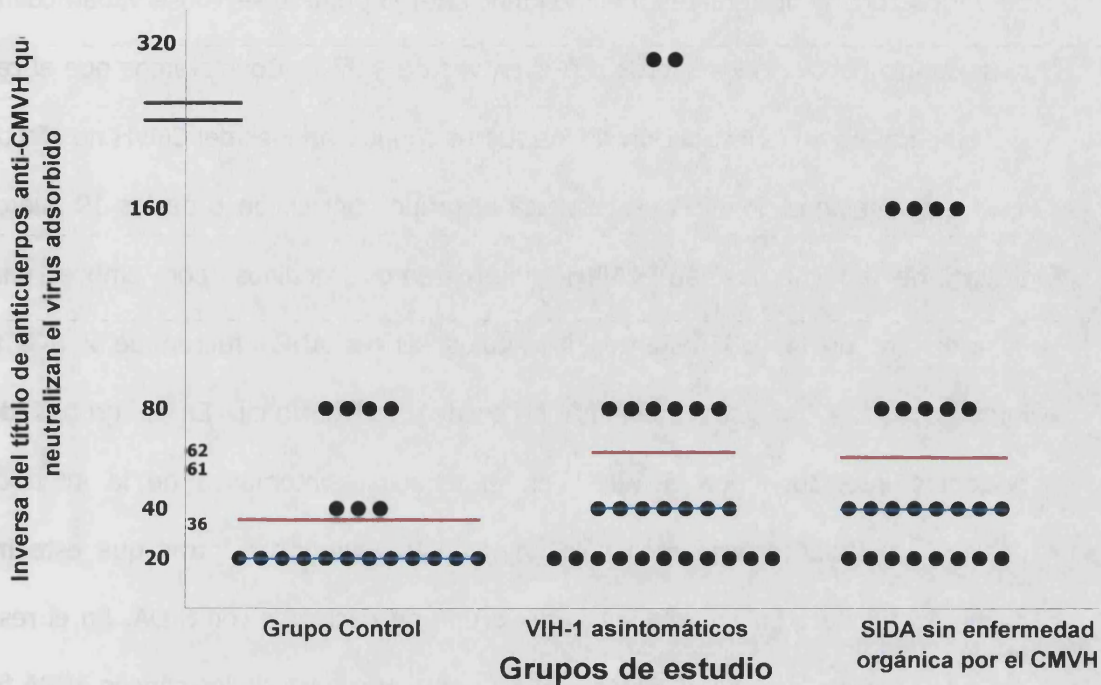


Figura 4.15 Títulos de anticuerpos séricos anti-CMVH que neutralizan el virus adsorbido (ANPA) en los distintos grupos de estudio. La barra horizontal de color azul se corresponde con la mediana y la de color rojo con la media aritmética.

Tabla 4.20 Análisis estadístico de la comparación de anticuerpos séricos anti-CMVH que neutralizan virus adsorbido (ANPA) entre los distintos grupos de estudio.

Grupos comparados	Valor de P
SIDA sin enfermedad por el CMVH/VIH-1 asintomáticos	0.5009
SIDA sin enfermedad por el CMVH/Inmunocompetentes	0.0593
VIH-1 asintomáticos/Inmunocompetentes	0.2179

Significativo estadísticamente si $P < 0.05$.

Para determinar qué fracción de la actividad neutralizante global de los sueros problema era adscribible a los anticuerpos ANPA fue necesario comparar los títulos de anticuerpos anti-CMVH neutralizantes medidos por ambos ensayos. Puesto que en el ensayo de neutralización convencional los sueros se incuban con los viriones del CMVH

Resultados

a 37°C y en el de neutralización postadsorción a 4°C había que determinar si los títulos de anticuerpos neutralizantes medidos mediante el primero se conservaban cuando el virus se incubaba con los sueros a 4°C en vez de a 37°C. Constatamos que el cambio de temperatura en la incubación de los sueros con los viriones del CMVH no afectaba a los títulos medidos. Por lo que respecta al grupo control, en 6 de los 19 sueros los títulos de anticuerpos anti-CMVH neutralizantes medidos por ambos ensayos coincidieron, en los 13 restantes los títulos séricos ANPA fueron de 2 a 8 veces inferiores a los medidos mediante el ensayo convencional. En el grupo de los pacientes infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección se observaron títulos coincidentes sólo en 3 de los sueros, mientras que este mismo hecho se constató en un solo suero del grupo de pacientes con SIDA. En el resto de sueros del grupo de los individuos VIH-1 asintomáticos los títulos séricos ANPA fueron 2-16 veces inferiores a los títulos séricos medidos con el ensayo convencional. La conclusión a que llegamos después de analizar los anteriores datos, la cual puede ser inferida observando la Figura 4.16, es que la contribución de los ANPA a la capacidad neutralizante global del suero es sustancialmente menor en los pacientes infectados por el VIH-1, particularmente en los pacientes con SIDA, que en los individuos control (Figura 4.16).

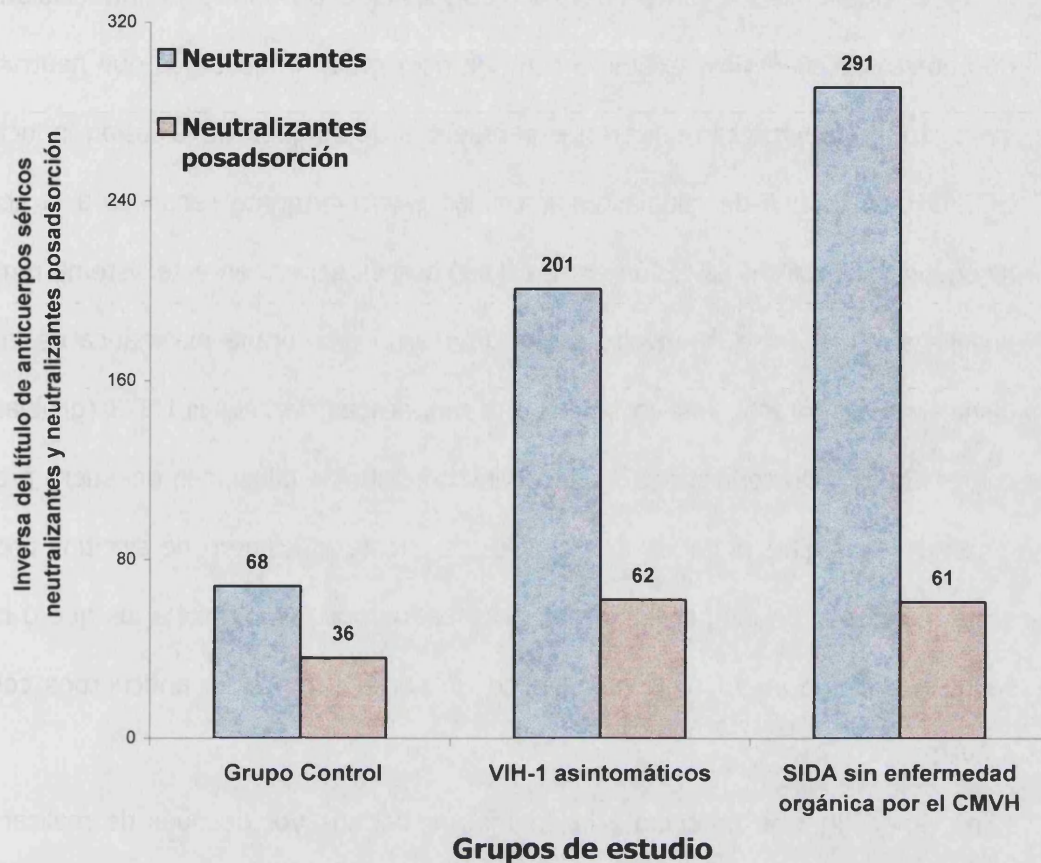


Figura 4.16 Contribución de los anticuerpos anti-CMVH ANPA a la capacidad neutralizante global del suero en los individuos de los distintos grupos de estudio. Sobre las barras se muestran las medias aritméticas de los niveles séricos de los anticuerpos correspondientes.

4.1.3.1.2 Anticuerpos que impiden la fusión de células de glioblastoma mediada por el CMVH

Los datos obtenidos en los dos ensayos de neutralización llevados a cabo revelaban que tanto los sueros de los individuos control como los de los pacientes infectados por el VIH-1, con independencia del estadio clínico de esta infección, contienen una fracción, variable en función del grupo considerado, de anticuerpos neutralizantes que bloquean al virus o bien impidiendo la penetración del virus en el interior de la célula o

Resultados

bien interfiriendo en algún proceso inmediatamente posterior, ya intracelularmente. Con objeto de cuantificar exclusivamente la fracción de anticuerpos que neutralizan la penetración del virus se realizaron experimentos de bloqueo de la fusión inducida por el CMVH en células de glioblastoma, células particularmente sensibles a la actividad fusogénica del CMVH. La fusión entre células que se genera en este sistema remeda la que se produce entre la envoltura del CMVH y la membrana plasmática de la célula diana *in vivo*. En este ensayo se infectan monocapas de células U373 (glioblastoma) con el CMVH y posteriormente se incuban con distintas diluciones del suero problema durante varios días, al cabo de los cuales se cuenta el número de sincitios presentes en la monocapa de los pocillos problema y de los pocillos control a los que o bien no se ha añadido suero o se ha añadido un suero carente de anticuerpos contra el CMVH.

En primer lugar se procedió a la optimización del ensayo; después de realizar varias pruebas se llegó a la conclusión de que el ensayo funcionaba mejor cuando la monocapa de células U373 se disponía con una confluencia próxima al 70% y se inoculaba con una concentración de virus de aproximadamente 50 UFP (unidades formadoras de placas) por pocillo. Por otra parte, dada la distinta naturaleza de los ensayos de fusión y de neutralización y con objeto de poder comparar los títulos que se obtuvieran en ambos ensayos, hubo que llevar a cabo un experimento preliminar en el que se cuantificaron los anticuerpos neutralizantes en 10 sueros, 5 del grupo control y 5 pertenecientes a pacientes con SIDA, utilizando en el ensayo de neutralización convencional células U373 en vez de fibroblastos (HFF) para tener la certeza de que los títulos medidos no variaban por el uso de una línea celular distinta. Estos experimentos preliminares demostraron que no existía diferencia alguna en los títulos de anticuerpos neutralizantes medidos cuando se empleaban células HFF en relación con los hallados cuando se utilizaban las células U373.

En la Figura 4.17 se muestra el aspecto de una monocapa de células de glioblastoma U373 infectada por el CMVH (control negativo) y teñida con el procedimiento Giemsa. Se observa un sincitio típico inducido por el CMVH. En la Figura 4.18 sin embargo no se observan sincitios puesto que el desarrollo de éstos fue inhibido por un suero que contenía anticuerpos bloqueantes de la fusión inducida por el CMVH (control positivo de bloqueo de la fusión).

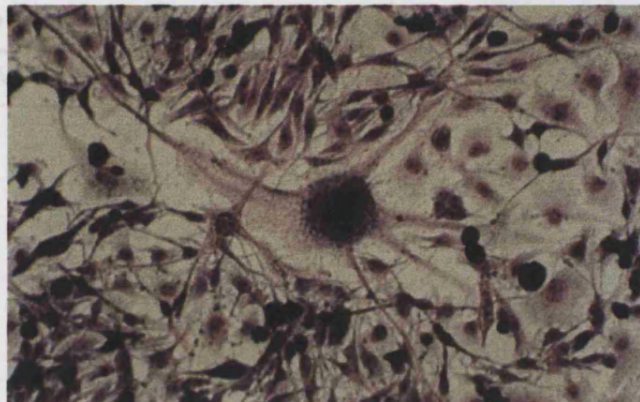


Figura 4.17 Sincitio inducido por el CMVH en células de glioblastoma U373. Tinción de Giemsa. Observación 40X.

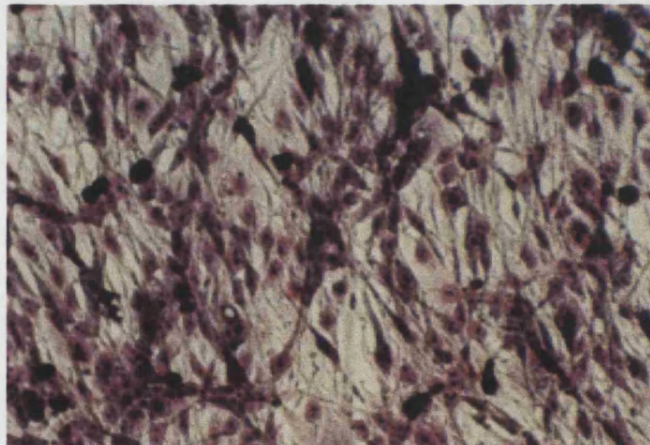


Figura 4.18 Bloqueo del desarrollo de sincitios inducidos por el CMVH en células de glioblastoma U373. Tinción de Giemsa. Observación 40X.

Resultados

Los títulos séricos de anticuerpos inhibidores de la fusión inducida por el CMVH en células de glioblastoma U373 (AIF) de los individuos de los distintos grupos de estudio se muestran en las Tablas 4.21 a 4.23.

Tabla 4.21 Títulos de anticuerpos séricos inhibidores de la fusión inducida por el CMVH en células de glioblastoma U373 (AIF) en los individuos del grupo control.

<i>Paciente n^o</i>	<i>Inversa del título</i>
1	20
2	20
3	80
4	40
5	20
6	20
7	20
8	20
9	20
10	20
11	80
12	20
13	80
14	20
15	80
16	40
17	40
18	40
19	40

Tabla 4.22 Títulos de anticuerpos séricos inhibidores de la fusión inducida por el CMVH en células de glioblastoma U373 (AIF) en los individuos infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección.

<i>Paciente n°</i>	<i>Inversa del título</i>
1	80
2	40
3	40
4	40
5	80
6	80
7	40
8	40
9	80
10	40
11	40
12	40
13	40
14	20
15	20
16	40
17	40
18	20
19	80
20	80
21	20
22	40
23	80
24	40
25	80
26	40

Tabla 4.23 Títulos de anticuerpos séricos inhibidores de la fusión inducida por el CMVH en células de glioblastoma U373 (AIF) en los pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica causada por el CMVH.

<i>Paciente n^o</i>	<i>Inversa del título</i>
1	80
2	80
3	80
4	160
5	80
6	80
7	40
8	40
9	160
10	160
11	20
12	40
13	40
14	160
15	160
16	80
17	80
18	40
19	40
20	80
21	40
22	40
23	40
24	160
25	40

En las Figuras 4.19, 4.20 y 4.21 se muestran las rectas de regresión correspondientes a las correlaciones entre los niveles séricos de anticuerpos AIF y los anticuerpos anti-gB, neutralizantes, y neutralizantes postadsorción respectivamente. La correlación entre anticuerpos AIF y anti-gB ($r = 0.1474$; $P = 0.2231$; IC 95% $-0.572-2.416$), no fue significativa mientras que sí lo fueron las correlaciones entre anticuerpos AIF y anticuerpos neutralizantes ($r = 0.2543$; $P = 0.03361$; IC 95% $0.1138-2.738$) y la correlación entre anticuerpos AIF y los anticuerpos neutralizantes postadsorción ($r=0.2322$; $P = 0.0530$; IC 95% $-0.0048-0.7072$). En ningún caso, sin embargo, la correlación fue óptima ($r = >0.5$).

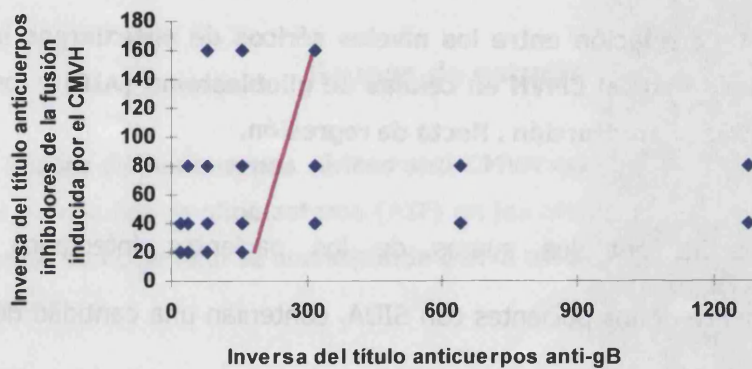


Figura 4.19 Correlación entre los niveles séricos de anticuerpos inhibidores de la fusión inducida por el CMVH en células de glioblastoma (AIF) y los de anticuerpos anti-gB. Recta de regresión.

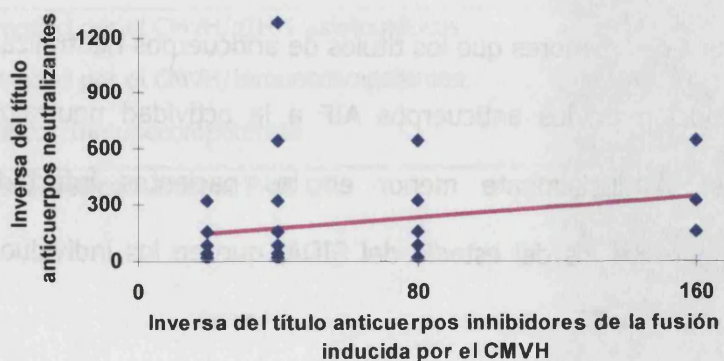


Figura 4.20 Correlación entre los niveles séricos de anticuerpos inhibidores de la fusión inducida por el CMVH en células de glioblastoma (AIF) y los de anticuerpos neutralizantes. Recta de regresión.

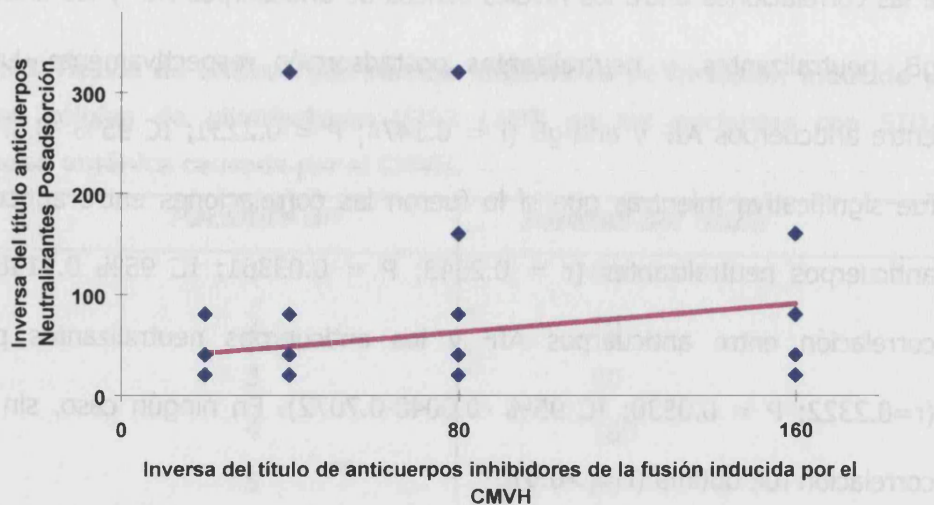


Figura 4.21 Correlación entre los niveles séricos de anticuerpos inhibidores de la fusión inducida por el CMVH en células de glioblastoma (AIF) y los de anticuerpos neutralizantes postadsorción . Recta de regresión.

Es destacable que los sueros de los pacientes infectados por el VIH-1, particularmente de los pacientes con SIDA, contenían una cantidad de anticuerpos AIF significativamente mayor que la presente en los sueros control (ver Figura 4.22 y Tabla 4.24). En 6 de los sueros de los individuos control, en 4 de los individuos infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección y en 3 pacientes con SIDA los títulos AIF y neutralizantes fueron coincidentes, en los restantes sueros los títulos AIF fueron 2-16 veces menores que los títulos de anticuerpos neutralizantes.

La contribución de los anticuerpos AIF a la actividad neutralizante global de los sueros fue sustancialmente menor en los pacientes infectados por el VIH-1, particularmente en los del estadio del SIDA, que en los individuos del grupo control (Figura 4.23).

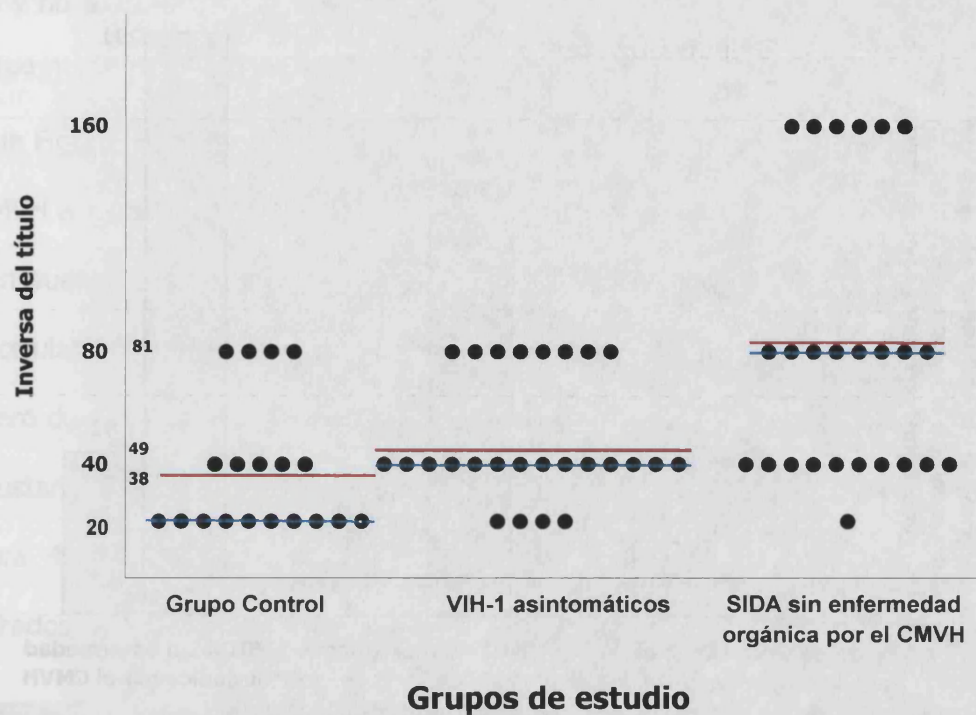


Figura 4.22 Títulos de Anticuerpos séricos anti-CMVH que inhiben la fusión inducida por el CMVH en células de glioblastoma (AIF) en los distintos grupos de estudio. La barra horizontal de color azul se corresponde con la mediana y la de color rojo con la media aritmética.

Tabla 4.24 Análisis estadístico de la comparación de anticuerpos séricos anti-CMVH que inhiben la fusión inducida por el CMVH en células de glioblastoma (AIF) entre los distintos grupos de estudio.

Grupos comparados	Valor de P
SIDA sin enfermedad por el CMVH/VIH-1 asintomáticos	0.0243
SIDA sin enfermedad por el CMVH/Inmunocompetentes	0.0007
VIH-1 asintomáticos/Inmunocompetentes	0.0528

Significativo estadísticamente si $P < 0.05$.

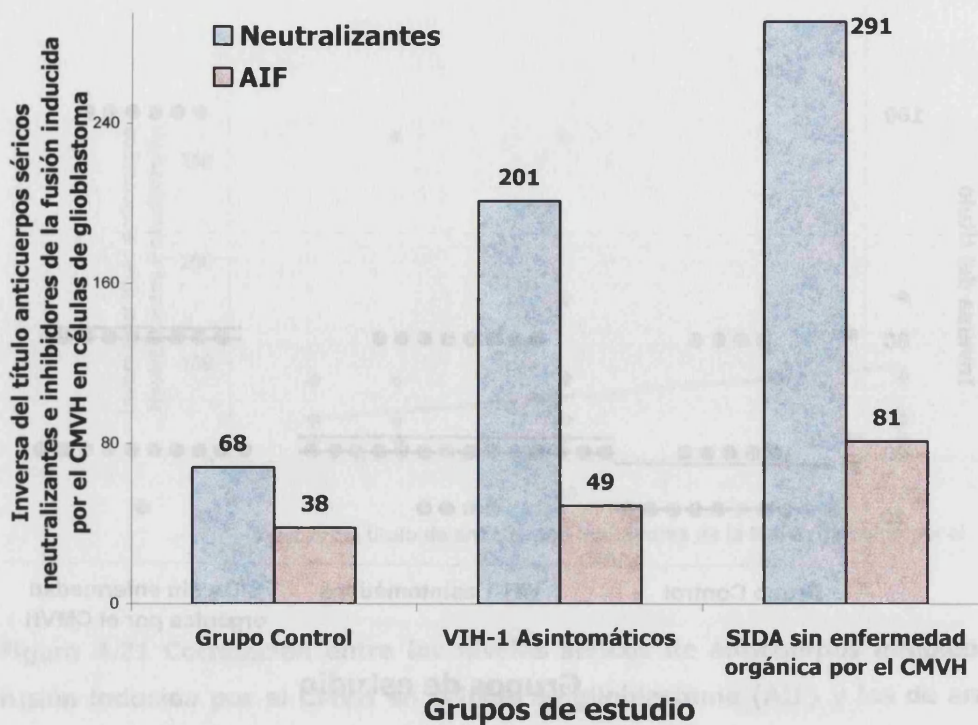


Figura 4.23 Contribución de los anticuerpos anti-CMVH (AIF) a la capacidad neutralizante global del suero en los individuos de los distintos grupos de estudio. Sobre las barras se muestran las medias aritméticas de los niveles séricos de los anticuerpos correspondientes.

4.1.4 Anticuerpos que inhiben la expansión intercelular del CMVH

En los experimentos que se describen a continuación se llevó a cabo un análisis cuantitativo de la capacidad de los sueros de los distintos grupos de estudio de impedir la transmisión intercelular del CMVH, modo de expansión del virus de extraordinaria relevancia *in vivo*.

Tal y como se describe en la sección de material y métodos se empleó para ello el procedimiento de inhibición (mediada por anticuerpos) del desarrollo focos citopáticos en una monocapa de células HFF. Está suficientemente acreditado que, en este sistema, el desarrollo de las placas en cultivo se debe a la expansión intercelular del

virus y no a la infección de células adyacentes por virus libre extracelular (Navarro *et al.*, 1993).

En la Figura 4.24 se observa una placa (foco de infección) característica inducida por el CMVH a los 9 días de la inoculación. En la Figura 4.25 se observa el efecto inhibitor de un suero problema que contenía anticuerpos capaces de bloquear la transmisión intercelular del CMVH sobre el desarrollo de focos citopáticos. Obsérvese que el número de células que forman parte de la placa, y por consiguiente el tamaño de ésta, es sustancialmente menor en la segunda imagen (Figura 4.25) que en la primera (Figura 4.24) resultado del efecto inhibitor del desarrollo de los focos infecciosos generados por el CMVH por parte del suero problema.

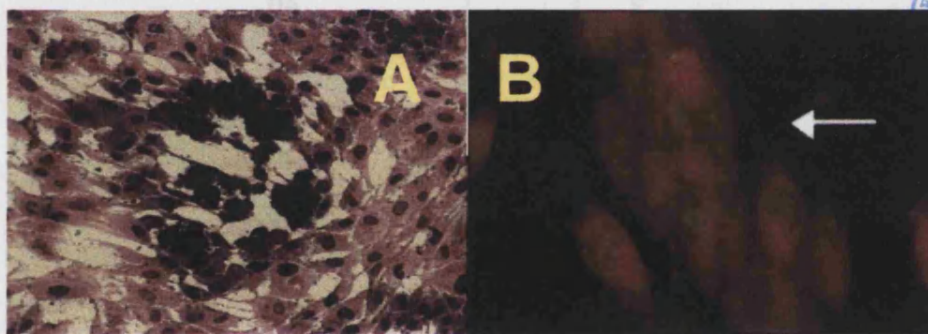


Figura 4.24 Foco infeccioso generado por el CMVH en células HFF. (A) Placa vista con el microscopio óptico tras tinción con Giemsa (40X), (B) Placa teñida con un anticuerpo anti-IE1 del CMVH. Inmunofluorescencia indirecta.

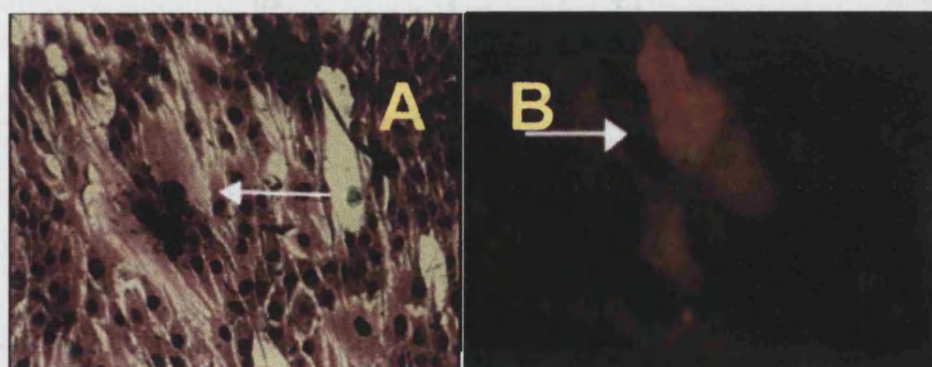


Figura 4.25 Inhibición de la formación de un foco infeccioso por un suero problema que contenía anticuerpos neutralizantes de la expansión intercelular del virus. (A) Placa vista con el microscopio óptico tras tinción con Giemsa (40X), (B) Placa teñida con un anticuerpo anti-IE1 del CMVH. Inmunofluorescencia indirecta.

En las Tablas 4.25 a 4.27 se muestran los títulos séricos de anticuerpos inhibidores del desarrollo de placas (AIP) de los individuos incluidos en los distintos grupos de estudio.

Tabla 4.25 Títulos de anticuerpos séricos inhibidores de la formación de placas por el CMVH en células HFF (AIP) en los individuos del grupo control.

<i>Paciente n°</i>	<i>Inversa del título</i>
1	20
2	20
3	40
4	40
5	40
6	40
7	20
8	20
9	20
10	20
11	20
12	20
13	20
14	20
15	20
16	80
17	40
18	20
19	20

Tabla 4.26 Títulos de anticuerpos séricos inhibidores de la formación de placas por el CMVH en células HFF (AIP) en los individuos infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección.

<i>Paciente n°</i>	<i>Inversa del título</i>
1	40
2	80
3	40
4	80
5	80
6	160
7	160
8	20
9	80
10	80
11	40
12	40
13	160
14	40
15	80
16	80
17	40
18	80
19	40
20	640
21	40
22	20
23	40
24	80
25	160
26	80

Tabla 4.27 Títulos de anticuerpos séricos inhibidores de la formación de placas por el CMVH en células HFF (AIP) en los individuos infectados por el VIH-1 en el estadio de SIDA sin enfermedad orgánica causada por el CMVH.

<i>Paciente n°</i>	<i>Inversa del título</i>
1	160
2	640
3	80
4	80
5	320
6	320
7	640
8	320
9	320
10	320
11	80
12	80
13	80
14	320
15	320
16	320
17	320
18	40
19	160
20	80
21	20
22	20
23	20
24	20
25	40

Con objeto de que los títulos séricos de AIP y los de los anticuerpos neutralizantes analizados mediante el ensayo convencional fueran comparables se utilizó el mismo número de UFP para infectar los cultivos en ambos ensayos. Se observó una correlación significativa aunque no óptima (ver Figura 4.26) entre los títulos de anticuerpos AIP y los títulos de anticuerpos neutralizantes. ($r = 0.2483$; $P = 0.0381$; IC 95% 0.0095-0.3282).

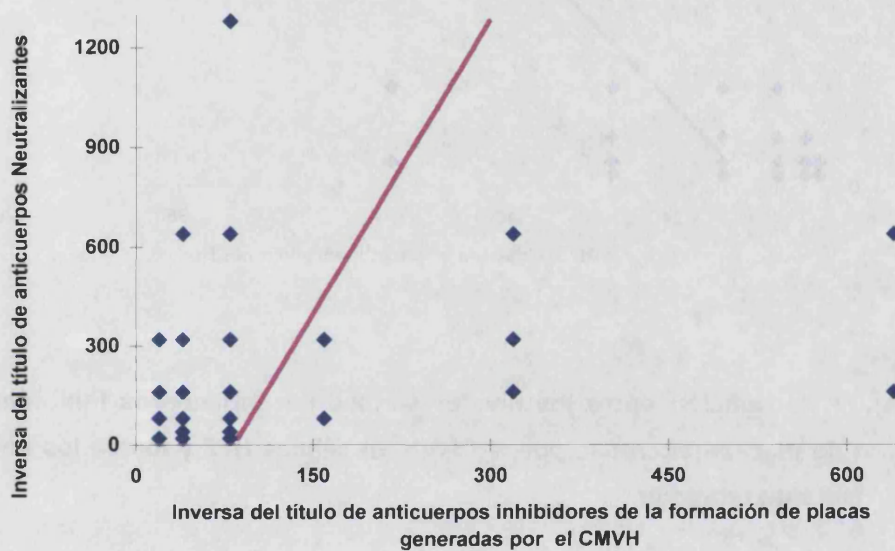


Figura 4.26 Correlación entre los niveles séricos de anticuerpos inhibidores de la formación de placas generadas por el CMVH en células HFF y los de los anticuerpos neutralizantes. Recta de regresión.

Por otra parte se observó una correlación significativa entre los niveles séricos AIP y de anticuerpos anti-gB ($r = 0.5321$; $P = < 0.0001$; IC 95% 0.535-1.207), (Figura 4.27).

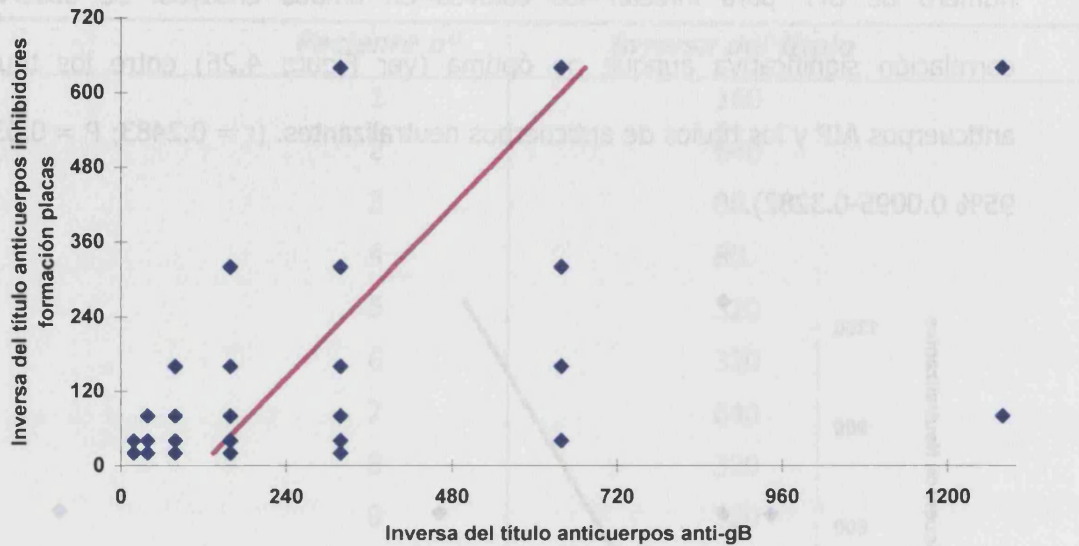


Figura 4.27 Correlación entre los niveles séricos de anticuerpos inhibidores de la formación de placas generadas por el CMVH en células HFF y los de los anticuerpos anti-gB. Recta de regresión.

Los niveles séricos de AIP fueron significativamente mayores en el grupo de individuos infectados por el VIH-1, particularmente en el estadio de SIDA, que en los individuos del grupo control y por otra parte, la mediana del título de anticuerpos del grupo con SIDA fue mayor que la del grupo de individuos infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la infección (Figura 4.28 y Tabla 4.28).

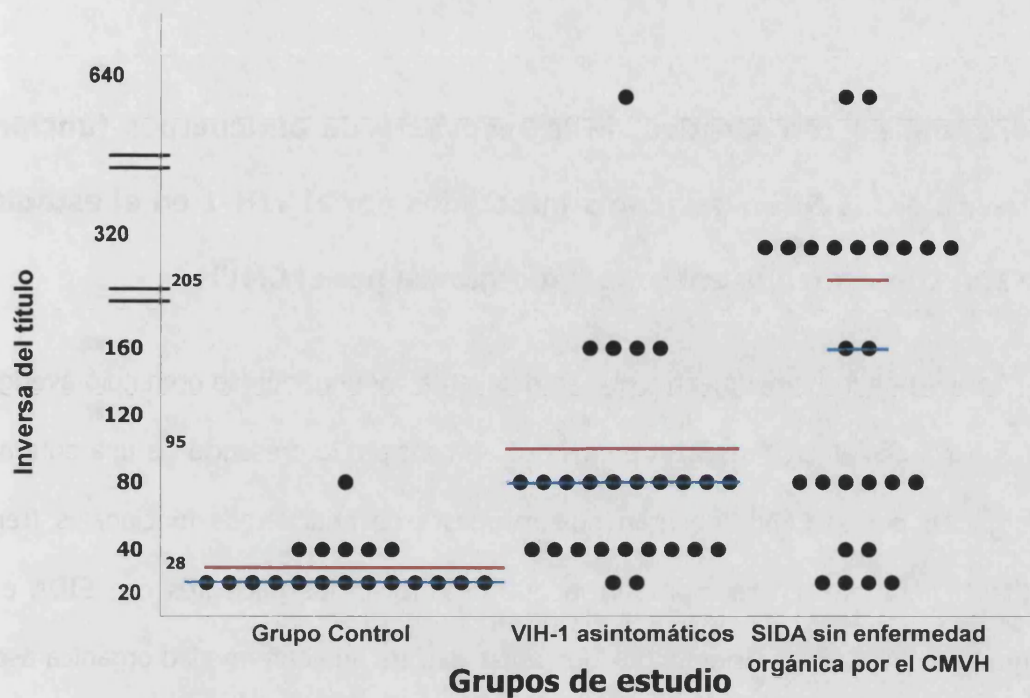


Figura 4.28 Títulos de Anticuerpos séricos que inhiben la formación de placas generada por el CMVH en células HFF (AIP) en los distintos grupos de estudio. La barra horizontal de color azul se corresponde con la mediana y la de color rojo con la media aritmética.

Tabla 4.28 Análisis estadístico de la comparación de anticuerpos séricos que inhiben la formación de placas generada por el CMVH en células HFF (AIP) entre los distintos grupos de estudio.

Grupos comparados	Valor de P
SIDA sin enfermedad por el CMVH/VIH-1 asintomáticos	0.0387
SIDA sin enfermedad por el CMVH/Inmunocompetentes	<0.0001
VIH-1 asintomáticos/Inmunocompetentes	<0.0001

Significativo estadísticamente si $P < 0.05$.

Por lo tanto no se observó déficit cuantitativo alguno en la respuesta de anticuerpos que inhiben la formación de placas generada por el CMVH en los pacientes infectados por el VIH-1 en relación con los individuos del grupo control.

4.2 Análisis comparativo de la respuesta de anticuerpos funcionales frente al CMVH en pacientes infectados por el VIH-1 en el estadio del SIDA con o sin una enfermedad orgánica por el CMVH

A través de los experimentos que se detallan a continuación se pretendió averiguar si los pacientes afectos de SIDA en los que se constata la presencia de una enfermedad orgánica por el CMVH generan una respuesta de anticuerpos funcionales frente al CMVH deficitaria en relación con la que desarrollan los pacientes con SIDA e igual grado de inmunosupresión en los que no se declara una enfermedad orgánica asociada con el CMVH.

Se determinaron los títulos séricos de los anticuerpos IgG totales frente al CMVH (virus completo), anti-gB, neutralizantes de virus libre e inhibidores de la formación de placas (AIP) en 25 sueros pertenecientes a otros tantos pacientes con enfermedad orgánica por el CMVH, cuyas características más relevantes se mostraron en la Tabla 2.4 de la sección de material y métodos, y se compararon estadísticamente con los títulos séricos de los anticuerpos mencionados medidos en 25 pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica y con un grado similar de inmunosupresión, es decir con cifras comparables de células T CD4+ periféricas ($P = >0.5$).

Los niveles séricos medios de inmunoglobulinas totales IgG en ambos grupos de no difirieron significativamente (SIDA con enfermedad por el CMVH =1.978 mg/dl y SIDA sin enfermedad por el CMVH =1.966 mg/dl; $P = >0.5$).

Resulta necesario destacar los siguientes hechos con vistas al análisis de los datos (ver Tabla 4.29). Por una parte, 5 pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH presentaban una prueba de viremia positiva en el momento en que se

obtuvieron los sueros, en 3 de los cuales se detectó asimismo la presencia del antígeno pp65 en los leucocitos (prueba de la antigenemia positiva). En los pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH se constató la presencia de viremia en 20 de los 25 pacientes y antigenemia en 15 de los anteriores; por otra parte, 9 de los pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH habían recibido tratamiento de inducción o profiláctico con ganciclovir y/o foscarnet en el mes anterior a la toma de la muestra de suero; de esos 9 pacientes 7 mostraban retinitis (3 episodios sintomáticos primarios y 4 reactivaciones de lesiones previas transitoriamente inactivas) 1 retinitis y polineuropatía y 1 colitis. Los 16 pacientes restantes no habían recibido tratamiento anti-CMVH.

Tabla 4.29 Características virológicas de los pacientes con SIDA que desarrollaron enfermedad orgánica por el CMVH.

<i>Paciente n^o</i>	<i>Viremia</i>	<i>Antigenemia</i>	<i>Tratamiento</i>
1	Positiva	Positiva	No
2	Positiva	Positiva	No
3	Positiva	Negativa	No
4	Positiva	Positiva	No
5	Positiva	Negativa	No
6	Negativa	Negativa	Si
7	Positiva	Negativa	Si
8	Positiva	Positiva	No
9	Negativa	Negativa	Si
10	Negativa	Negativa	Si
11	Negativa	Negativa	Si
12	Positiva	Negativa	Si
13	Negativa	Negativa	Si
14	Positiva	Positiva	No
15	Positiva	Positiva	No
16	Positiva	Positiva	No
17	Positiva	Positiva	No
18	Positiva	Positiva	No
19	Positiva	Positiva	Si
20	Positiva	Positiva	No
21	Positiva	Positiva	Si
22	Positiva	Positiva	No
23	Positiva	Positiva	No
24	Positiva	Negativa	No
25	Positiva	Positiva	No

4.2.1 Anticuerpos IgG contra el CMVH (virus completo)

Estos anticuerpos fueron cuantificados mediante un ELISA comercial como se ha indicado anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 4.30.

Tabla 4.30 Anticuerpos IgG séricos frente al CMVH (virus completo) en los individuos con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH.

<i>Paciente n^o</i>	<i>UI/ml *</i>
1	15.1
2	83
3	150
4	>250
5	>250
6	>250
7	240
8	250
9	>250
10	>250
11	>250
12	>250
13	132
14	>250
15	>250
16	>250
17	>250
18	>250
19	>250
20	>250
21	>250
22	>250
23	>250
24	>250
25	>250

***UI = Unidades Internacionales.**

Los pacientes afectados de enfermedad orgánica por el CMVH presentaron niveles séricos mayores que los pacientes sin enfermedad orgánica (ver Tabla 4.3 y compararla con la Tabla 4.30) aunque la diferencia no alcanzó significación estadística ($P = 0.509$).

4.2.2 Anticuerpos anti-gB

Los títulos de anticuerpos anti-gB de los sueros pertenecientes a los pacientes con enfermedad orgánica por el CMVH se muestran en la Tabla 4.31, los correspondientes a los pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH se mostraron en la Tabla 4.7.

Tabla 4.31 Títulos de anticuerpos séricos anti-gB en los pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH.

<i>Paciente n°</i>	<i>Inversa del título</i>
1	160
2	80
3	80
4	160
5	160
6	640
7	640
8	640
9	1280
10	640
11	1280
12	640
13	640
14	80
15	40
16	80
17	160
18	80
19	80
20	80
21	80
22	160
23	80
24	80
25	80

Tabla 4.32 Títulos de anticuerpos séricos anti-gB de los isotipos IgG1, 2, 3, 4 en los pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH.

<i>Paciente n°</i>	<i>Inversa del título</i>			
	<i>IgG1</i>	<i>IgG2</i>	<i>IgG3</i>	<i>IgG4</i>
1	160	0	10	0
2	80	0	20	0
3	80	0	20	0
4	160	0	10	0
5	160	0	10	0
6	640	10	10	0
7	640	0	10	0
8	640	0	10	0
9	640	0	0	0
10	640	10	10	0
11	640	20	0	10
12	640	20	10	0
13	320	0	20	0
14	80	0	10	0
15	40	0	0	0
16	40	0	0	0
17	160	0	0	0
18	80	0	0	0
19	80	0	0	0
20	40	0	0	0
21	80	0	20	0
22	320	0	10	0
23	80	0	0	0
24	80	0	0	0
25	80	0	0	0

Dada la heterogeneidad del grupo de pacientes con enfermedad orgánica por el CMVH se establecieron varios subgrupos (que incluían a pacientes más afines) de acuerdo con tres criterios: haber recibido o no tratamiento anti-CMVH con anterioridad

Resultados

a la obtención de los sueros (hasta 30 días antes), presentar pruebas de viremia y/o antigenemia positiva/s y el tipo de enfermedad provocada por el CMVH (retinitis como única manifestación u otras -uni o multifocales-). En la Tabla 4.33 se presentan los resultados de cada uno de los distintos subgrupos de estudio.

Tabla 4.33 Títulos séricos de anticuerpos anti-gB en los subgrupos de estudio de los pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH.

<i>Pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH</i>			
<i>Sin Tratamiento</i>	<i>Retinitis</i>	<i>Viremia positiva</i>	<i>Antigenemia positiva</i>
160	160	40	40
80	160	80	80
80	640	80	80
160	640	80	80
160	640	80	80
640	1280	80	80
80	640	80	80
40	1280	80	80
80	640	80	80
160	40	80	80
80	80	80	160
80	80	80	160
160	80	160	160
80	Otras	160	160
80	160	160	640
80	80	160	Antigenemia negativa
Con Tratamiento	80	160	80
640	640	640	80
640	80	640	160
1280	80	640	640
640	160	Viremia Negativa	640
1280	80	640	640
640	80	640	640
640	160	640	640
80	80	1280	1280
80	80	1280	1280

Tabla 4.34 Análisis estadístico de la comparación entre los niveles séricos de anticuerpos anti-gB en pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH tratada o no y en pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH.

Grupos comparados	Valor de P
SIDA con enfermedad orgánica por el CMVH /SIDA sin enfermedad orgánica	0.0886
SIDA con enfermedad orgánica Tratados / No Tratados	0.0043
SIDA con enfermedad orgánica por el CMVH Tratados / SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH	0.0606
SIDA con enfermedad orgánica por el CMVH No Tratados/ SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH	0.0003

Significativo estadísticamente si $P < 0.05$.

Cuando los resultados se analizaron teniendo en consideración la positividad o negatividad de las pruebas de la viremia o la antigenemia del CMVH se observó que, con independencia de la enfermedad orgánica presente, los pacientes virémicos y/o antigenémicos mostraron niveles séricos de anticuerpos anti-gB significativamente menores que los de los pacientes no virémicos y no antigenémicos (Figuras 4.32, 4.33 y Tabla 4.35).

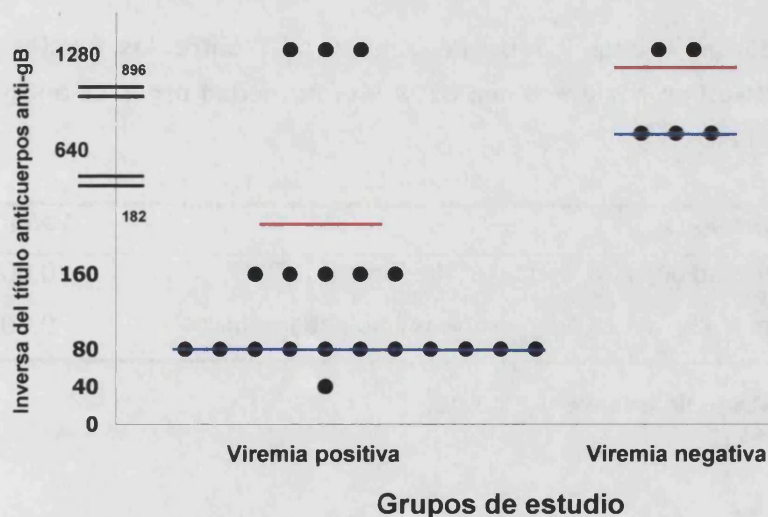


Figura 4.32 Títulos de anticuerpos séricos anti-gB en pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH con viremias positivas y negativas. La barra horizontal de color azul se corresponde con la mediana y la de color rojo con la media aritmética.

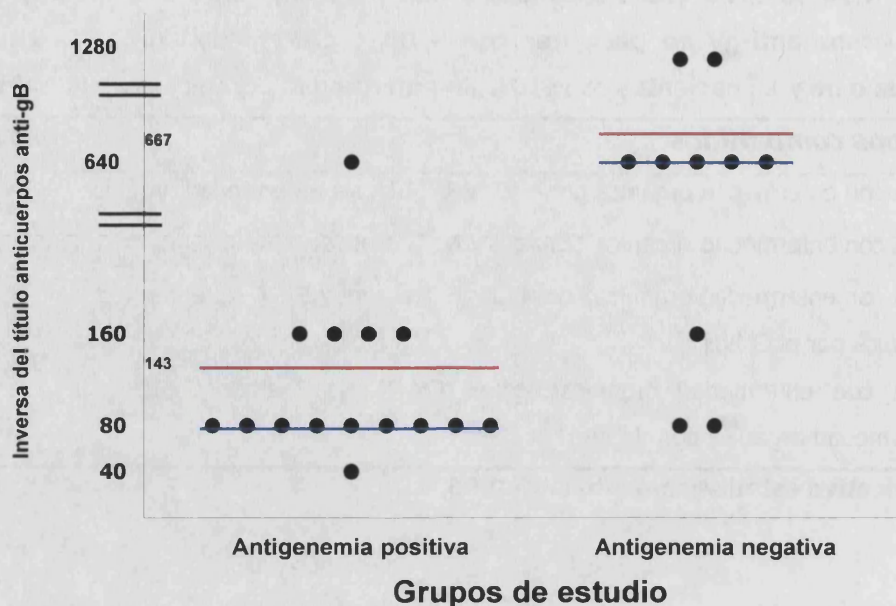


Figura 4.33 Títulos de anticuerpos séricos anti-gB en pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH con antigenemias positivas y negativas. La barra horizontal de color azul se corresponde con la mediana y la de color rojo con la media aritmética.

Tabla 4.35 Análisis estadístico de la comparación entre los niveles séricos de anticuerpos anti-gB en pacientes con SIDA y enfermedad orgánica antigenémicos o no y virémicos o no.

<i>Grupos comparados</i>	<i>Valor de P</i>
SIDA con enfermedad orgánica Virémicos / No Virémicos	0.0005
SIDA con enfermedad orgánica Antigenémicos / No Antigenémicos	0.0036

Significativo estadísticamente si $P < 0.05$.

4.2.3 Anticuerpos neutralizantes

En la Tabla 4.36 se muestran los títulos séricos de anticuerpos neutralizantes de los sueros de los pacientes con SIDA y enfermedad orgánica. Los títulos séricos de anticuerpos neutralizantes de los pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica se mostraron en la Tabla 4.15.

Tabla 4.36 Títulos de anticuerpos séricos anti-CMVH neutralizantes en los pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH.

<i>Paciente n^o</i>	<i>Inversa del título</i>
1	160
2	80
3	160
4	80
5	160
6	640
7	640
8	40
9	640
10	640
11	640
12	160
13	320
14	80
15	80
16	40
17	80
18	80
19	80
20	80
21	80
22	80
23	80
24	80
25	80

Resultados

La mediana del título de anticuerpos neutralizantes de los pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH fue significativamente menor que la de los pacientes con SIDA sin enfermedad por el CMVH (Ver Figura 4.34).

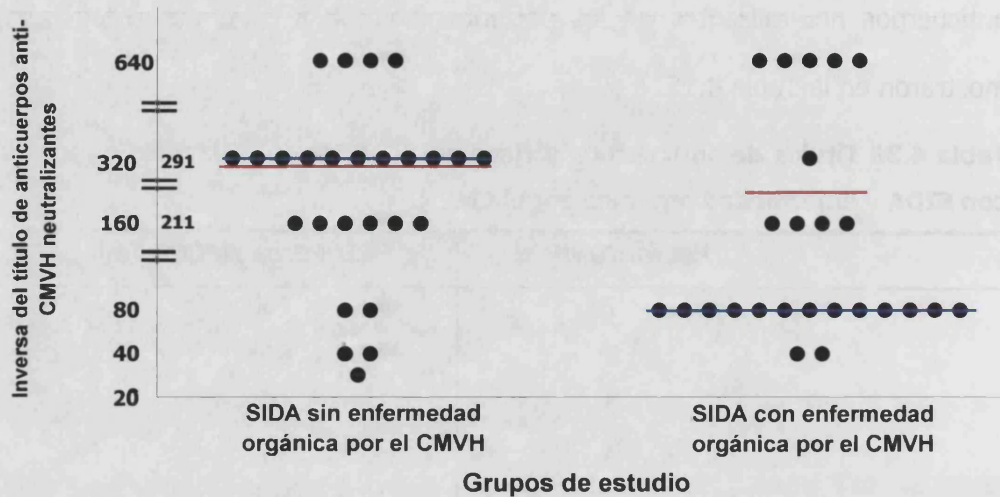


Figura 4.34 Títulos de anticuerpos séricos anti-CMVH neutralizantes en pacientes con SIDA y enfermedad orgánica tratada o no y en pacientes con SIDA sin enfermedad. La barra horizontal de color azul se corresponde con la mediana y la de color rojo con la media aritmética.

En la Tabla 4.37 se muestran los títulos séricos de anticuerpos neutralizantes anti-CMVH en función de las características clínico-terapéuticas y virológicas de los pacientes con enfermedad orgánica por el CMVH.

Tabla 4.37 Títulos séricos de anticuerpos neutralizantes en los subgrupos de estudio de los pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH.

Pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH			
Sin Tratamiento	Retinitis	Viremia positiva	Antigenemia positiva
160	640	160	40
80	640	80	40
160	640	160	80
80	640	80	80
160	640	160	80
40	160	640	80
80	80	40	80
80	80	160	80
40	160	80	80
80	40	80	80
80	80	40	80
80	80	80	80
80	80	80	80
80	Otras	80	80
80	160	80	160
80	80	80	Antigenemia negativa
Con Tratamiento	160	80	80
640	320	80	160
640	80	80	160
640	40	80	160
640	80	Viremia Negativa	320
640	80	640	640
160	80	640	640
320	80	640	640
80	80	640	640
80	80	320	640

Los pacientes con enfermedad tratada mostraron niveles de anticuerpos neutralizantes séricos significativamente mayores que los de aquellos que no habían sido tratados con independencia de la enfermedad orgánica presente.

Globalmente, los pacientes con enfermedad orgánica por el CMVH no tratada mostraron niveles de anticuerpos mayores que los pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH.

Tabla 4.37 Análisis estadístico de la comparación de anticuerpos séricos anti-CMVH neutralizantes en diferentes subgrupos de pacientes con SIDA y enfermedad orgánica y pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH.

<i>Grupos comparados</i>	<i>Valor de P</i>
SIDA con enfermedad orgánica por el CMVH /SIDA sin enfermedad orgánica	0.0287
SIDA con enfermedad orgánica por el CMVH Tratados / No Tratados	0.0014
SIDA con enfermedad orgánica por el CMVH Tratados / SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH	0.2319
SIDA con enfermedad orgánica No Tratados / SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH	0.0001

Significativo estadísticamente si $P < 0.05$.

Finalmente, los pacientes virémicos y/o antigenémicos, con independencia de la enfermedad orgánica diagnosticada, mostraron títulos de anticuerpos neutralizantes significativamente menores que aquellos correspondientes a los pacientes en los que estas pruebas resultaron negativas (Figura 4.37 y Tabla 4.38).

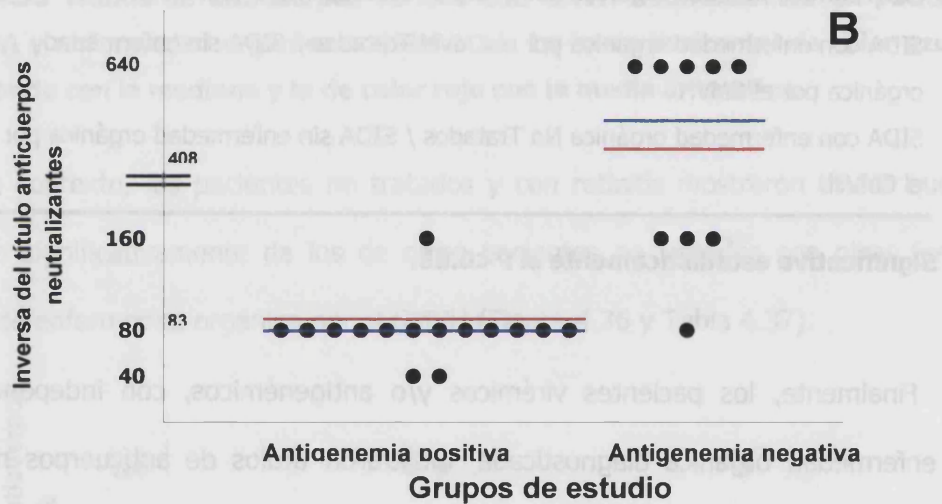
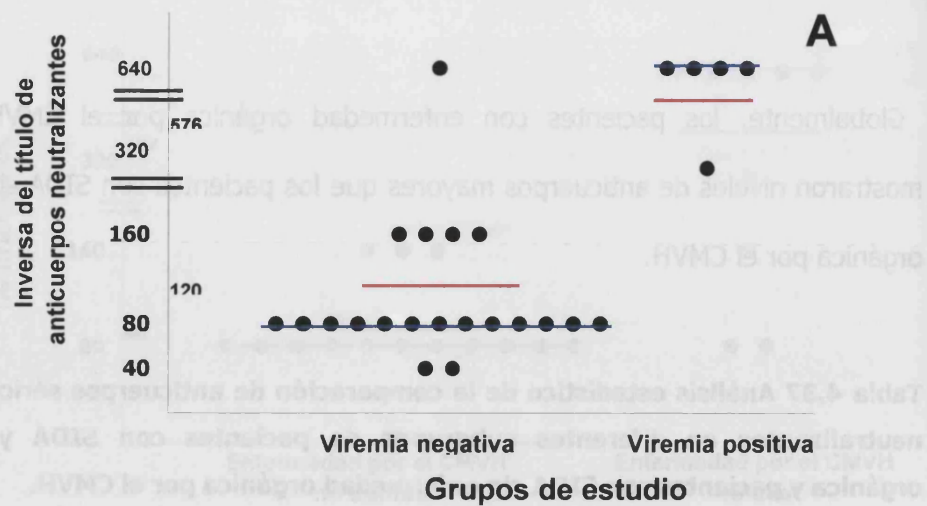


Figura 4.37 (A) Títulos de anticuerpos séricos anti-CMVH neutralizantes en pacientes con SIDA y enfermedad orgánica con viremias positivas y negativas. (B) Títulos de anticuerpos séricos anti-CMVH neutralizantes en pacientes con SIDA y enfermedad orgánica con antigenemias positivas y negativas. La barra horizontal de color azul se corresponde con la mediana y la de color rojo con la media aritmética.

Tabla 4.38 Análisis estadístico de la comparación de anticuerpos séricos anti-CMVH neutralizantes en pacientes con SIDA y enfermedad orgánica antigenémicos o no y virémicos o no.

<i>Grupos comparados</i>	<i>Valor de P</i>
SIDA con enfermedad orgánica Virémicos / No Virémicos	0.003
SIDA con enfermedad orgánica Antigenémicos / No Antigenémicos	<0.0001

Significativo estadísticamente si $P < 0.05$.

4.2.4 Anticuerpos que inhiben la expansión intercelular del virus (AIP)

En la Tabla 4.39 se muestran los títulos de anticuerpos que inhiben la expansión intercelular del virus en los pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH. Los títulos séricos de anticuerpos que inhiben la expansión intercelular del virus de los pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH se mostraron en la tabla 4.27.

Tabla 4.39 Títulos de anticuerpos séricos inhibidores de la formación de placas por el CMVH en células HFF (AIP) en los pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH.

<i>Paciente n°</i>	<i>Inversa del título</i>
1	20
2	80
3	80
4	80
5	80
6	80
7	160
8	20
9	40
10	160
11	160
12	80
13	20
14	80
15	80
16	160
17	80
18	80
19	80
20	80
21	80
22	40
23	40
24	40
25	80

La mediana del título de sérico de AIP de los pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH fue significativamente menor que la de los pacientes con SIDA sin enfermedad (Figura 4.38 y Tabla 4.41).

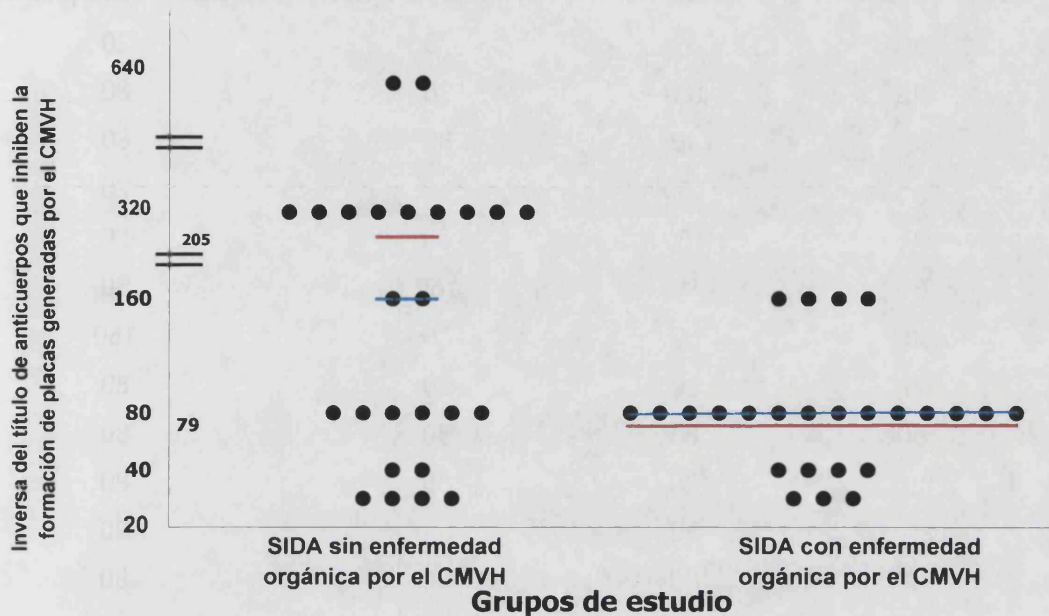


Figura 4.38 Títulos de anticuerpos séricos que inhiben la formación de placas generadas por el CMVH en células HFF (AIP) en pacientes con SIDA y enfermedad orgánica y en pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica. La barra horizontal de color azul se corresponde con la mediana y la de color rojo con la media aritmética.

En la tabla 4.40 se muestran los títulos séricos de AIP en función de las características clínico-terapéuticas y virológicas de los pacientes con enfermedad orgánica por el CMVH.

Tabla 4.40 Títulos de anticuerpos séricos que inhiben la formación de placas generadas por el CMVH en células HFF (AIP) en los subgrupos de estudio de los pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH.

<i>Pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH</i>			
<i>Sin Tratamiento</i>	<i>Retinitis</i>	<i>Viremia positiva</i>	<i>Antigenemia positiva</i>
20	80	20	20
80	160	80	80
80	40	80	80
80	160	80	20
80	160	80	80
20	80	160	80
80	80	20	160
80	80	80	80
160	80	80	80
80	20	80	80
80	80	160	80
80	80	80	80
40	40	80	40
40	Otras	80	40
40	20	80	80
80	80	80	Antigenemia negativa
Con Tratamiento	80	40	80
80	20	40	80
160	80	40	80
40	160	80	160
160	80	Viremia Negativa	40
160	80	80	160
80	80	40	160
20	40	160	80
80	40	160	20
80	80	20	40

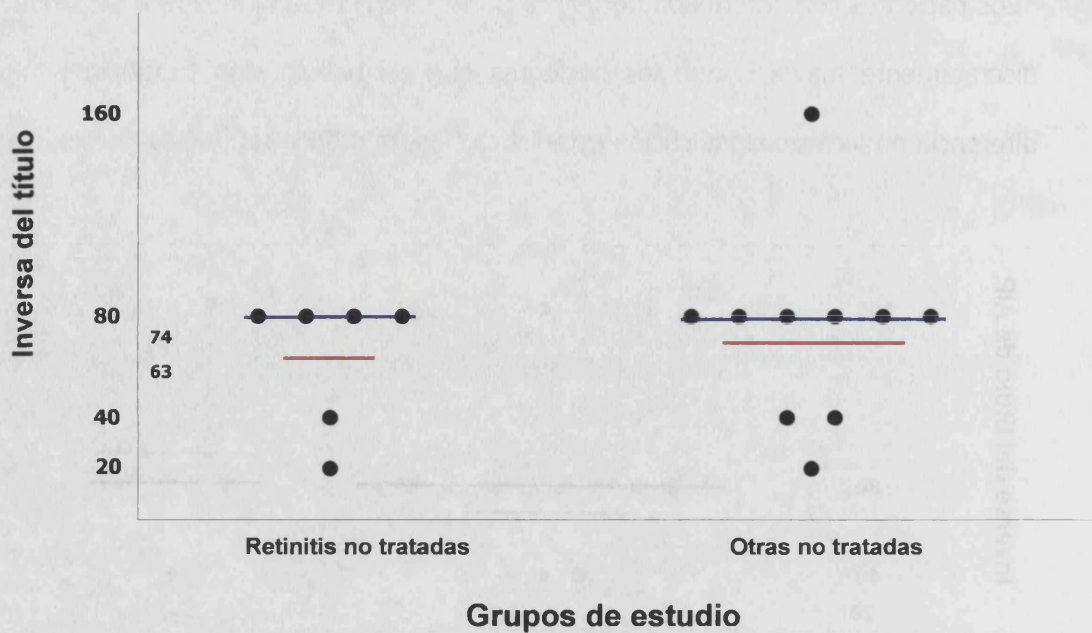


Figura 4.40 Títulos de anticuerpos séricos que inhiben la formación de placas generadas por el CMVH en células HFF (AIP) en pacientes con SIDA y retinitis no tratadas y en pacientes con enfermedad focal por el CMVH distinta de la retinitis o enfermedad multifocal. La barra horizontal de color azul se corresponde con la mediana y la de color rojo con la media aritmética.

Tabla 4.41 Análisis estadístico de la comparación entre los anticuerpos séricos que inhiben la formación de placas generadas por el CMVH en pacientes con SIDA y enfermedad orgánica antigenémicos o no virémicos o no.

<i>Grupos comparados</i>	<i>Valor de P</i>
SIDA con enfermedad orgánica por el CMVH /SIDA sin enfermedad orgánica	0.0351
SIDA con enfermedad orgánica por el CMVH Tratados / No Tratados	0.3014
SIDA con enfermedad orgánica por el CMVH Tratados / SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH	0.2401
SIDA con enfermedad orgánica No Tratados / SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH	0.0376

Significativo estadísticamente si $P < 0.05$.

La media de los títulos séricos de AIP en los pacientes virémicos, independientemente de la enfermedad orgánica presente, fue discretamente mayor que la de los pacientes no virémicos. Sin embargo, la media de los títulos séricos de AIP en los pacientes

Tabla 4.42 Análisis estadístico de la comparación entre los anticuerpos séricos que inhiben la formación de placas en pacientes con SIDA y enfermedad orgánica antígenicos o no virémicos o no.

<i>Grupos comparados</i>	<i>Valor de P</i>
SIDA con enfermedad orgánica Virémicos / No Virémicos	0.8180
SIDA con enfermedad orgánica Antígenicos / No Antígenicos	0.5305

Significativo estadísticamente si $P < 0.05$.

4.3 Análisis longitudinal de la respuesta de anticuerpos frente a la gB y neutralizantes en pacientes con SIDA con y sin enfermedad orgánica por el CMVH y en pacientes VIH-1 asintomáticos

El objetivo de esta parte del estudio fue determinar cómo evolucionan los títulos séricos de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes lo largo del tiempo en pacientes con SIDA que desarrollan una enfermedad orgánica por CMVH en relación con lo que sucede en quienes no la desarrollan, y averiguar si la respuesta virológica y biológica a las terapias antirretrovirales de gran eficacia se traduce en una alteración de los niveles séricos las especificidades de anticuerpos anteriormente mencionadas

4.3.1 Pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH en comparación con pacientes con SIDA sin enfermedad invasiva por el CMVH

Se ha analizado un total de 30 sueros pertenecientes a 6 pacientes con enfermedad orgánica por el CMVH (4 pacientes con retinitis como única manifestación y 2 retinitis asociadas a colitis) y 13 sueros de 4 pacientes con SIDA que no desarrollaron una enfermedad invasiva por el CMVH. Todos esos pacientes estaban recibiendo tratamiento antirretroviral con análogos nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa viral, pero no con inhibidores de la proteasa de VIH-1. Todos los pacientes a los que se diagnosticó una enfermedad por el CMVH recibieron tratamiento específico con ganciclovir y/o foscarnet que se prolongó durante el periodo de seguimiento. Las características de estos pacientes, entre las que cabe destacar los recuentos de células T CD4+ al inicio del periodo de estudio, se mostraron anteriormente en la sección de material y métodos (Tablas 2.5 a 2.8).

Tal y como se muestra en la Tabla 4.43, las medianas de los títulos séricos de anticuerpos anti-gB y neutralizantes en el momento en que comenzó el seguimiento de los pacientes que acabaron desarrollando una enfermedad invasiva por CMVH no difirieron de las observadas en los pacientes en que no se objetivó la presencia de enfermedad invasiva. Asimismo el recuento de células T CD4+ en ese mismo momento fue comparable en ambos grupos ($P = >0.5$).

Tabla 4.43 Títulos séricos basales de anticuerpos anti-gB y neutralizantes en pacientes con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH y en pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH seguidos longitudinalmente.

<i>Tipo de Anticuerpo</i>	<i>Inversa del título</i>		<i>Valor de P</i>
	<i>Enfermedad por el CMVH</i>	<i>Sin Enfermedad por el CMVH</i>	
Anti-gB			
Mediana	640	320	0.5887
Rango	160-640	160-640	
Neutralizantes			
Mediana	320	240	0.5886
Rango	160-640	40-640	

Significativo estadísticamente si $P < 0.05$.

La evolución de los títulos séricos de los anticuerpos mencionados en los pacientes que desarrollaron una enfermedad orgánica por el CMVH a lo largo del periodo de seguimiento se muestran en la Figura 4.42

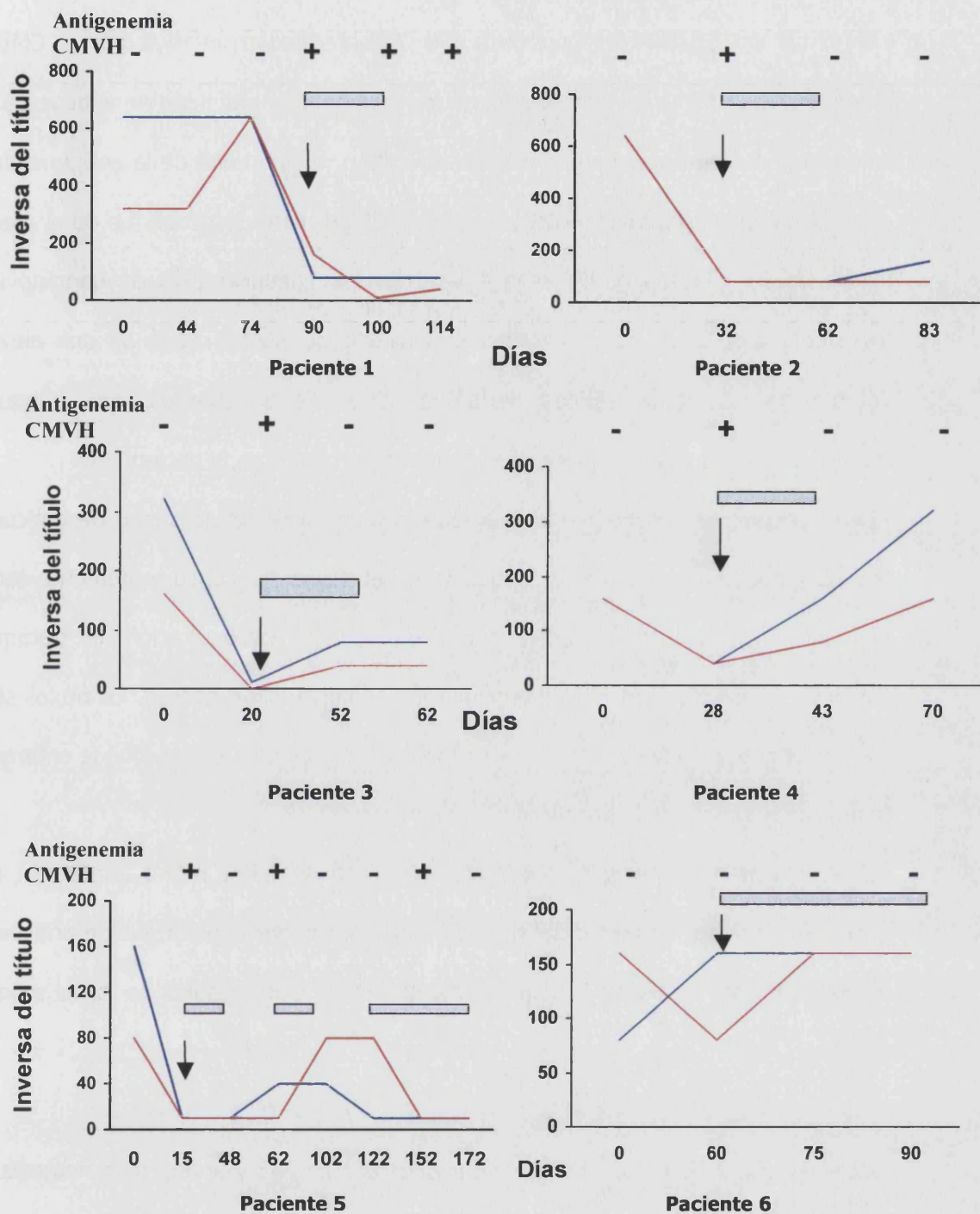


Figura 4.42 Evolución de los anticuerpos anti-gB y anticuerpos neutralizantes en los pacientes números 1, 2, 3, 4, 5 y 6 del grupo de pacientes que desarrolló enfermedad orgánica por el CMVH. Las líneas azules representan los anticuerpos anti-gB mientras que las líneas rojas representan los anticuerpos neutralizantes. Las flechas indican el inicio del tratamiento anti-CMVH y las barras horizontales su duración.

En 4 de los 6 pacientes que desarrollaron enfermedad invasiva por el CMVH se objetivó una disminución significativa de los títulos de ambos tipos de anticuerpos que se produjo concurrentemente con la positivización de la prueba de la antigenemia y el diagnóstico de la enfermedad orgánica por el CMVH. Este descenso fue de al menos 2 diluciones (el cuádruple). En esos 4 pacientes la administración de ganciclovir y/o foscarnet, a pesar de conseguir una mejoría clínica, no se siguió de una elevación notable de los títulos séricos de ambos tipos de anticuerpos, que aunque se incrementaron no alcanzaron los niveles basales, excepto en el paciente 4.

En el paciente 5 se observó un aumento sustancial del título sérico de anticuerpos anti-gB y particularmente del de anticuerpos neutralizantes concurrentemente con una mejoría clínica de la enfermedad consecuencia de la administración del tratamiento antiviral; en ese momento la antigenemia fue negativa; sin embargo, los títulos séricos de ambos anticuerpos descendieron sustancialmente cuando se reactivó la enfermedad (al mismo tiempo que se positivizó la antigenemia).

En el paciente 6, a pesar de objetivarse la presencia de una retinitis unilateral, no se observó una variación sustancial de los títulos séricos de ambos tipos de anticuerpos, si bien en este paciente la prueba de la antigenemia resultó en todo momento negativa.

La evolución de los títulos séricos de anticuerpos anti-gB y anticuerpos neutralizantes correspondientes a los pacientes en los que no se objetivó la presencia de una enfermedad orgánica a lo largo del periodo de seguimiento se muestran en la Figura 4.43.

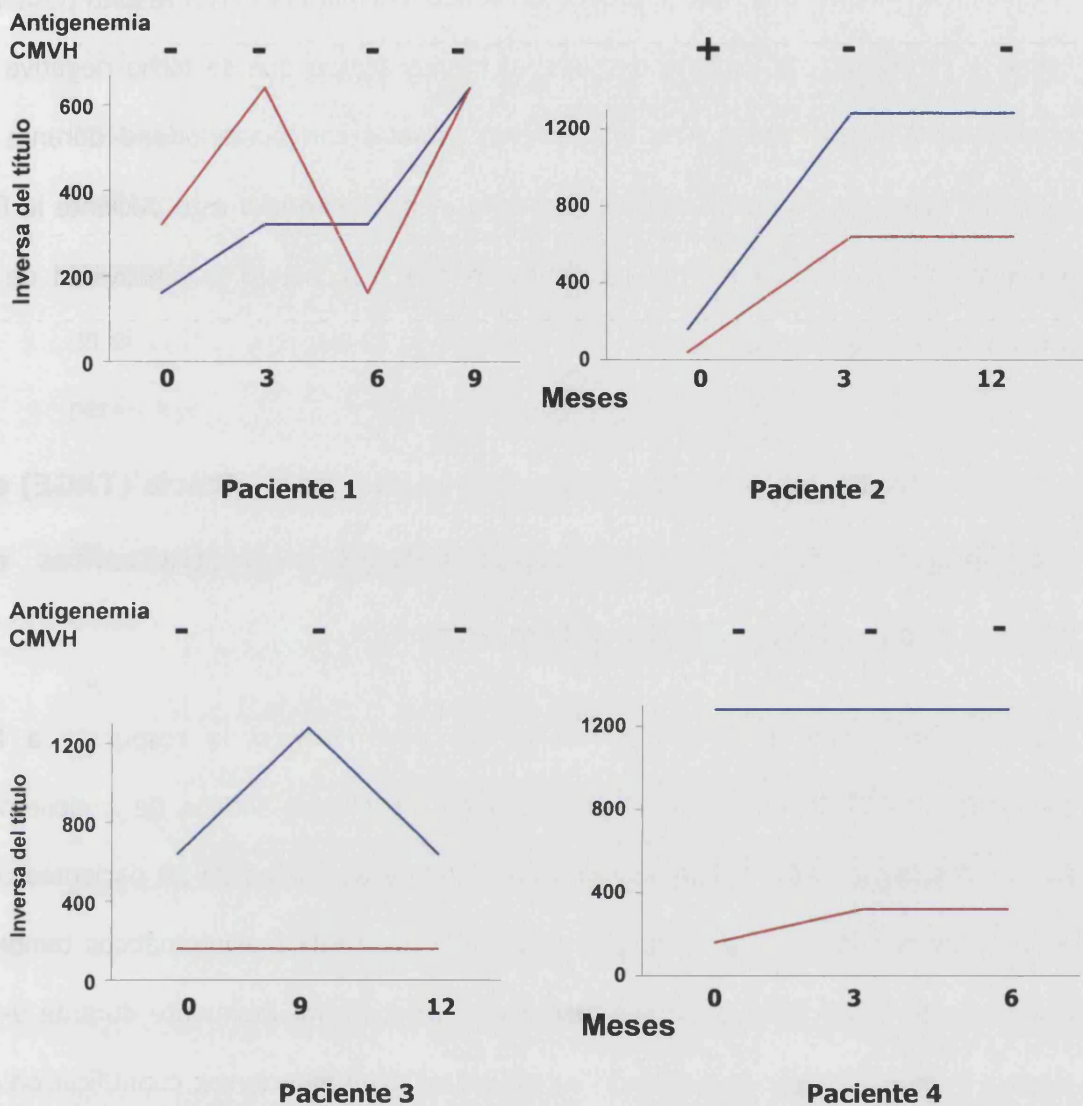


Figura 4.43 Evolución de los anticuerpos anti-gB y anticuerpos neutralizantes en los pacientes números 1, 2, 3 y 4 del grupo de pacientes que no desarrolló enfermedad orgánica por el CMVH. Las líneas azules representan los anticuerpos anti-gB mientras que las líneas rojas representan los anticuerpos neutralizantes.

En estos pacientes se observaron niveles séricos de ambas especificidades de anticuerpos relativamente estables durante el tiempo de seguimiento. Sólo en uno de estos 4 pacientes se registraron variaciones mayores de 2 diluciones en dos muestras consecutivas; concretamente, en el paciente número 2, en el que se observaron títulos

séricos bajos de ambas especificidades de anticuerpos en el inicio del periodo de seguimiento, momento en que la prueba de la antigenemia del CMVH resultó positiva; éstos se elevaron notablemente después, al mismo tiempo que se tornó negativa la prueba de la antigenemia, y se mantuvieron estables con posterioridad durante el resto del periodo de seguimiento. Es necesario mencionar que a este paciente le fue administrado el ganciclovir en el momento en que se constató la positividad de la prueba de la antigenemia.

4.3.2 Efecto del tratamiento antirretroviral de gran eficacia (TAGE) en los niveles séricos de anticuerpos anti-gB y neutralizantes en pacientes con SIDA y VIH-1 asintomáticos

El propósito de esta parte del estudio fue determinar si la respuesta a las combinaciones TAGE influía de algún modo en los niveles séricos de anticuerpos funcionales frente al CMVH. Se analizaron un total de 82 sueros de 20 pacientes con SIDA tratados con TAGE y 56 sueros de 13 individuos VIH-1 asintomáticos también tratados con TAGE. Estos pacientes fueron controlados trimestralmente durante 9-12 meses. En cada control se practicaron las siguientes determinaciones: cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos anti-gB y neutralizantes, prueba de la antigenemia pp65 del CMVH (sólo en los pacientes con SIDA), la cuantificación del ARN del VIH-1 en el plasma mediante PCR y el recuento de las células T CD4+ en la sangre periférica mediante citometría de flujo. Se consideró que el paciente había respondido a la terapia TAGE cuando se constató que el nivel plasmático de ARN de VIH-1 había descendido al menos 2 log y, concomitantemente, se había incrementado sustancialmente y de forma mantenida el número de células T CD4+ periféricas.

De los 20 pacientes con SIDA, 12 respondieron al tratamiento tanto desde el punto virológico como biológico y 8 no lo hicieron. Tanto la media de la carga viral del VIH-1 (383.000 copias/ml en los respondedores y 506.678 copias/ml en los no respondedores; $P = 0.2163$) como la media de los recuentos de células T CD4+ periféricas (56.3 células /mm³ en los respondedores y 46.5 células/mm³ en los no respondedores; $P = 0.9381$) no fueron significativamente diferentes en ambos grupos en el inicio del periodo de seguimiento (basal). El incremento medio de células T CD4+ periféricas de los pacientes que respondieron a las TAGE fue de 34.1, 67.9, 87.8 y 117.2 a los 3, 6, 9 y 12 meses tras comenzar el tratamiento, respectivamente. Seis de los 12 respondedores mostraron una reducción de al menos 2 log a los 3 meses de tratamiento de comenzar la terapia, el resto mostró cargas virales indetectables bien a los 3 meses o bien a los 6 meses de tratamiento. La prueba de la antigenemia pp65 fue negativa en todos los casos menos en uno (paciente número 5) y los títulos séricos basales de ambas especificidades de anticuerpos no difirieron significativamente (Tabla 4.44, punto 0).

En las Figuras 4.44 a 4.46 se muestra la evolución de los títulos de anticuerpos anti-gB y neutralizantes en los pacientes que no respondieron a las TAGE. Se observaron títulos séricos estables de anticuerpos con variaciones entre dos muestras consecutivas generalmente no superiores a dos diluciones. Sólo un paciente con la antigenemia positiva al principio del estudio mostró variaciones mayores (paciente número 5).

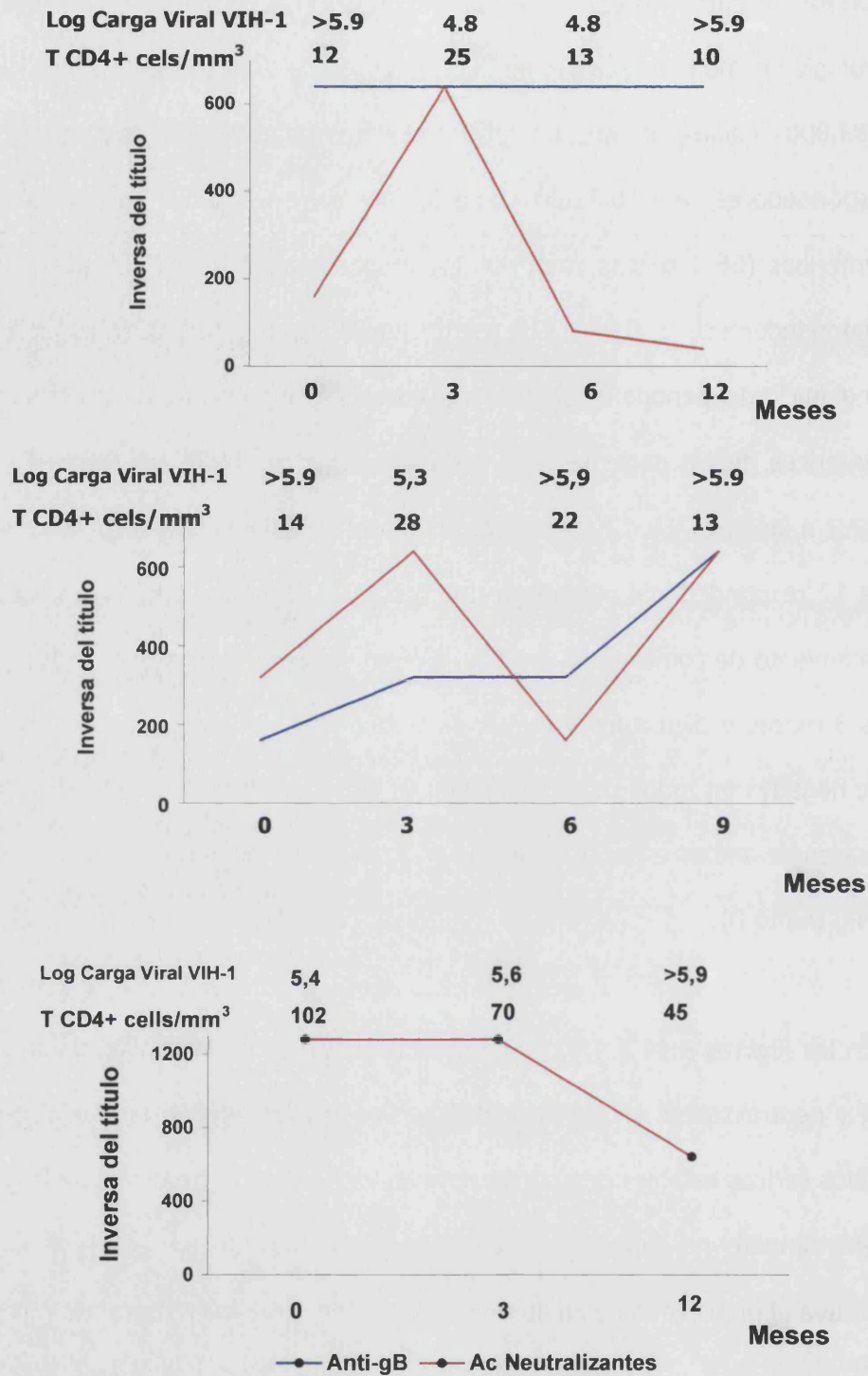
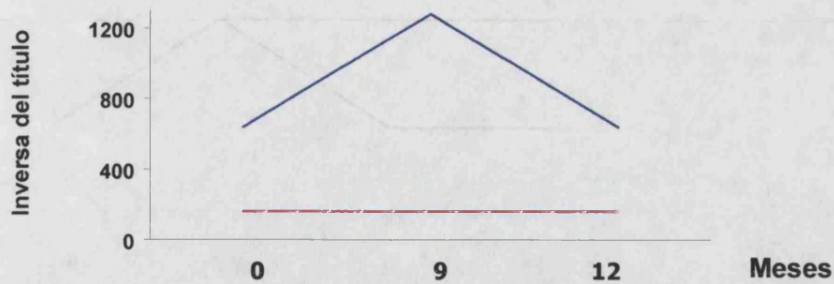
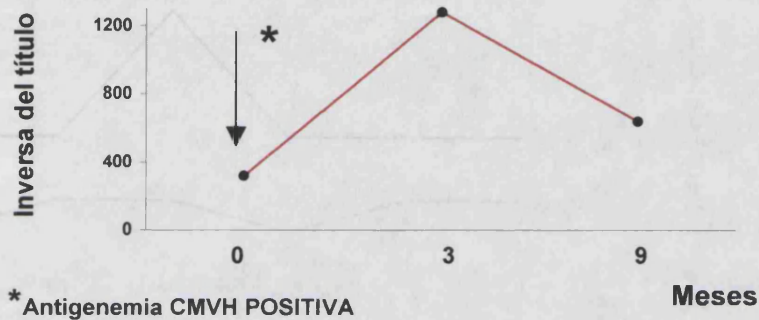


Figura 4.44 Evolución de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes de virus libre en relación con el recuento de células T CD4+ y la carga viral del VIH-1 en los pacientes número 1, 2 y 3 del grupo de pacientes con SIDA que recibieron tratamiento TAGE y no respondieron a éste.

Log Carga Viral VIH-1	>5,9	>5,9	4,7
T CD4+ cells/mm ³	6	6	20



Log Carga Viral VIH-1	>5,9	5,8	>5,9
T CD4+ cells/mm ³	18	16	13



Log Carga Viral VIH-1	<2,3	3,0	3,7	4,4
T CD4+ cells/mm ³	120	77	144	102

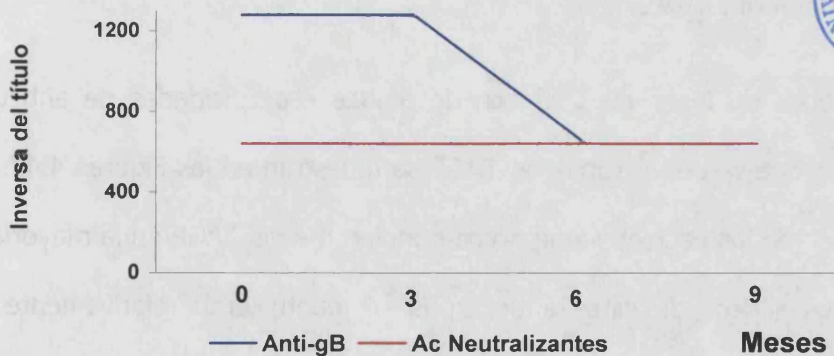
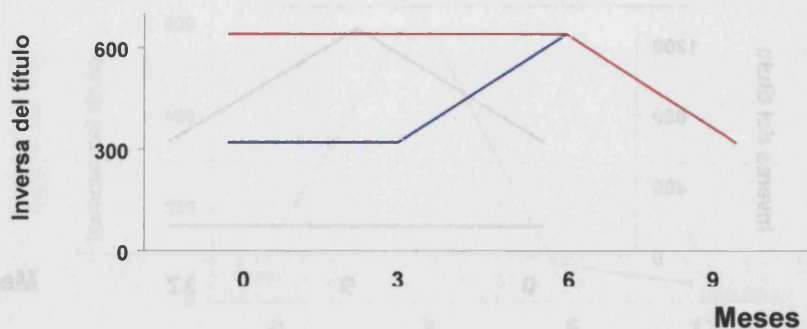


Figura 4.45 Evolución de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes de virus libre en relación con el recuento de células T CD4+ y la carga viral del VIH-1 en los pacientes números 4, 5 y 6 del grupo de pacientes con SIDA que recibieron tratamiento TAGE y no respondieron a éste.

Log Carga Viral VIH-1	5,4	4,9	4,9	4,8
T CD4+ cells/mm ³	180	132	95	42



Log Carga Viral VIH-1	5,7	3,6	5,3	4,9	3,8	5,4
T CD4+ cells/mm ³	64	270	126	126	130	150

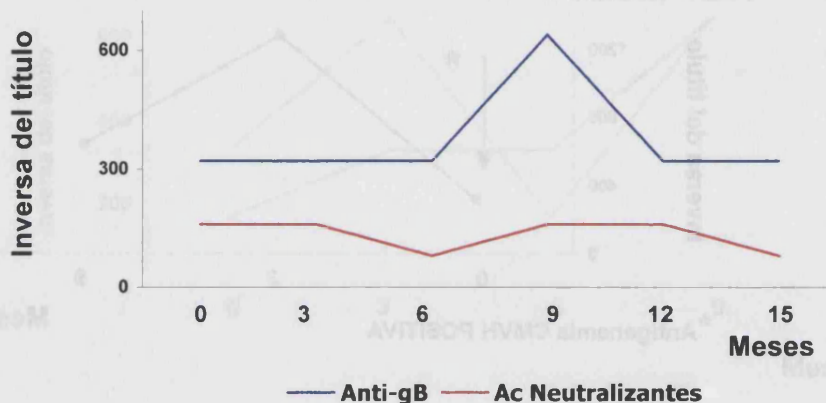
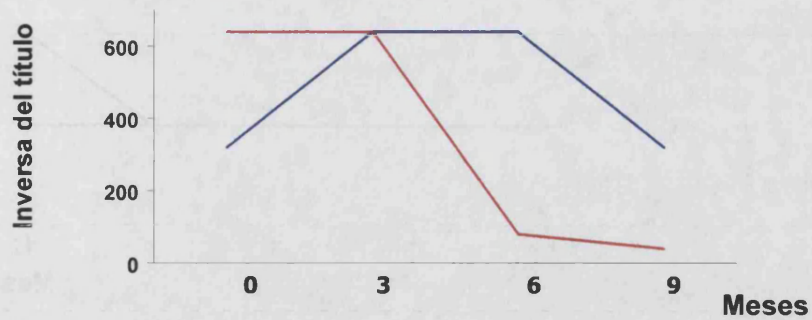


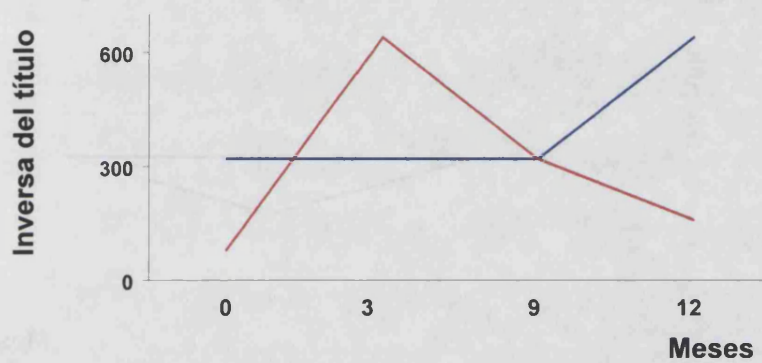
Figura 4.46 Evolución de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes de virus libre en relación con el recuento de células T CD4+ y la carga viral del VIH-1 en los pacientes números 7 y 8 del grupo de pacientes con SIDA que recibieron tratamiento TAGE y no respondieron a éste.

La cinética de los niveles séricos de ambas especificidades de anticuerpos en los pacientes que respondieron a las TAGE se muestran en las Figuras 4.47 a 4.50. Como en el caso de los pacientes que no respondieron a las TAGE en la mayoría de los casos los títulos séricos de estos anticuerpos se mantuvieron relativamente estables con pequeñas fluctuaciones (no superiores a dos diluciones), salvo en el caso del paciente número 9; las fluctuaciones no tuvieron conexión aparente con las variaciones en los niveles sanguíneos de ARN del VIH-1 y del número de células T CD4+ periféricas.

Log Carga Viral VIH-1	>5,9	>5,9	5,2	3,9
T CD4+ cels/mm ³	8	15	23	53



Log Carga Viral VIH-1	5,3	<2,3	<2,3	<2,3
T CD4+ cells/mm ³	15	62	112	143



Log Carga Viral VIH-1	5,3	4,4	3,9
T CD4+ cels/mm ³	39	71	186

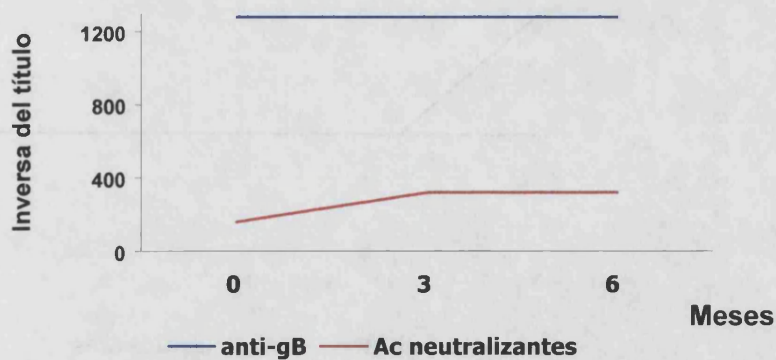


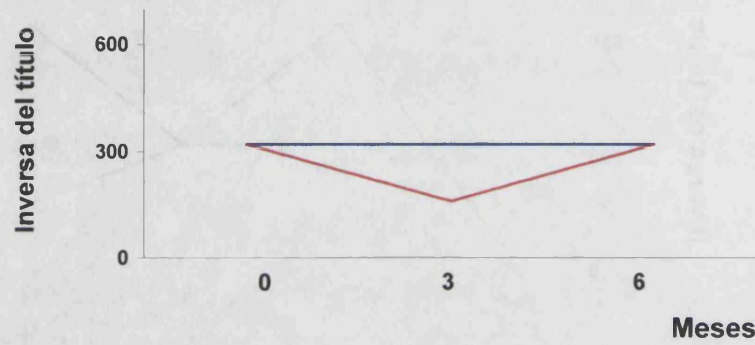
Figura 4.47 Evolución de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes de virus libre en relación con el recuento de células T CD4+ y la carga viral del VIH-1 en los pacientes números 9, 10 y 11 del grupo de pacientes con SIDA que recibieron y respondieron al tratamiento TAGE.

Resultados

Log Carga Viral VIH-1	5,7	3,3	<2,3	<2,3	<2,3
T CD4+ cells/mm ³	38	75	115	128	139



Log Carga Viral VIH-1	5,3	<2,3	3,3
T CD4+ cells/mm ³	14	165	78



Log Carga Viral VIH-1	4,3	4,4	<2,3	<2,3	<2,3
T CD4+ cells/mm ³	92	100	140	215	240

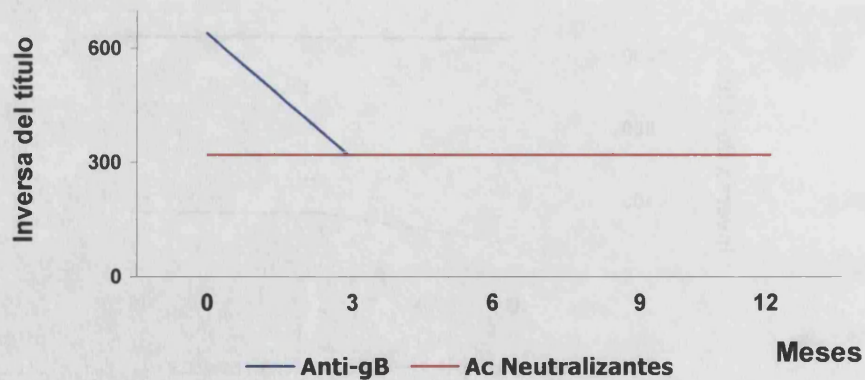
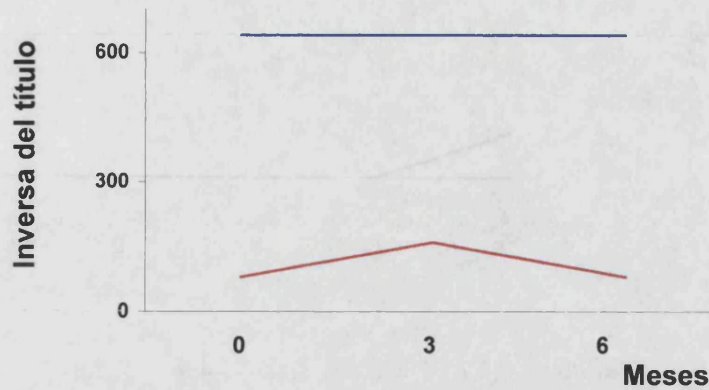
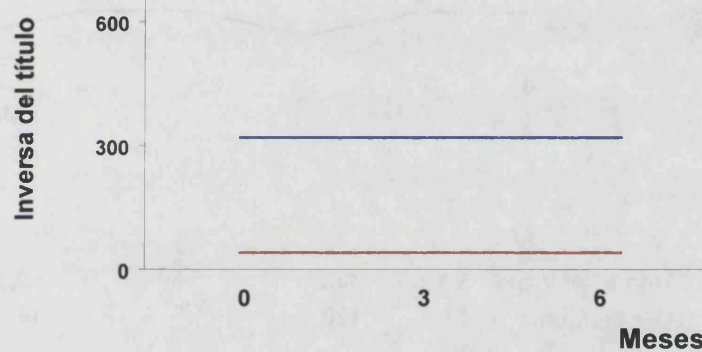


Figura 4.48 Evolución de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes de virus libre en relación con el recuento de células T CD4+ y la carga viral del VIH-1 en los pacientes números 12, 13 y 14 del grupo de pacientes con SIDA que recibieron y respondieron al tratamiento TAGE.

Log Carga Viral VIH-1	5,2	3,1	3,1
T CD4+ cells/mm ³	70	11	118



Log Carga Viral VIH-1	>5,9	5,8	3,2
T CD4+ cells/mm ³	14	18	70



Log Carga Viral VIH-1	4,7	<2,3	3,3	4,2
T CD4+ cells/mm ³	24	270	300	295

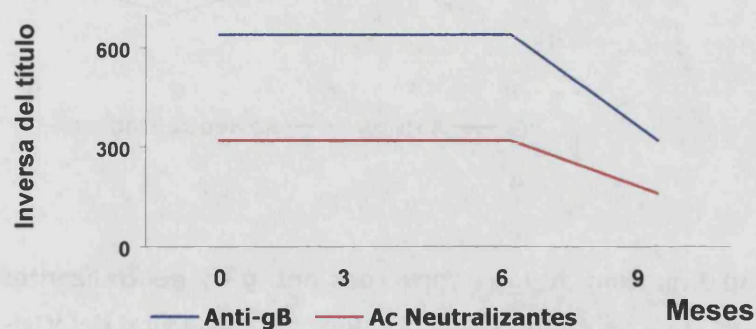
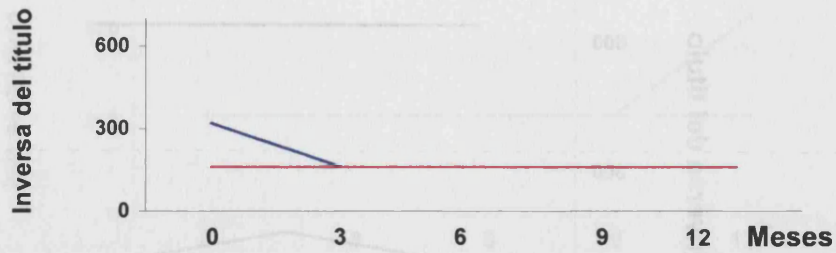
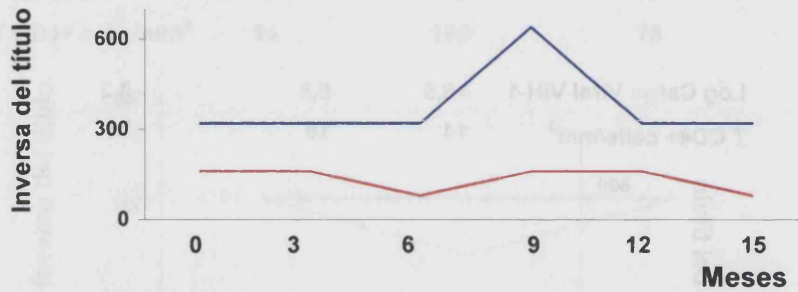


Figura 4.49 Evolución de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes de virus libre en relación con el recuento de células T CD4+ y la carga viral del VIH-1 en los pacientes números 15, 16 y 17 del grupo de pacientes con SIDA que recibieron y respondieron al tratamiento TAGE.

Log Carga Viral VIH-1	5,5	5,3	4,4	5,0	5,0
T CD4+ cells/mm ³	70	4	110	200	172



Log Carga Viral VIH-1	5,7	3,6	5,3	4,9	3,8	5,4
T CD4+ cells/mm ³	64	270	126	126	130	150



Log Carga Viral VIH-1	5,3	<2,3	<2,3	<2,3
T CD4+ cells/mm ³	74	120	18	14

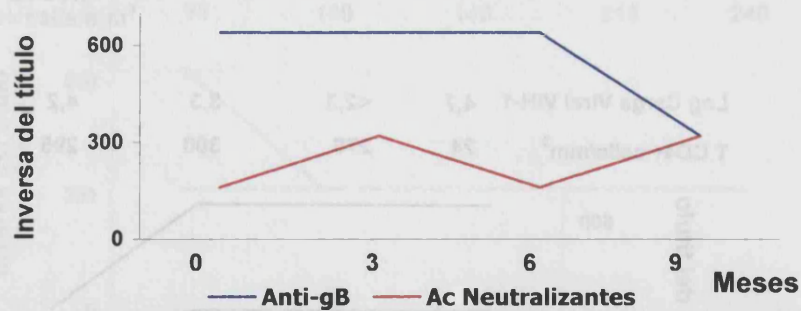


Figura 4.50 Evolución de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes de virus libre en relación con el recuento de células T CD4+ y la carga viral del VIH-1 en los pacientes números 18, 19 y 20 del grupo de pacientes con SIDA que recibieron y respondieron al tratamiento TAGE.

Prueba de que la evolución de los niveles séricos de estas especificidades eran comparables en ambos grupos de población es el hecho de que la mediana de los títulos séricos medidos en cada uno de los momentos en que los pacientes fueron controlados no difirieron significativamente (Ver Tabla 4.44).

Tabla 4.44 Mediana del título de anticuerpos anti-gB y neutralizantes en diferentes momentos del seguimiento en pacientes con SIDA que respondieron o no a las combinaciones TAGE.

<i>Tipo de anticuerpo</i>	<i>Meses</i>	<i>Inversa del Título (mediana)</i>		<i>Valor de P</i>
		Respondedor	No Respondedor	
Anti-gB	0	480	320	0.9381
	3	480	320	0.9381
	6	320	640	0.7856
	9	320	320	0.7551
	12	320	640	0.2000
Neutralizantes	0	320	640	0.2947
	3	320	640	0.2947
	6	240	400	0.1762
	9	320	320	0.3434
	12	160	160	0.8857

Significativo estadísticamente si $P < 0.05$.

Además, no se observó una correlación significativa entre los niveles séricos de ambas especificidades de anticuerpos y las cargas virales de VIH y los recuentos de células T CD4+ periféricas ($P = >0.5$).

Por lo que respecta a la población VIH-1 asintomática, todos los pacientes respondieron a las terapias TAGE. Tal y como se observa en las Figuras 4.51 a 4.55 la respuesta virológica y biológica a las TAGE no tuvo repercusión en los niveles séricos

Resultados

de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes que se mantuvieron altos y estables a lo largo del periodo de seguimiento.

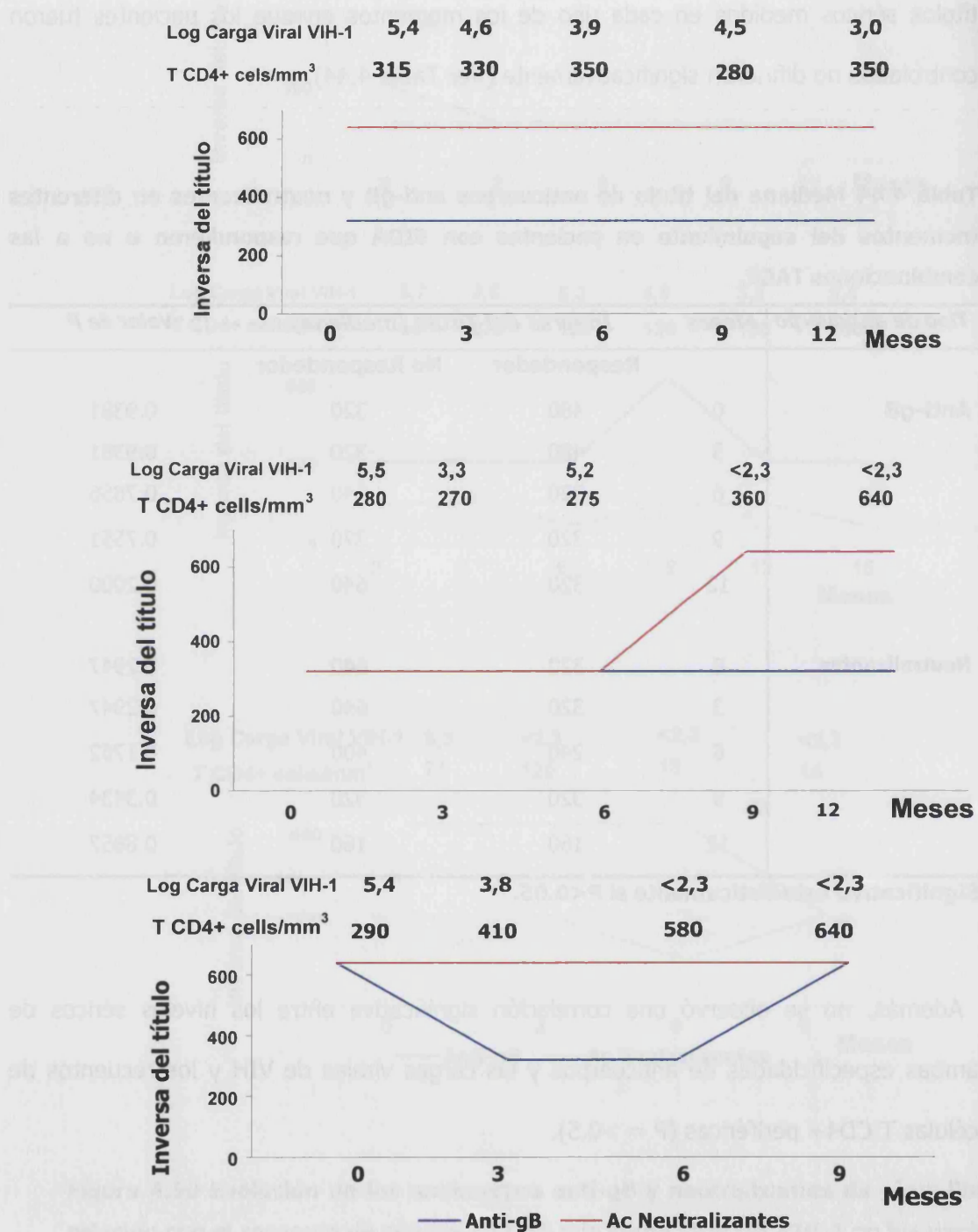


Figura 4.52 Evolución de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes de virus libre en relación con el recuento de células T CD4+ y la carga viral del VIH-1 en los pacientes números 1, 2 y 3 del grupo de pacientes infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la enfermedad que recibieron tratamiento TAGE.

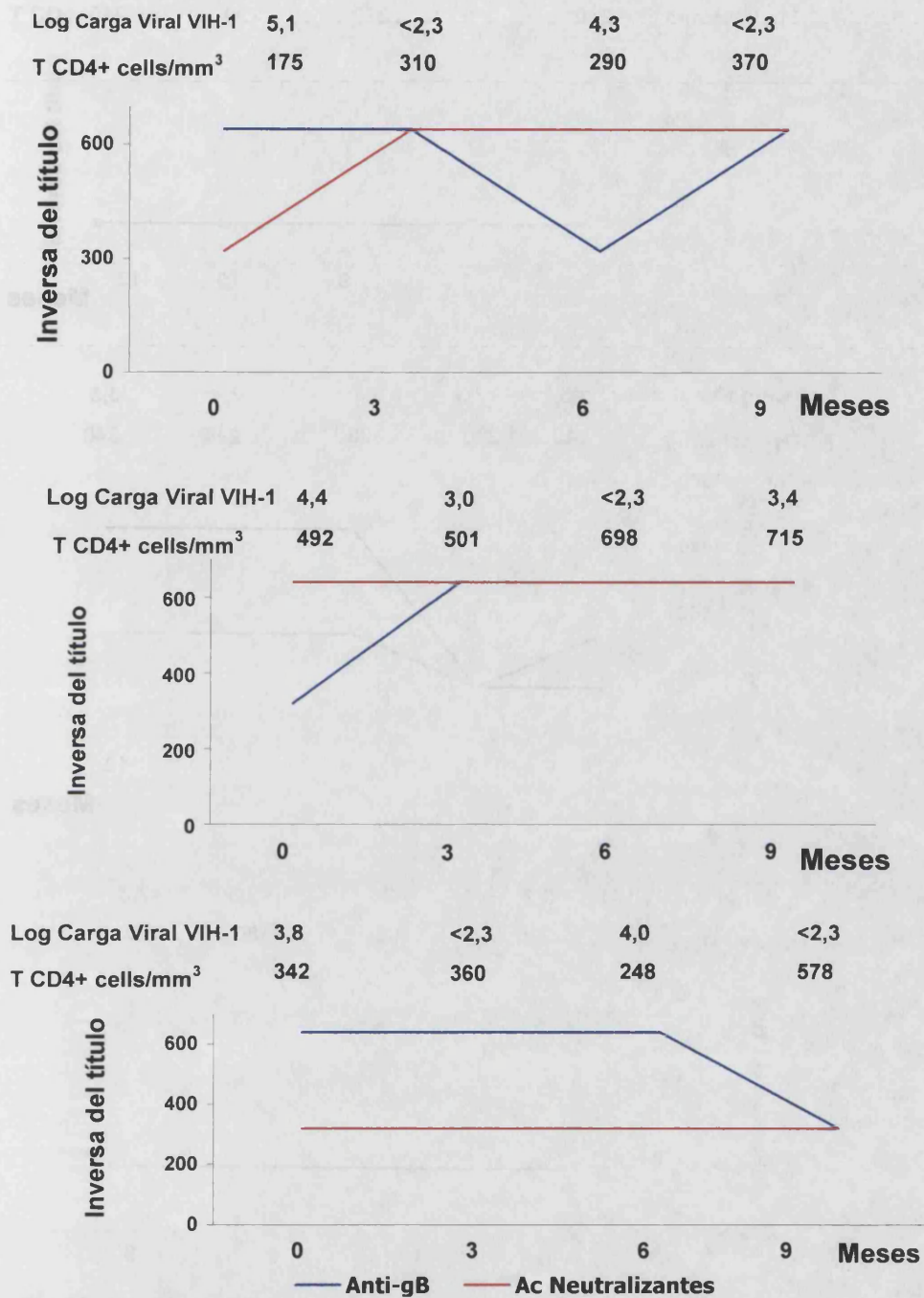
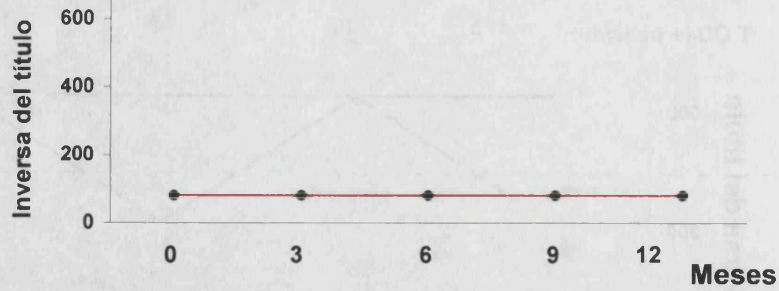


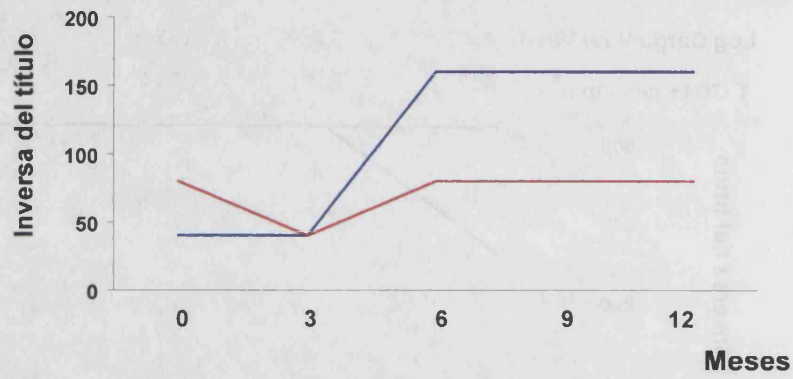
Figura 4.53 Evolución de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes de virus libre en relación con el recuento de células T CD4+ y la carga viral del VIH-1 en los pacientes números 4, 5 y 6 del grupo de pacientes infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la enfermedad que recibieron tratamiento TAGE.

Resultados

Log Carga Viral VIH-1	4,9	4,4	4,7	4,7	2,5
T CD4+ cells/mm ³	240	210	270	290	315



Log Carga Viral VIH-1	3,3	<2,3	3,4	3,4	3,5
T CD4+ cells/mm ³	140	290	300	298	640



Log Carga Viral VIH-1	3,7	4,3	<2,3	<2,3
T CD4+ cells/mm ³	270	190	350	410

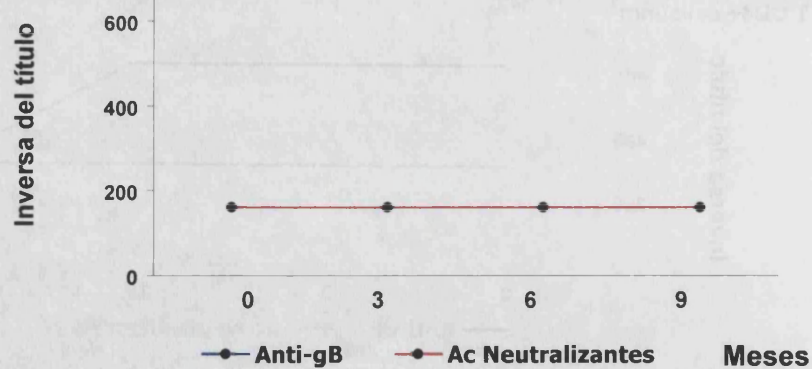


Figura 4.54 Evolución de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes de virus libre en relación con el recuento de células T CD4+ y la carga viral del VIH-1 en los pacientes números 7, 8 y 9 del grupo de pacientes infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la enfermedad que recibieron tratamiento TAGE.

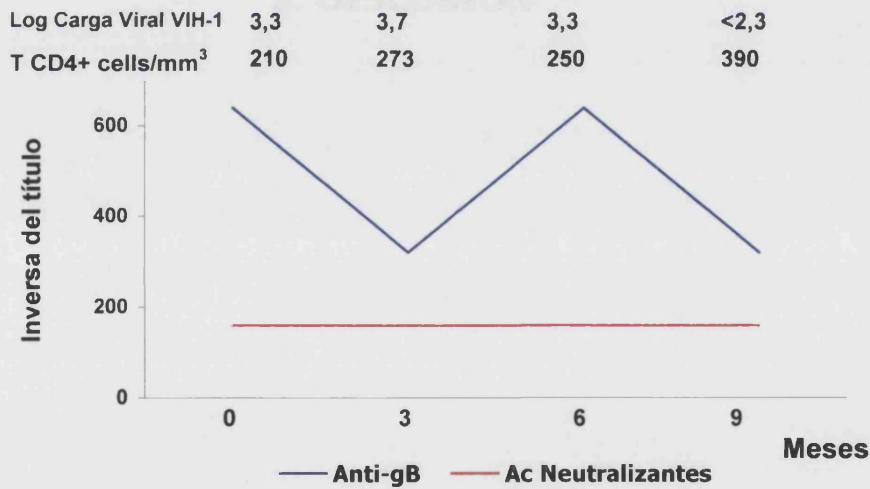
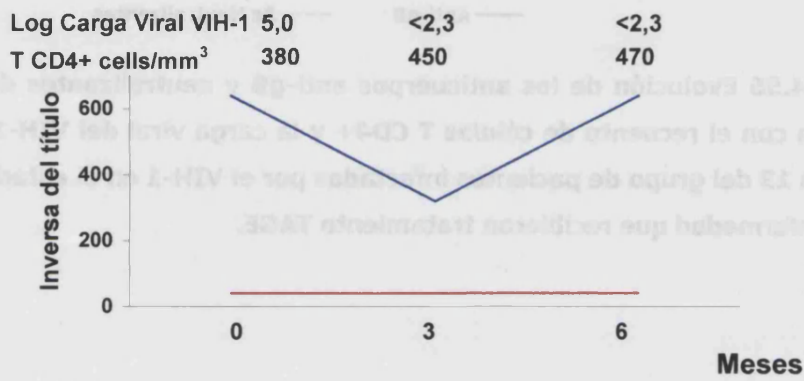
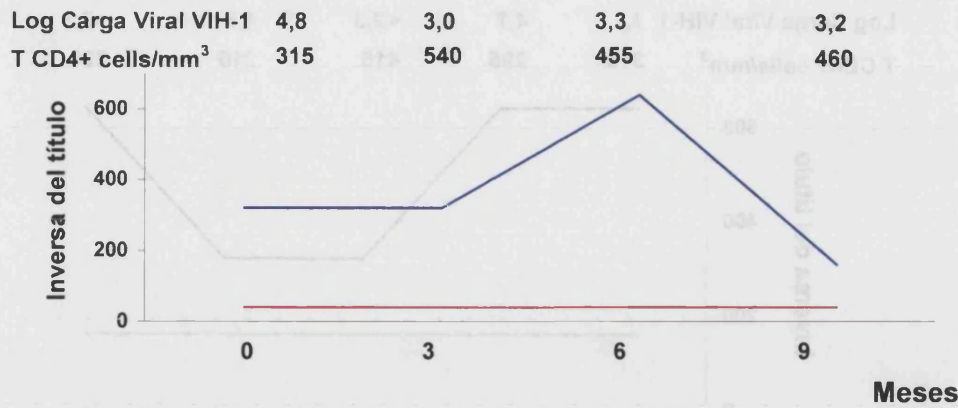


Figura 4.55 Evolución de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes de virus libre en relación con el recuento de células T CD4+ y la carga viral del VIH-1 en los pacientes números 10, 11 y 12 del grupo de pacientes infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la enfermedad que recibieron tratamiento TAGE.

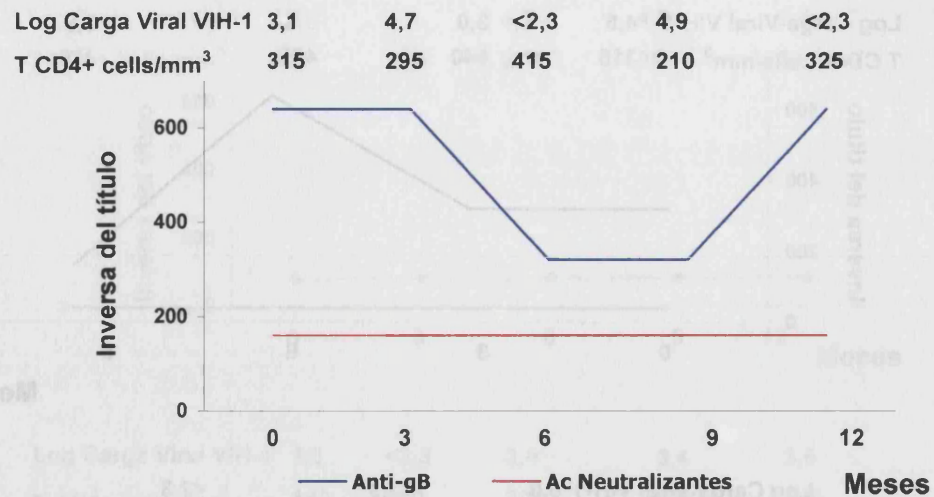


Figura 4.56 Evolución de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes de virus libre en relación con el recuento de células T CD4+ y la carga viral del VIH-1 en el paciente número 13 del grupo de pacientes infectados por el VIH-1 en el estadio asintomático de la enfermedad que recibieron tratamiento TAGE.



5. DISCUSIÓN

La reactivación de la infección latente por el CMVH es un fenómeno muy frecuente en el marco de la infección por el VIH-1, tanto más cuanto más avanza ésta; de hecho, la excreción salivar y urinaria del virus es un hallazgo común ya en el estadio asintomático de la infección (Drew, 1992). En muchos de estos pacientes, pero no en todos, resulta manifiesta la incapacidad del sistema inmunitario para controlar la reactivación del virus e impedir su posterior multiplicación y diseminación. En el paciente con SIDA la infección activa por el CMVH es la norma, y la presencia del virus en la sangre (viremia) un hecho habitual (en más de un 50% de los casos) (Fiala *et al.*, 1986; Gerna *et al.*, 1990). En ese marco, el desarrollo de una enfermedad orgánica es una eventualidad muy probable. Antes de la introducción de las terapias antirretrovirales combinadas de gran eficacia en el tratamiento de la infección por el VIH-1, hasta un 40% de los individuos con SIDA que presentaban cifras de células T CD4+ en la sangre periférica inferiores a 50/mm³ desarrollaba una enfermedad orgánica clínicamente aparente: retinitis uni o bilateral más frecuentemente, aunque también colitis y esofagitis, encefalitis y polirradiculoneuritis o neumonitis entre otras (Drew, 1992; Gallant *et al.*, 1992). Una proporción todavía mayor de estos pacientes presentaba hallazgos autópsicos compatibles con la existencia de una enfermedad orgánica producida por el CMVH (Reichert *et al.*, 1983). Con el advenimiento de aquéllas la morbilidad y mortalidad de la infección por el CMVH han disminuido considerablemente (Palella *et al.*, 1998); sin embargo, los pacientes que no responden a estas combinaciones terapéuticas desarrollan una enfermedad orgánica por el CMVH con una frecuencia comparable a la de aquellos que no las han recibido.

Por causas desconocidas, la enfermedad orgánica por el CMVH no se declara en todos los pacientes con SIDA avanzado. Tampoco todos los pacientes infectados por el VIH-1, con independencia de su grado de inmunodepresión, parecen igualmente incompetentes para controlar las infecciones activas por el CMVH. Estos hechos

sugieren que, probablemente, además de la inmunidad celular, de cuyo papel en el control de la infección por el CMVH no hay duda, otros cofactores predisponen al individuo a desarrollar una infección activa progresiva y eventualmente una enfermedad orgánica. Dejando a un lado la posibilidad de que haya cepas de CMVH más virulentas que otras (Fries *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995), o de que exista algún componente genético de predisposición individual (Schrier *et al.*, 1995), parece razonable conjeturar que el grado de eficacia de la respuesta inmunitaria humoral contra el CMVH sea uno de ellos; en este estudio, nos propusimos investigar esta posibilidad, cuya plausibilidad viene avalada por varios estudios recientes a los que nos referiremos más adelante. Se investiga en este estudio, por lo tanto, la posibilidad de que los pacientes infectados por el VIH-1 generen una respuesta de anticuerpos frente al CMVH anormal en comparación con la de los individuos inmunocompetentes y de que los pacientes con SIDA en los que se declara una enfermedad orgánica por el CMVH presenten, en comparación con aquellos otros pacientes con idéntico grado de inmunodepresión que no la desarrollan, una respuesta deficitaria de anticuerpos funcionales contra el CMVH.

Existen datos experimentales obtenidos en el modelo murino y distintas observaciones en humanos, tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos, de los que se infiere la importancia de los anticuerpos funcionales en el control de la infección por el CMVH, muy particularmente, en el bloqueo de la diseminación del virus. En un estudio realizado por Jonjic *et al.*, (1994) en un modelo experimental murino se concluye que los anticuerpos con actividad neutralizante anti-CMVM no son esenciales para la resolución de la infección primaria pero contribuyen decisivamente a la resolución de las reactivaciones por el CMVM, impidiendo, específicamente, la diseminación del virus libre (extracelular). Estos autores llegaron a esta conclusión al

observar que ciertos ratones mutantes incapaces de sintetizar inmunoglobulinas presentaban cargas virales tisulares, después una reactivación inducida de la infección latente (tras irradiación), sustancialmente mayores (100 a 1000 veces) que las de unos ratones inmunocompetentes control. Esta situación no se producía si a los ratones inmunodeficientes se les administraban anticuerpos neutralizantes antes de ser expuestos al inóculo viral. Igualmente, en un modelo murino de retinitis, Hayashi *et al.* (1995) observaron que la administración pasiva de anticuerpos neutralizantes prevenía el desarrollo de la enfermedad por el CMVM cuando ésta se hacía antes de la inoculación del virus y reducía su gravedad cuando la infusión se producía con posterioridad a la del inóculo viral.

En humanos, por ejemplo, se ha constatado que la presencia en la embarazada de anticuerpos neutralizantes -sintetizados antes de la concepción- está vinculada con la protección del feto y neonato frente a la infección sintomática por el CMVH (Fowler *et al.*, 1992; Adler *et al.*, 1995). Por otra parte, los datos obtenidos a partir de un ensayo clínico con un prototipo vacunal (virus inactivado de la cepa Towne) administrado a una población de trasplantados renales seronegativos sugieren la existencia de una correlación significativa entre los niveles de anticuerpos neutralizantes alcanzados tras la vacunación y el grado de protección frente a la infección primaria por el CMVH (Plotkin *et al.*, 1990). En el paciente sometido a trasplante alogénico de médula ósea se ha encontrado una relación directa entre la síntesis de anticuerpos funcionales contra el CMVH- que reconocen la glucoproteína B- en respuesta a una infección activa y un menor riesgo de desarrollar una enfermedad orgánica (Schoppel *et al.*, 1998). En esta misma población Lazzarotto *et al.*, (1998) demostraron que el riesgo de desarrollar una enfermedad orgánica por el CMVH era mayor en los pacientes en los que se acreditaba una demora en la síntesis de anticuerpos con elevada avidéz por el CMVH, esto es de los anticuerpos más eficaces contra el CMVH, que en aquellos otros

en los que ésta se producía con normalidad. Finalmente la administración pasiva y profiláctica de inmunoglobulinas humanas (enriquecidas o no de anticuerpos contra el CMVH) a receptores de trasplante alogénico de médula ósea y de trasplante hepático disminuye la incidencia de enfermedad injerto contra huésped aguda y de neumonitis por el CMVH, aunque no afecta a la frecuencia con que se declara la infección activa por el virus (Guglielmo *et al.*, 1994). No hay, sin embargo, estudios concluyentes en relación con el papel de los anticuerpos funcionales frente al CMVH en el control de la infección por el virus en el marco de la infección por el VIH-1.

De entre los anticuerpos que se sintetizan en respuesta a la infección por CMVH, sólo se ha acreditado que aquellos con actividad neutralizante de virus libre confieren un cierto grado de protección frente a la infección por el CMVH. La mayoría de los anticuerpos neutralizantes que se producen tras la infección natural por el CMVH en el individuo inmunocompetente reconocen una glucoproteína de la envoltura del virus denominada gB (Britt *et al.*, 1988; 1990; Rasmussen *et al.*, 1991; Marshall *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 1997). Es ésta, junto con la gH, la glucoproteína más inmunogénica del CMVH (Pereira *et al.*, 1982; 1983; Liu *et al.*, 1988; Gonczol *et al.*, 1990; Kniess *et al.*, 1991; Rasmussen *et al.*, 1991; Qadri *et al.*, 1992; Wang y Adler, 1996; Navarro *et al.*, 1997). Con base en datos de experimentos de absorción de sueros con gB recombinante se ha calculado que entre el 40-70% del total de la capacidad neutralizante del suero en personas inmunocompetentes infectadas de forma natural por el virus se debe a los anticuerpos frente a la gB (Britt *et al.*, 1990; Marshall *et al.*, 1992). Muchos de estos anticuerpos reconocen específicamente un determinante antigénico básicamente lineal (aunque su constitución depende en parte de la estructura secundaria de la proteína) denominado AD-1 y localizado en el extremo carboxi-terminal de la proteína (gp55)(Utz *et al.*, 1989; Wagner *et al.*, 1992;

Urban *et al.*, 1992). Otros sin embargo, a tenor de los resultados obtenidos en experimentos de competencia entre anticuerpos monoclonales murinos neutralizantes de especificidad conocida y sueros humanos por unirse a gB recombinante (Navarro *et al.*, 1997), reconocen epítomos conformacionales tanto en el extremo carboxi-terminal de la proteína como en el amino-terminal (gp116) (Qadri *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 1997). También existen evidencias experimentales que indican que determinados anticuerpos anti-gB con especificidades concretas son también capaces de mediar actividades biológicas antivirales de naturaleza distinta de la propia neutralización del CMVH extracelular. Así se han sintetizado anticuerpos monoclonales murinos que reconocen epítomos conformacionales en la gB que son capaces de bloquear selectivamente la penetración del CMVH en el interior de la célula diana, de impedir la transmisión intercelular de virus y de mediar citotoxicidad dependiente de anticuerpos-ADCC (Navarro *et al.*, 1993; Tugizov *et al.*, 1994; 1995). Por lo tanto el análisis de la respuesta contra la gB permite evaluar, aunque indirectamente, no sólo la capacidad neutralizante global del individuo contra el CMVH sino también otras actividades biológicas antivirales *in vitro* de cuya relevancia en el control de la infección por el CMVH poco o nada se sabe.

El resto de la actividad neutralizante del suero parece deberse, fundamentalmente, a los anticuerpos contra la gH (Urban *et al.*, 1996), aunque no es descartable que otros anticuerpos de especificidades distintas de las mencionadas, quizá particularmente aquellos que reconocen otros complejos glucoproteicos de la cubierta viral también contribuyan en la actividad neutralizante global del suero.

A pesar de lo anterior, sin embargo, no puede descartarse que anticuerpos con una actividad funcional antiviral distinta de la propiamente neutralizante de virus libre intervengan decisivamente en el control de la infección por el CMVH; en ese sentido, los anticuerpos capaces de bloquear la transmisión intercelular del virus podrían

desempeñar igualmente un papel relevante en el control de la infección replicativa por el CMVH habida cuenta del marcado carácter intracelular de este virus, particularmente de las cepas naturales, y de su preferencia por expandirse intercelularmente. Es posible también que un mismo anticuerpo sea capaz de mediar ambas actividades: el bloqueo de la expansión intercelular y la neutralización de virus extracelular libre. No obstante, no existe ningún estudio en la literatura que permita inferir el potencial de los anticuerpos con esta capacidad biológica en el control de la infección activa por el CMVH.

Con base en los argumentos expuestos arriba y con objeto de estimar la capacidad de sistema inmunitario humoral de los individuos incluidos en este estudio para hacer frente a la infección activa por el CMVH se resolvió analizar los niveles séricos de los anticuerpos anti-gB, neutralizantes de virus libre e inhibidores de la transmisión intercelular del virus.

5.1 Caracterización de la respuesta de anticuerpos funcionales contra el CMVH en el paciente infectado por el VIH-1

Nos propusimos, en primera instancia, analizar cuantitativa y cualitativamente la respuesta inmunitaria humoral en individuos infectados por el VIH-1, en particular, tal y como se ha justificado en el epígrafe anterior, la de los anticuerpos con actividad biológica potencial frente al CMVH; esto es: los anticuerpos anti-gB, neutralizantes de virus libre, y los anticuerpos que inhiben la transmisión intercelular del virus. La idea que justificaba este propósito era que, dada la incapacidad del sistema inmunitario de gran parte de estos individuos de prevenir el desarrollo y controlar las infecciones activas por el CMVH era posible que aquélla fuera deficitaria o cualitativamente

anormal en este grupo de individuos en comparación con la de la población inmunocompetente.

Los datos que se presentan en este estudio indican que los niveles séricos de las distintas especificidades analizadas de anticuerpos funcionales frente al CMVH en los pacientes infectados por el VIH-1 son significativamente mayores que los que se observan en sujetos inmunocompetentes control.

En la población infectada por el VIH-1 los niveles séricos de estos anticuerpos son tanto mayores cuanto más avanzada se encuentra la enfermedad; de hecho fueron significativamente mayores en los pacientes con SIDA que en los individuos con una infección asintomática por el VIH-1 y se encontraron los niveles máximos en los pacientes con SIDA y recuentos de células T CD4+ inferiores a 50 células/mm³. Estos resultados demuestran que no existe un déficit cuantitativo en la respuesta de anticuerpos funcionales frente al CMVH en el paciente infectado por el VIH-1 ni siquiera en el estadio de SIDA terminal sino todo lo contrario.

Los resultados de este estudio apoyan los datos publicados con anterioridad por otros investigadores. Así, Lutch *et al.* (1994) cuantificaron los anticuerpos séricos IgG contra el CMVH (virus completo-mediante un ELISA comercial-), anticuerpos neutralizantes de virus libre independientes de la acción del complemento (mediante un ensayo rápido similar al utilizado en nuestro estudio) y anticuerpos que reconocen epítomos continuos de la gB (de su extremo aminoterminal) y la fosfoproteína pp150 (mediante ELISA utilizando como sustrato antigénico péptidos sintéticos) en 23 pacientes con SIDA (grupo IV del CDC), 19 pacientes infectados por el VIH-1 pero asintomáticos (grupos II y III del CDC) y en 7 pacientes control (no infectados por el VIH-1 y supuestamente inmunocompetentes). Estos autores encontraron que los sueros con mayores niveles de todas las especificidades de anticuerpos a las que se ha aludido anteriormente pertenecían a individuos con SIDA y recuentos de CD4 inferiores a 100/mm³. En todo

caso, los niveles séricos de estos anticuerpos en los pacientes infectados por el VIH-1 siempre fueron significativamente mayores que los encontrados en pacientes sanos control. Es más, estos autores encuentran niveles muy elevados de anticuerpos frente a cepas autólogas de CMVH, es decir las que infectaban a estos mismos pacientes, además de frente a la cepa de laboratorio AD169, la utilizada en nuestro estudio. Por su parte, Rasmussen *et al.*, (1994) cuantificaron los niveles de anticuerpos séricos contra la gB en un grupo de pacientes infectados por el VIH-1 en distintos estadios evolutivos de la infección. Para la cuantificación de los anticuerpos anti-gB utilizaron un ELISA en el que el antígeno era la gB recombinante sintetizada por células eucariotas (CHO) y por lo tanto correctamente glucosilada. La proteína era recogida y purificada a partir del sobrenadante de las células al ser excretada (esta forma recombinante de gB carecía de la secuencia de anclaje a la membrana celular). Estos investigadores encontraron niveles de anticuerpos anti-gB significativamente mayores en el grupo de población integrado por pacientes con recuentos de células T CD4+ inferiores a 100 células/mm³ que en el grupo constituido por pacientes con recuentos de células T CD4+ superiores a 100 células/mm³ y que en la población inmunocompetente control. También Boppana *et al.*, (1995) cuantificaron anticuerpos neutralizantes y anticuerpos anti-gB, estos últimos mediante un radioinmunoanálisis (RIA) que utilizaba como antígeno de la reacción la gB producida de forma recombinante en células eucariotas y purificada a partir del sobrenadante de los cultivos (por lo tanto, al igual que en el caso de Rasmussen *et al.* (1994), gB glucosilada y truncada), y encontraron resultados similares a los de Rasmussen *et al.*, (1994) y a los nuestros.

Puesto que los en los pacientes infectados por el VIH-1 es fácilmente constatable la presencia de una hipergammaglobulinemia, presumiblemente consecuencia de una estimulación policlonal de linfocitos B, quisimos saber si era ésta la causa de las diferencias observadas en los niveles séricos de las distintas especificidades de

anticuerpos contra el CMVH entre los grupos de población estudiados. No se encontró una correlación significativa entre los niveles séricos individuales de los distintos anticuerpos anti-CMVH y el de inmunoglobulinas. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los niveles medios de inmunoglobulinas en los pacientes con SIDA y en los pacientes VIH-1. Estos datos apoyan los publicados por Rasmussen *et al.*, (1994) e indican que los individuos infectados por el VIH-1, con independencia de su grado de inmunodepresión celular, son capaces de sintetizar grandes cantidades de anticuerpos funcionales anti-CMVH. Es muy probable que el estímulo del que se deriva esta síntesis exagerada de anticuerpos anti-CMVH sea la replicación persistente e incontrolada del CMVH; ésta es tanto más evidente cuanto más avanza la infección por el VIH-1; este hecho explicaría que los niveles de anticuerpos en los pacientes con SIDA fueran significativamente mayores que en los de los pacientes en el estadio asintomático de la infección por el VIH-1. Por otra parte, con base en estos datos puede conjeturarse que, dada la inmunodepresión celular presente en muchos de estos pacientes, o bien la mayoría de los anticuerpos que se generan en estos pacientes reconocen epítomos T-independientes o bien que se necesita un número muy escaso de células T CD4+ para colaborar en la producción de anticuerpos que reconozcan epítomos T-dependientes del CMVH. No es posible, por el momento, saber cuál de las dos posibilidades se corresponde con la realidad y si en el caso de que la primera fuera confirmada si tendría alguna trascendencia funcional en la defensa inmunitaria contra el CMVH.

De lo que no cabe duda es de que la disponibilidad de grandes cantidades de anticuerpos funcionales anti-CMVH libres no impide la reactivación de la infección latente del CMVH, su replicación activa y excreción, ni el paso del virus al torrente circulatorio: en algunos de nuestros pacientes se pudo constatar la existencia de

excreción urinaria de virus y en ocasiones su presencia en la sangre (viremia) en presencia de títulos séricos muy altos de anticuerpos funcionales anti-CMVH.

Nos preguntamos a continuación si la calidad, ya que no la cantidad, de la respuesta humoral contra el CMVH era deficiente en el paciente infectado por el VIH-1 en relación con la del individuo inmunocompetente control. Si así fuera podríamos explicar la incapacidad de los infectados por el VIH-1 para controlar las infecciones activas por CMVH a pesar de generar gran cantidad de anticuerpos presuntamente funcionales contra él. Nos propusimos, en primera instancia, estudiar la respuesta isotípica (de subclases) IgG contra la gB del CMVH. Es sabido que las propiedades biológicas de las IgGs, entre ellas las que presumiblemente median la actividad inmunológica humoral contra el CMVH *in vivo*, varían en función del isotipo o subclase. Así, las IgG1 y en particular las IgG3, no sólo son las inmunoglobulinas dotadas de mayor capacidad para neutralizar virus libre extracelular, función analizada en el presente estudio, sino también para fijar el complemento y provocar con ello la lisis de partículas víricas libres, y mediar la citolisis de células infectadas a través de la acción de las células NK (ADCC-antibody dependent cellular cytotoxicity) (Spiegelberg *et al.*, 1974; Michaelsen *et al.*, 1991), actividades estas no evaluadas en el presente estudio. Observamos que la respuesta isotípica de IgGs contra la gB en los pacientes infectados por el VIH-1, tanto en el estadio asintomático como en el del SIDA, era cualitativamente similar a la de los sujetos inmunocompetentes control; esto es, predominantemente del isotipo IgG1 y, en menor medida, del isotipo IgG3, y la práctica ausencia en la mayoría sueros de anticuerpos específicos de los isotipos IgG2 e IgG4. No obstante, los niveles séricos medios del isotipo IgG1 contra la gB, aunque no los de IgG3, fueron significativamente mayores en la población infectada por el VIH-1, particularmente en los pacientes con SIDA, que en la población inmunocompetente control. Nuestros resultados, en lo que respecta a los individuos inmunocompetentes, concuerdan con los publicados con

anterioridad por otros investigadores (Mathiesen *et al.*, 1988; 1992; Sundqvist *et al.*, 1986; Urban *et al.*, 1994). No obstante, sólo en el último de estos estudios se cuantificaron, si bien mediante inmunoanálisis y no inmunofluorescencia indirecta como en el nuestro, las distintas subclases de IgG contra la gB. También nuestros resultados referidos a la población infectada por el VIH-1 sustentan los publicados con anterioridad por otros investigadores. En efecto, Sundqvist *et al.* (1986) cuantificaron los niveles séricos de los distintos isotipos de IgG contra CMVH (no frente a la gB específicamente sino frente al virus completo) mediante ELISA en 15 pacientes con SIDA y en 45 pacientes en el estadio II (con linfadenopatía generalizada) de la infección por el VIH-1 encontrando que el 100% de los individuos presentaban una respuesta isotípica IgG1 que resultó claramente dominante en relación con la de los otros isotipos de las IgG. Estos datos, junto con los nuestros, apoyan la idea de que incluso en los estadios avanzados de la infección por el VIH-1 la respuesta inmunitaria celular frente al CMVH es del tipo Th1. No obstante, la confirmación de la anterior conjetura requiere llevar a cabo ensayos específicos de linfoproliferación.

Por otra parte nos decidimos a analizar con mayor detalle la respuesta de anticuerpos neutralizantes contra el CMVH en los distintos grupos de población en busca de alguna anomalía en el grupo de los individuos infectados por el VIH-1. La idea que respaldaba esta iniciativa fue la siguiente: clásicamente se ha considerado que el nivel sérico de anticuerpos capaces de neutralizar el CMVH libre es el único marcador humoral de protección contra el CMVH, aunque nunca se ha logrado determinar con precisión contra qué ni en qué grado la procuran. Esta consideración se basa en estudios realizados con la cepa murina del CMV (CMVM), en los que se demostraba que la administración pasiva de anticuerpos con actividad neutralizante protegía a los ratones contra la infección experimental letal (Jonjic *et al.*, 1994) y en otros llevados a

cabo en humanos, en concreto por el grupo de Plotkin (ver Plotkin, 1999) en los que se observaba que la administración de una vacuna inactivada a individuos sometidos a trasplante renal (la cepa Towne -adaptada al laboratorio-) los protegía contra la primoinfección natural clínicamente sintomática. No obstante, lo anterior no es incontrovertible, como tampoco lo es que el ensayo clásico de neutralización de virus libre que se realiza habitualmente en el laboratorio refleje fidedignamente la capacidad neutralizante real *in vivo*. El mecanismo a través del que actúan los anticuerpos neutralizantes es muy variado (Dimmock, 1995) y la eficacia neutralizante de éstos puede, por lo tanto, variar en función del mecanismo por el que operen. En general, la neutralización de virus envueltos por medio de anticuerpos sin la intervención del sistema del complemento (el complemento en sí no tiene actividad contra el CMVH ni su participación parece incrementar notablemente la capacidad neutralizante contra el virus) puede ser conseguida a través de una amplia variedad de mecanismos entre los que se incluyen la agregación de partículas víricas -y la consiguiente reducción de la multiplicidad de infección del inóculo-, el bloqueo de la adsorción del virus a la célula diana, o el de la penetración del virus, que en el caso del CMVH implica la activación de un proceso de fusión de membranas pH-independiente que se establece entre la cubierta viral y la membrana plasmática celular, o la inhibición de algún proceso intracitoplasmático precoz como la decapsidación del virus (Dimmock, 1995). El conocimiento de la contribución relativa de cada uno de estos mecanismos a la acción neutralizante global del suero (y en consecuencia de los distintos fluidos orgánicos) puede tener interesantes y relevantes implicaciones en la patogénesis de la infección por el CMVH en el marco de la infección por el VIH-1 puesto que, *in vivo*, los viriones circulantes pueden no ser igualmente sensibles a todos ellos y por lo tanto la protección contra el CMVH podría estar vinculada con la presencia anticuerpos, en suficiente cantidad, que neutralizan el CMVH de un modo determinado más que con la

actividad neutralizante global del suero. Esta situación parece darse en la infección por otros virus tales como el VRS (virus respiratorio sincitial) bovino y el propio VIH-1. En el caso del VRS se ha demostrado que únicamente los anticuerpos que neutralizan el virus impidiendo la fusión de la membrana del virus con la de la célula diana, anticuerpos que, en consecuencia, impiden la formación de los típicos sincitios que induce este paramixovirus, y no los que bloquean la adsorción del virus sobre la célula diana (no hay forma de distinguir entre estas dos especificidades cuando se realiza el ensayo típico de neutralización *in vitro*), confieren protección *in vivo* frente a la infección experimental en terneras (Thomas *et al.*, 1998). En el caso del VIH-1, la eficacia antiviral de los anticuerpos neutralizantes del individuo contra cepas autólogas no puede inferirse con precisión determinando la capacidad neutralizante global del suero sino cuantificando específicamente los anticuerpos que impiden la generación de sincitios inducidos por dichas cepas del VIH-1, esto es, aquellos que bloquean la fusión de las membranas viral y celular (Krause *et al.*, 1997).

En el marco de la infección por el CMVH creemos que los anticuerpos neutralizantes más eficaces *in vivo* contra este virus son los que impiden la penetración del virus en el interior de la célula en detrimento de los que causan agregación viral o impiden la adsorción inicial del virus a la superficie de la célula diana. Fundamentamos esta hipótesis en el hecho de que el virión del CMVH es capaz de establecer interacciones de baja afinidad con proteínas plasmáticas varias, particularmente con la β 2-microglobulina, las cuales dificultan, cuando no impiden, al menos *in vitro*, la neutralización de los viriones por sueros policlonales y anticuerpos monoclonales que reconocen proteínas de la envoltura viral (McKeating *et al.*, 1987). De acuerdo con lo que postulamos esas interacciones no impedirían, sin embargo, que el CMVH se ligara a su receptor de la membrana plasmática de la células diana al ser esta interacción de alta afinidad; en ese momento el virus sería sensible a los anticuerpos que bloquean la

fusión de las membranas celular y viral. No hay que olvidar que si efectivamente la β 2-microglobulina es capaz de proteger a los viriones del CMVH de la acción neutralizante de los anticuerpos, al menos antes de la fusión de las membranas viral y celular, los pacientes VIH-1 presentan niveles séricos (y en fluidos biológicos) muy elevados de esta proteína. Podía darse el caso de que en los pacientes infectados por el VIH-1, pero no en los sujetos inmunocompetentes control, se produjera un desequilibrio entre los unos y los otros con un predominio de los que neutralizan el virus antes de su penetración en la célula diana, lo cual mermaría sensiblemente la capacidad neutralizante real *in vivo* del individuo sin alterar la capacidad neutralizante medida *in vitro* con el ensayo de neutralización convencional. Antes de iniciar esa tanda de experimentos, no obstante, teníamos constancia de que en el suero de los individuos inmunocompetentes había anticuerpos capaces de neutralizar al CMVH a través de distintos mecanismos. En efecto, en un estudio previo (Navarro *et al.*, 1997) se observó que en el suero de varios individuos inmunocompetentes había anticuerpos capaces de bloquear de forma competitiva y dosis-dependiente la unión de determinados anticuerpos monoclonales murinos de especificidad y actividad antiviral conocidas, entre otras bloqueantes de la fusión de la membrana viral con la celular, a la gB. Al mismo tiempo se optimaron diversos ensayos (de neutralización postadsorción y de bloqueo de la fusión inducida por el CMVH), de cuyas características se ha hablado en las secciones de métodos y resultados, que permitían distinguir entre las distintas especificidades funcionales de anticuerpos neutralizantes.

Los datos de este estudio demuestran que una fracción de los anticuerpos neutralizantes presentes en el suero de los individuos inmunocompetentes analizados neutraliza al CMVH después de que éste se haya adsorbido sobre la superficie celular, impidiendo el proceso de penetración del virus o algún acontecimiento intracelular precoz que se produzca después de la internalización del virus. La magnitud de la

fracción de anticuerpos que neutraliza el CMVH del modo indicado varía individualmente pero, en general, no supera el 50% de la capacidad neutralizante global del suero. Los resultados de los experimentos de inhibición de la fusión inducida por el CMVH, aunque no estrictamente comparables con los obtenidos de los experimentos de neutralización de virus libre en cualquiera de las dos modalidades, también indican que la fracción de anticuerpos funcionales que neutralizan al CMVH mediante el bloqueo de la penetración del virus (inhibición de la fusión de membranas) es minoritaria en relación con aquellos que presumiblemente impiden la adsorción del virus a las células diana o que consiguen la agregación del virus. En los pacientes infectados por el VIH-1 constatamos que, aun siendo los niveles séricos medios de anticuerpos neutralizantes postadsorción y bloqueantes de la fusión significativamente mayores que los presentes en los individuos inmunocompetentes control, comparativamente, la fracción de anticuerpos que neutralizaban viriones impidiendo la penetración del virus era inferior en ellos, particularmente en los enfermos de SIDA. Es posible que la progresiva ablación del repertorio celular T que acompaña a la progresión de la infección por el VIH-1 (Gea-Banacloche *et al.*, 1998) y la consiguiente pérdida de la capacidad del sistema inmunitario de sintetizar anticuerpos con especificidades concretas podría explicar este fenómeno de cuyas consecuencias en el control de la infección activa por CMVH en el paciente VIH-1 no se tiene ningún indicio. No sabemos, en efecto, si los pacientes infectados por el VIH-1 se encuentran más predispuestos a la diseminación del CMVH en comparación con los individuos inmunocompetentes por su carencia relativa (en relación con las cargas virales que soportan) de anticuerpos capaces de bloquear la penetración del virus en las células diana, aunque así lo sospechamos.



Para concluir con la caracterización de la respuesta de anticuerpos funcionales contra el CMVH en los individuos infectados por el VIH-1 cuantificamos los niveles séricos de anticuerpos capaces de impedir la transmisión intercelular del CMVH para lo cual nos servimos de un ensayo biológico previamente optimado (Navarro *et al.*, 1993). No existe en la literatura ninguna referencia al papel que este tipo de anticuerpos desempeña *in vivo* en la defensa humoral contra el CMVH, aunque nuestro punto de vista es que debe ser relevante dado que la expansión intercelular podría ser clave en la diseminación del virus tras la primoinfección y durante los episodios de reactivación. Por otra parte sabíamos que el suero de los individuos inmunocompetentes contiene anticuerpos de esta especificidad funcional (Navarro *et al.*, 1997) y también que muchos pero no todos los anticuerpos monoclonales murinos (al menos los que reconocen la gB) con actividad neutralizante de virus libre también poseen la capacidad para impedir la expansión intercelular del CMVH, aunque subrayamos que estas dos funciones no son estrictamente superponibles. Observamos que los pacientes infectados por el VIH-1, particularmente los pacientes con SIDA, presentaban niveles séricos de este tipo de anticuerpos significativamente mayores que los encontrados en individuos inmunocompetentes control; así que tampoco en lo que se refiere a esta especificidad de anticuerpos pudimos constatar déficit alguno en la población infectada por el VIH-1.

Aunque sin vinculación directa con los objetivos mayores de este estudio, el análisis de las correlaciones entre los niveles séricos de las distintas especificidades de anticuerpos analizadas nos permitió concluir lo siguiente: por una parte, que el análisis de la respuesta de anticuerpos frente al virus completo (mediante el ELISA comercial descrito) no permite inferir la capacidad funcional anti-CMVH mediada por anticuerpos. En efecto, nuestros resultados indican que no existe una correlación significativa entre los niveles séricos de estos anticuerpos y los de los anticuerpos neutralizantes

(fenómeno anteriormente descrito por Marshall *et al.*, 1992), en sus distintas modalidades, y los de los anticuerpos que inhiben la transmisión intercelular del CMVH. Por otra parte, los anticuerpos anti-gB no parecen contribuir en gran medida a la capacidad global del suero de impedir, específicamente, la penetración del CMVH en el interior de la célula diana; es probable que sean los anticuerpos anti-gH de los que dependa esta actividad, esto último sería compatible con el papel de esta glucoproteína en la penetración del CMVH en el interior de las células; por el contrario, los anticuerpos anti-gB son responsables de gran parte de la actividad neutralizante global medida mediante el ensayo de neutralización convencional (de acuerdo con algunos resultados publicados con anterioridad –Rasmussen *et al.*, 1991; Marshall *et al.*, 1992-) y de la actividad inhibidora de la transmisión intercelular del virus de los sueros humanos. Finalmente, nuestros resultados indican (de acuerdo con dos estudios previos –Navarro *et al.*, 1993; 1997-) que las actividades neutralizante e inhibidora de la transmisión intercelular del CMVH de los sueros humanos son actividades funcionales relacionadas pero suficientemente distintas entre sí, lo cual indica que el análisis de una no permite inferir la magnitud de la otra con suficiente precisión.

5.2 Respuesta de anticuerpos funcionales contra el CMVH en pacientes que desarrollan una enfermedad orgánica por el CMVH

Conocidas las características de la respuesta humoral contra el CMVH en los pacientes infectados por el VIH-1 en los distintos estadios de la infección, nos propusimos investigar si los pacientes con SIDA en los que se diagnostica una enfermedad orgánica por el CMVH presentan una respuesta de anticuerpos funcionales anti-CMVH deficiente en comparación con la de los pacientes con SIDA e idéntico

grado de inmunodepresión que no la desarrollan. Para responder a esta pregunta nos servimos de un estudio transversal y de otro prospectivo. A primera vista, los resultados obtenidos en el estudio transversal indicaban que los pacientes con SIDA y enfermedad por el CMVH, considerados en su conjunto, mostraban niveles séricos de anticuerpos anti-gB, (aunque no de anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la transmisión intercelular) comparables a los que encontrábamos en los pacientes con SIDA sin enfermedad orgánica por el CMVH. Sin embargo, el valor de esa comparación nos pareció cuestionable dada la enorme heterogeneidad de los pacientes que habían desarrollado una enfermedad orgánica por el CMVH, en concreto, en lo concerniente a haber sido o no tratados con fármacos con actividad contra el CMVH poco antes de la obtención de los sueros, presentar o no antigenemias y/o viremias positivas en el momento de la toma de los sueros, y haber desarrollado una enfermedad circunscrita a algún órgano o sistema o por el contrario otra con carácter multifocal. La agrupación de los pacientes con base en estos criterios clínico-terapéuticos y virológicos nos permitió llegar a varias conclusiones. En los pacientes no tratados con fármacos anti-CMVH, con independencia de la enfermedad orgánica diagnosticada y de su extensión, observamos niveles séricos de anticuerpos funcionales frente al CMVH significativamente menores que los medidos en pacientes tratados, particularmente de anticuerpos anti-gB y neutralizantes de virus libre. Puesto que la mayoría de los pacientes que no habían recibido fármacos anti-CMVH presentaban pruebas positivas de antigenemia y viremia, se constató también la existencia de niveles séricos de anticuerpos funcionales anti-CMVH significativamente menores en los pacientes en los que estas pruebas virológicas fueron positivas que en aquellos en los que fueron negativas. Considerando la eficacia de la terapia farmacológica específica anti-CMVH en la reducción de la carga viral sistémica del CMVH (Gerna *et al.*, 1994) y el hecho de que la positividad de las pruebas de viremia y antigenemia reflejan la existencia de una

elevada carga viral periférica (Gerna *et al.*,1994), nuestros datos sugieren que existe una correlación directa entre la presencia de elevadas cargas sistémicas del CMVH y niveles séricos bajos de anticuerpos funcionales contra el virus. Esta afirmación viene avalada por los resultados obtenidos en nuestro estudio prospectivo. En efecto, cinco de los seis pacientes con SIDA analizados prospectivamente y que desarrollaron una enfermedad por el CMVH mostraron un descenso significativo de los niveles de anticuerpos anti-gB y neutralizantes (de al menos 4 veces), patente en el momento en que se diagnosticó la enfermedad (en ese momento la antigenemia era positiva), en relación con los niveles basales encontrados antes de que ésta se declarara. Incluso en uno de esos pacientes (número 5), la cinética de los anticuerpos anti-gB y neutralizantes mantuvo una estrecha correlación con la evolución clínica de la enfermedad, de modo que el nivel sérico mínimo de anticuerpos se observó en los momentos iniciales de la enfermedad y en los de recurrencia clínica. Esta situación era claramente distinta de la de los pacientes con SIDA que no desarrollaron una enfermedad por el CMVH en los que los niveles séricos de anticuerpos se mantuvieron relativamente constantes (variaciones no superiores a dos diluciones), a menos que la prueba de la antigenemia fuera positiva, en cuyo caso el nivel de anticuerpos era bajo aunque se recuperaba en cuanto se negativizaba aquélla. Además, en 4 de los 5 pacientes en los que el ganciclovir fue efectivo, a juzgar por la negativización de la prueba de la antigenemia y la mejoría en la condición clínica de los pacientes, los niveles séricos de anticuerpos funcionales anti-CMVH se incrementaron considerablemente, aunque sin alcanzar los niveles basales registrados antes de la declaración de la enfermedad-excepto en el paciente 4-; no así en el paciente 1 quien no respondió a la terapia inductiva con ganciclovir, mostró una recurrencia clínica, y continuó con la antigenemia positiva y niveles muy reducidos de estos anticuerpos en el suero. Estos resultados indican que en presencia de una elevada carga sistémica del

CMVH, situación vinculada con el desarrollo inminente de una enfermedad orgánica por el virus (Spector *et al.*, 1998;1999), se produce una depleción de anticuerpos con función antiviral, probablemente por la formación y posterior eliminación de inmunocomplejos con los viriones libres del CMVH, cuya consecuencia más obvia la diseminación de la infección viral. Probablemente en esa situación, la administración exógena de anticuerpos con capacidad funcional anti-CMVH sería de gran utilidad en la prevención y quizá en el control de la enfermedad invasiva por el virus. En ese sentido los anticuerpos monoclonales humanizados con actividad neutralizante (Hamilton *et al.*, 1997) serían una opción terapéutica complementaria a la propia terapia farmacológica antiviral.

Situaciones parecidas a las referidas en este estudio se han descrito en otras poblaciones de individuos inmunocomprometidos; así Schoppel *et al.*, (1997) encontraron una relación inversa entre los niveles de anticuerpos contra un epítipo inmunodominante de la gB (AD-1) y la positividad de una PCR de DNA del CMVH en pacientes sometidos a trasplante de hígado. Por su parte, Rasmussen *et al.*, (1995) no encontraron el DNA del CMVH en la sangre en pacientes infectados por el virus VIH-1 que mostraban niveles séricos elevados de anticuerpos anti-gB. Considerando el papel que los anticuerpos neutralizantes desempeñan en la eliminación de virus libre extracelular (Krause *et al.*, 1997), la depleción de anticuerpos funcionales puede conducir a la progresión y la extensión de la enfermedad por el CMVH una vez instaurada. De acuerdo con este modelo los anticuerpos funcionales, una vez reactivada la infección por el CMVH se encargarían de mantener los niveles de virus circulante bajo mínimos y evitar, por tanto, la diseminación del virus extracelular.

Contrariamente a la influencia de haber recibido o no tratamiento específico anti-CMVH, la localización anatómica de la enfermedad por CMVH no tuvo incidencia en los

niveles séricos de los anticuerpos funcionales, si bien el número de pacientes estudiados es demasiado reducido para extraer conclusiones definitivas.

Otros investigadores se han ocupado de la respuesta de anticuerpos funcionales contra el CMVH en el paciente con SIDA y enfermedad orgánica por el CMVH. Boppana *et al.*, (1995) estudiaron a 24 pacientes con retinitis diagnosticada oftalmoscópicamente y a 19 pacientes con SIDA sin enfermedad invasiva por el CMVH y un nivel similar de inmunodepresión. Estos investigadores observaron que, considerados en su conjunto, los pacientes con retinitis mostraron niveles séricos de anticuerpos neutralizantes similares a los hallados en los pacientes sin retinitis; sin embargo, cuando agrupaban a los pacientes con retinitis en función de la rapidez con que evolucionaba la enfermedad encontraron niveles séricos de anticuerpos neutralizantes significativamente mayores en los que evolucionaron lentamente que en aquellos que lo hicieron con rapidez. También los niveles séricos de anticuerpos anti-gB medidos fueron más altos en los primeros que en los segundos aunque la diferencia no alcanzó significación estadística. Estos autores concluyeron que los anticuerpos neutralizantes podrían modular la progresión de la enfermedad y se preguntaron si la administración exógena de estos anticuerpos podría mejorar la sintomatología de estos pacientes así como frenar el avance de la enfermedad. Por su parte, Rasmussen *et al.*, (1995) encontraron niveles séricos comparables de anticuerpos anti-gB en pacientes que desarrollaron una retinitis por el CMVH y en quienes no lo hicieron concluyendo que los anticuerpos anti-gB no son relevantes en la prevención o modulación de la enfermedad diseminada por el CMVH; sin embargo, no especificaron si los enfermos estaban siendo tratados con fármacos anti-CMVH o presentaban cargas virales de CMVH altas (antigenemia positiva) en el momento en que se obtuvieron las muestras. Por lo tanto una comparación estricta con nuestro estudio no parece factible.

Con independencia de lo dicho con anterioridad, sin embargo, parece claro que la enfermedad invasiva, en nuestro estudio una retinitis, puede desarrollarse en presencia de niveles séricos elevados de anticuerpos funcionales anti-CMVH; tal es el caso del paciente 6 del estudio prospectivo.

5.3 Efecto de las terapias antirretrovirales de gran eficacia sobre la inmunidad humoral frente al CMVH

El advenimiento de las denominadas combinaciones terapéuticas antirretrovirales de gran eficacia ("TAGE") ha conseguido reducir drásticamente la morbilidad y mortalidad debidas a la infección por el CMVH en el paciente con SIDA, probablemente en relación con la reconstitución del sistema inmunitario celular (Palella *et al.*, 1998), es decir la recuperación del número y de la función de las células T CD4+. Prueba de ello es el hecho de que estas combinaciones terapéuticas son capaces de disminuir la incidencia de los episodios virémicos por el CMVH en estos pacientes e incluso de resolverlos si se han producido aun sin administrar fármacos anti-CMVH (O'Sullivan *et al.*, 1999). Nada, sin embargo, se sabe acerca del efecto de estas terapias sobre la inmunidad humoral contra el CMVH. En relación con el propio VIH-1, se ha demostrado que las TAGE, al reducir la carga viral del VIH-1, tienen como efecto la elevación de los niveles plasmáticos de anticuerpos neutralizantes frente a cepas autólogas del VIH-1 (Sarmati *et al.*, 1997). Con nuestro estudio quisimos averiguar si las terapias TAGE tienen algún efecto sobre los niveles séricos de anticuerpos funcionales contra el CMVH. Nuestro estudio demuestra que, con independencia del estadio de la infección por el VIH-1 considerado y de que el paciente responda o no biológica y virológicamente a las TAGE, los niveles séricos de anticuerpos anti-gB y neutralizantes en esos pacientes se mantienen relativamente estables con ligeras fluctuaciones (la diferencia entre dos

muestras consecutivas no suele superar una o dos diluciones, que no guardan relación con los niveles sanguíneos de ARN del VIH-1 y del número de células T CD4+ periféricas, a menos que la prueba de la antigenemia del CMVH sea positiva, es decir siempre que no se incremente notablemente la carga viral periférica del CMVH, en cuyo caso se produce un descenso marcado del nivel de anticuerpos funcionales anti-CMVH, que se restablece una vez se negativiza aquélla. En todo caso los niveles séricos de estos anticuerpos se mantienen muy elevados con independencia del grado aparente de recuperación de la inmunidad celular y de la negativización de la carga viral del VIH-1; de hecho no observamos una correlación significativa entre los niveles séricos de anticuerpos anti-gB y neutralizantes y los recuentos periféricos de células T CD4+ y la carga viral del VIH-1. Estos resultados sugieren que los altos y persistentes niveles séricos de anticuerpos neutralizantes y anti-gB que se observan en estos pacientes se mantienen de ese modo a través de la estimulación continua del sistema inmunitario, probablemente vía T-independiente, por parte del CMVH en estado replicativo. De estos resultados podría inferirse que las TAGE, por sí mismas, no son capaces de controlar radicalmente la infección persistente que el CMVH establece en estos pacientes. En un estudio reciente, Deayton *et al.*, (1999) encontraron una elevación significativa de los niveles séricos de anticuerpos anti-gB en respuesta a las TAGE, incremento que no observaron en pacientes tratados con análogos nucleósidos exclusivamente o que no estaban siendo tratados con fármacos anti-VIH-1; estos investigadores concluyeron que la reconstitución inmunológica experimentada por los pacientes que responden a las TAGE tiene como consecuencia, entre otras, la elevación de los niveles séricos de anticuerpos anti-gB. Sin embargo los pacientes incluidos en este estudio, a diferencia de los que fueron estudiados en el nuestro, presentaban una carga sistémica del CMVH muy alta en el momento en que se inició el estudio, por lo tanto, es probable que los cambios observados en los niveles séricos de

Discusión

anticuerpos anti-gB en estos pacientes se debieran más que a la reconstitución celular resultado del TAGE a la reducción de la carga viral periférica del CMVH como consecuencia de la respuesta al TAGE.

En resumen, de acuerdo con nuestros datos, las TAGE no modifican sustancialmente los niveles séricos de anticuerpos anti-gB y neutralizantes tanto en los pacientes VIH-1 asintomáticos como en los pacientes con SIDA.

6. CONCLUSIONES

6.1 Los individuos infectados por el VIH-1 no presentan déficit cuantitativo alguno en la respuesta de anticuerpos funcionales frente al CMVH. Todo lo contrario, los niveles séricos de anticuerpos IgG frente al CMVH completo, anticuerpos IgG de los distintos isotipos frente a la gB, anticuerpos neutralizantes de virus libre en ausencia del complemento y anticuerpos inhibidores de la transmisión intercelular del virus son mayores en ellos, en particular en los pacientes en el estadio del SIDA, que en los individuos inmunocompetentes.

6.2 La contribución relativa de los anticuerpos neutralizantes que impiden la penetración del CMVH en la célula diana a la acción neutralizante global del suero es sustancialmente menor en los pacientes infectados por el VIH-1, particularmente en aquellos en el estadio del SIDA, que en los individuos inmunocompetentes.

6.3 El análisis de las correlaciones estadísticas entre los niveles séricos de las distintas especificidades de anticuerpos estudiadas tanto en la población inmunocompetente como la infectada por el VIH-1 permite concluir que:

6.3.1. Los anticuerpos que reconocen la glucoproteína B son responsables de gran parte de las actividades neutralizante de virus libre e inhibidora de la expansión intercelular del CMVH de los sueros; no así de la neutralización del CMVH a través de la interferencia con el proceso de fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula diana.

6.3.2. La neutralización del CMVH libre y el bloqueo de la expansión intercelular del CMVH son dos actividades funcionales claramente diferentes.

6.3.3. La medición de los niveles séricos de anticuerpos frente al virus completo no permite inferir la actividad funcional de éstos frente al CMVH.

6.4 Los pacientes con SIDA en los que se desarrolla una enfermedad orgánica por el CMVH, sea cual fuere su localización y extensión, y siempre que no haya sido tratada, muestran niveles séricos de anticuerpos anti-gB, neutralizantes e inhibidores de la transmisión intercelular del CMVH, significativamente menores que los hallados en los pacientes con enfermedad orgánica tratada con antivíricos y en los pacientes con SIDA sin enfermedad diseminada por el CMVH.

6.5 Los pacientes con SIDA virémicos y/o antigenémicos, particularmente si desarrollan una enfermedad orgánica por el CMVH, muestran niveles séricos de anticuerpos anti-gB, neutralizantes e inhibidores de la transmisión intercelular del CMVH significativamente menores que los pacientes en los que las pruebas de la viremia y de la antigenemia son negativas.

6.6 En los pacientes con SIDA que desarrollan una enfermedad por el CMVH se observa un descenso significativo de los niveles séricos de anticuerpos anti-gB y neutralizantes que se detecta al tiempo de la declaración sintomática de la enfermedad y la positivización de la prueba de la antigenemia del CMVH. En cambio, en los pacientes con SIDA que no desarrollan una enfermedad invasiva por el CMVH los niveles séricos de los anticuerpos mencionados se mantienen estables, con ligeras fluctuaciones, a menos que se positivice la prueba de la antigenemia, en cuyo caso descienden notablemente. Se infiere de lo anterior que existe una correlación inversa entre la carga viral periférica del CMVH y los niveles séricos de anticuerpos funcionales contra el CMVH. Como

consecuencia de lo anterior, postulamos que los anticuerpos con actividad funcional contra el CMVH desempeñan un papel relevante en el control inmunitario de la enfermedad diseminada por este virus, limitando la progresión de ésta y quizá en menor medida, contribuyendo a prevenir su desarrollo.

6.7 Los pacientes infectados por el VIH-1, tanto en el estadio asintomático de la infección como en el del SIDA, tratados con combinaciones antirretrovirales de gran eficacia mantienen niveles séricos de anticuerpos anti-gB y neutralizantes relativamente estables que en algunos casos experimentan fluctuaciones, con independencia de que respondan o no biológica y virológicamente a aquéllas, siempre que la prueba de la antigenemia del CMVH se mantenga negativa.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Adler SP, Starr SE, Plotkin SA, Hempfling SH, Buis S, Manning ML, Best AM. Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *J Infect Dis* 1995; 171:26-32.
2. Adlish JD, Lahijani RS, St. Jeor SC. Identification of a putative cell receptor for human cytomegalovirus. *Virology* 1990; 176:337-345.
3. Ahn KS, Angulo A, Ghazal P, Peterson P, Yang Y, Fruh K. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:10990-10995.
4. Alberola J, Tamarit A, Igual R, Navarro D. Early neutralizing and glycoprotein B (gB)-specific antibody responses to human cytomegalovirus (HCMV) in immunocompetent individuals with distinct clinical presentations of primary HCMV infection. *J Clin Virol* 2000; 16:113-122.
5. Alford CH, Britt J. Cytomegalovirus. 1990. En: *Fields Virology* (Fields B.N., Knipe D.M., Hartley, P.M., Eds.), Lippincott-Raven, Philadelphia, MS, USA.
6. Alp NJ, Allport TD, Vanzanten J, Rodgers B, Sissons JGP, Borysiewicz LK. Fine specificity of cellular immune responses in humans to human cytomegalovirus immediate-early I protein. *J Virol* 1991; 65:4812-4820.
7. Alpert G, Mazon MC, Colimon R, Plotkin S. Rapid detection of human cytomegalovirus in the urine of humans. *J Infect Dis* 1985;152:631-633.

Bibliografía

8. Arribas JR, Clifford DB, Fichtenbaum CJ, Commins DL, Powderly WG, Storch GA. Level of cytomegalovirus (CMV) DNA in cerebrospinal fluid of subjects with AIDS and CMV infection of the central nervous system. *J Infect Dis* 1995; 172:527-531.
9. Arrizabalaga J, Iribarren JA, Rodríguez-Arondo F, Garde C. Enfermedad por Cytomegalovirus en el SIDA. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994; 12:297-311.
10. Bancroft GJ, Shellam GR, Chalmer JE. Genetic influences on the augmentation of natural killer (NK) cells during murine cytomegalovirus infection: correlation with patterns of resistance. *J Immunol* 1981; 126:988-994.
11. Basgoz N, Qadri I, Navarro D, Sears A, Lennette E, Youngblom J. The amino-terminus of human cytomegalovirus glycoprotein B contains epitopes that vary among strains. *J Gen Virol* 1992; 73:983-988.
12. Beck S, Barrell BG. Human Cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* 1988; 331:269-272.
13. Beninga J, Kropff B, Mach M. Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T-cell response. *J Gen Virol* 1995; 76:153-160.
14. Boivin G, Handfield J, Toma E, Murray G, Lalonde R, Tevere VJ, Sun R, Bergeron MG. Evaluation of the AMPLICOR cytomegalovirus test with specimens from human immunodeficiency virus-infected subjects. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2509-2513.

15. Bongarts A, von Laer D, Vogelberg C, Ebert K, von Lunzen J, Garwegg J, Vaith P, Hufert FT, Haller O, Meyer-Konig U. Glycoprotein B genotypes of human cytomegalovirus: distribution in HIV-infected patients. *Scand J Infect Dis* 1996; 28, 447-449.
16. Boom R, Sol C, Weel J, Gerrits Y, de Boer M, Wertheim-van Dillen P. A highly sensitive assay for detection and quantitation of human cytomegalovirus DNA in serum and plasma by PCR and electrochemiluminescence. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1489-1497.
17. Boppana SB, Britt WJ. Recognition of human cytomegalovirus products by HCMV-specific cytotoxic T cells. *Virology* 1996; 222:293-296.
18. Boppana SB, Polis MA, Kramer AA, Britt WJ, Koenig S. Virus-specific antibody responses to human cytomegalovirus (HCMV) in human immunodeficiency virus type 1-infected persons with HCMV retinitis. *J Infect Dis* 1995; 171:182-185.
19. Borysiewicz LK, Hickling JK, Graham S, Sinclair J, Cranage MP, Smith GL. Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72 KDa immediate early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Exp Med* 1988; 168:919-931.
20. Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W. A very strong enhancer is located upstream the immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 1985; 41:521-530.



Bibliografía

21. Bowen EF, Sabin CA, Wilson P, Griffiths PD, Davey CC, Johnson MA, Emery VC. Cytomegalovirus (CMV) viraemia detected by polymerase chain reaction identifies a group of HIV-positive patients at high risk of CMV disease. *AIDS* 1997; 11:889-893.
22. Britt WJ, Auger D. Synthesis and processing of the envelope gp55-116 complex of human cytomegalovirus. *J Virol* 1986; 58:185-191.
23. Britt WJ, Mach M. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* 1996; 39:401-412.
24. Britt WJ, Vugler L, Butfiloski EJ, Stephen EB. Cell surface expression of human Cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): Use of HCMV recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J Virol* 1990; 64:1079-1085.
25. Britt WJ, Vugler L, Stephens EB. Induction of complement-dependent and complement-independent neutralizing antibodies by recombinant-derived human cytomegalovirus gp 55-116 (gB). *J Virol* 1988; 62:3309-3318.
26. Britt WJ, Vugler LG. Antiviral antibody responses in mothers and their newborn infants with clinical and subclinical congenital cytomegalovirus infections. *J Infect Dis* 1990; 161:214-219.
27. Britt WJ. Neutralizing antibodies detect a disulphide-linked glycoprotein complex within the envelope of human cytomegalovirus. *Virology* 1984; 135:369-378.

28. Britt WJ, Vugler LG. Processing of the gp55-116 envelope glycoprotein complex (gB) of human cytomegalovirus. *J Virol* 1989; 63:403-410.
29. Brown JM, Kaneshima H, Mocarski ES. Dramatic interstrain differences in the replication of human cytomegalovirus in SCID-hu mice. *J Infect Dis* 1995; 171:1599-1603.
30. Browne H, Smith G, Beck S, Minson T. A complex between the MHC class I homologue encoded by human Cytomegalovirus and $\beta 2$ microglobulin. *Nature* 1990; 347:770-772.
31. Brytting M, Xu W, Wahren B, Sundqvist VA. Cytomegalovirus DNA detection in sera from patients with active cytomegalovirus infections. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1937-1941.
32. Bukowski JF, Woda BA, Welsh RM. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J Virol* 1984; 52:119-128.
33. Capobianchi MR, Barresi C, Borghi P, Gessani S, Fantuzzi L, Ameglio F, Bellardelli F, Papadia S, Dianzani F. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 stimulates cytomegalovirus replication in monocytes: possible role of endogenous interleukin-8. *J Virol* 1997; 71:1591-1597.
34. Cassoux N, Bodaghi B, Katlama C, LeHoang P. CMV Retinitis in the era of HAART. *Ocul Immunol Inflamm* 1999; 7:231-235.

Bibliografía

35. Cavallo T, Graves K, Cole NL, Albrecht T. Cytomegalovirus: an ultrastructural study of the morphogenesis of nuclear inclusions in human cell culture. *J Gen Virol* 1981; 56:97-104.
36. Cha T-A, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete R. Human Cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 1996; 70:78-83.
37. Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R. Analysis of the protein coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 154:125-169.
38. Cherrington JM, Mocarski ES. Human cytomegalovirus ie1 transactivates the alpha promoter enhancer via a 18 base-pair repeat element. *J Virol* 1989; 63:1435-1440.
39. Chou S. Molecular epidemiology of envelope glycoprotein H of human Cytomegalovirus. *J Infect Dis* 1992; 166:604-607.
40. Chou S. (a). Newer methods for diagnosis of cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis* 1990; 12, Suppl 7: S727-736.
41. Chou SW. (b). Differentiation of cytomegalovirus strains by restriction analysis of DNA sequences amplified from clinical specimens. *J Infect Dis* 1990; 162:738-742.

42. Chou S., Denisson K. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *J Infect Dis* 1991; 163:1229-1234
43. Chou S, Roark L, Merigan TC. DNA of 21 clinical cytomegalovirus strains detected by hybridization to cloned DNA fragments of laboratory strain AD169. *J Med Virol* 1984; 14:263-268.
44. Cole R, Kuttner AG. A filterable virus present in the submaxillary glands of guinea pigs. *J Exp Med* 1926; 44:855-873.
45. Compton T, Nowlin DM, Cooper NR. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 1993; 193:834-841.
46. Cranage MP, Kousarides T, Bankier AT, Statchwell S, Weston K, Tomlinson P. Identification of the human cytomegalovirus glycoprotein gene and induction of neutralizing antibodies via its expression in recombinant vaccinia virus. *EMBO J* 1986; 5:3057-3063.
47. Cranage MP, Smith GL, Bell SE, Hart H, Brown C, Bankiert AT. Identification and expression of a human cytomegalovirus glycoprotein with homology to the Epstein-Barr virus BXLF2 product, Varicella zoster virus gpIII and the Herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *J Virol* 1988; 62:1416-1422.

Bibliografía

48. Crawford SW, Bowden RA, Hackman RC, Gleaves CA, Meyers JD, Clark JG. Rapid detection of cytomegalovirus pulmonary infection by bronchoalveolar lavage and centrifugation culture. *Ann Intern Med* 1988;108:180-185.
49. Cremer N, Cossen CK, Shell GR, Pereira L. Antibody response to human cytomegalovirus polypeptides captured by monoclonal antibodies on the solid phase in enzyme immunoassays. *J Clin Microbiol* 1985; 21:517-512.
50. Crute JJ, Tsurumi T, Zhu LA, Weller SK, Olivo PD, Challberg MD. Herpes simplex virus 1 helicase-primase: a complex of three herpes-encoded gene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2186-2189.
51. Dal Monte P, Landini MP, Sinclair J, Virelizier JL, Michelson S. TAR and Sp1-independent transactivation of HIV long terminal repeat by the Tat protein in the presence of human cytomegalovirus IE1/IE2. *AIDS* 1997; 11:297-303.
52. Dankner WM, McCutchan JA, Richman DD, Hirata K., Spector SA. Localization of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by in situ hybridization. *J Infect Dis* 1990; 161:31-36
53. D'Aquila RT, Hayward GS, Summers WC. Physical mapping of the human Cytomegalovirus (HCMV) (Towne) DNA polymerase gene: DNA mediated transfer of a genetic marker for an HCMV gene. *Virology* 1989; 171:312-316.

54. Davignon JL, Castanie P, Yorke JA, Gautier N, Clement D, Davrinche C. Anti-human cytomegalovirus activity of cytokines produced by CD4(+) T-cell clones specifically activated by IE1 peptides in vitro. *J Virol* 1996; 70:2162-2169.
55. Deayton J, Mocroft A, Wilson P, Emery VC, Johnson MA, Griffiths PD. Loss of cytomegalovirus (CMV) viraemia following highly active antiretroviral therapy in the absence of specific anti-CMV therapy. *AIDS* 1999; 13:1203-1206.
56. Dimmock NJ. Update on the neutralisation of animal viruses. *Rev Med Virol* 1995; 5:165-179.
57. Drew WL. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1992; 14:608-615.
58. Ebeling A, Keil G, Nowak B, Fleckenstein B, Berthelot N, Sheldrick P. Genome structure and virion polypeptides of the primate herpesviruses Herpesvirus aoutus types 1 & 3: comparison with human Cytomegalovirus. *J Virol* 1983; 45:715-726.
59. Edson CM, Hosler BA, Waters DJ. Varicella-zoster virus gpI and Herpes simplex virus gE: phosphorylation and Fc binding. *Virology* 1987; 161:599-602.
60. Einhorn L, Ost A. Cytomegalovirus infection in human blood cells. *J Infect Dis* 1984; 149:207-214.
61. Farrar GH, Greenaway PJ. Characterization of glycoprotein complexes present in human Cytomegalovirus envelopes. *J Gen Virol* 1986; 67:1649-1673.

Bibliografia

62. Farrar GH, Oram JD. Characterization of the human Cytomegalovirus envelope glycoproteins. *J Gen Virol* 1984; 65:1991-2001.
63. Farrell HE, Vally H, Lynch DM, Fleming P, Shellam GR, Scalzo AA, Davis-Poynter NJ. Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature* 1997; 386:510-514.
64. Fiala M, Cone LA, Chang CM, Mocarski ES. Cytomegalovirus viremia increases with progressive immune deficiency in patients infected with HTLV-III. *AIDS Res* 1986; 2:175-181.
65. Fish KN, Britt W, Nelson JA. A novel mechanism for persistence of human cytomegalovirus in macrophages. *J Virol* 1996; 70:1855-1862.
66. Fons M, Albrecht T. Cytomegalovirus: the relationship of nucleocapsid assembly to the organization of cellulae. *Arch Virol* 1986; 91:351-356.
67. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *New Engl J Med* 1992; 326: 663-667.
68. Freymuth F, Gennetay E, Petitjean J, Eugene G, Hurault de Ligny B, Ryckelynck JP, Legoff C, Hazera P, Bazin C. Comparison of nested PCR for detection of DNA in plasma with pp65 leukocytic antigenemia procedure for diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1614-1618.

69. Friess B, Chou S, Boeckh M, Torok-Storb B. Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* 1994; 169:769-774.
70. Fuller GN. Cytomegalovirus and the peripheral nervous system in AIDS. *J Acquir Immunedefic Syndr* 1992; 5, Suppl 1:S33-36.
71. Gallant JE, Moore RD, Richman DD, Keruly J, Chaisson RE. Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. The Zidovudine Epidemiology Study Group. *J Infect Dis* 1992; 166:1223-1227.
72. Gea-Banacloche JC, Weiskopf EE, Hallahan C, Lopez Bernaldo de Quiros JC, Flanigan M, Mican JM, Falloon J, Baseler M, Stevens R, Lane HC, Connors M. Progression of human immunodeficiency virus disease is associated with increasing disruptions within the CD4+ T cell receptor repertoire. *J Infect Dis* 1998; 177:579-585.
73. Geelen JL, Walig C, Wertheim P, Van der Noordaa J. Human Cytomegalovirus DNA. I. Molecular weight and infectivity. *J Virol* 1978; 26:813-816.
74. Gerna G, Baldanti F, Sarasini A, Furione M, Percivalle E, Revello MG, Zipeto D, Zella D. Effect of foscarnet induction treatment on quantitation of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in peripheral blood polymorphonuclear leukocytes and aqueous humor of AIDS patients with HCMV retinitis. The Italian Foscarnet Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:38-44.

Bibliografia

75. Gerna G, Furione M, Baldanti F, Sarasini A. Comparative quantitation of human cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of transplant and AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2709-2717.
76. Gerna G, Parea M, Percivalle E, Zipeto D, Silini E, Barbarini G, Milanesi G. Human cytomegalovirus viraemia in HIV-1-seropositive patients at various clinical stages of infection. *AIDS* 1990; 10: 1027-1031.
77. Gerna G, Percivalle E, Baldanti F, Sozzani S, Lanzarini P, Genini E, Lilleri D, Revello MG. Human cytomegalovirus replicates abortively in polymorphonuclear leukocytes after transfer from infected endothelial cells via transient microfusion events. *J Virol* 2000; 74:5629-5638.
78. Gerna G, Revello MG, Percivalle E, Morina F. Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantitation of human cytomegalovirus antigenemia. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1232-1237.
79. Gerna G, Zavattoni M, Baldanti F, Furiones M, Chezzi L, Grazia Revello M, Percivalles E. Circulating endothelial cells are associated with high human cytomegalovirus (HCMV) load in AIDS patients with late stage disseminated HCMV Disease. *J Med Virol* 1998; 55:64-74.
80. Gerna G, Zipeto D, Parea M, Percivalle E, Zavattoni M, Gaballo A, Milanesi G. Early virus isolation, early structural antigen detection and DNA amplification by the

polymerase chain reaction in polymorphonuclear leukocytes from AIDS patients with human cytomegalovirus viraemia. *Mol Cell Probes* 1991; 5:365-374.

81. Ghazal P, Young J, Giulietti E, DeMattei C, Garcia J, Gaynor R, Stenberg RM, Nelson JA. A discrete cis element in the human immunodeficiency virus terminal long repeat mediates synergistic trans activation by cytomegalovirus immediate-early proteins. *J Virol* 1991; 65:6735-6742.

82. Gibson W, Murphy TL, Roby C. Cytomegalovirus-infected cells contain a DNA-binding protein. *Virology* 1981; 111:251-262.

83. Gibson W. Protein counterparts of human and simian Cytomegalovirus. *Virology* 1983; 128:391-406.

84. Gilbert C, Handfield J, Toma E, Lalonde R, Bergeron MG, Boivin G. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in blood of AIDS patients: lack of association with either the viral DNA load in leukocytes or presence of retinitis. *J Med Virol* 1999; 59:98-103.

85. Gonczol E, Hudecz F, Ianacone J, Dietzschold B, Starr S, Plotkin SA. Immune responses to isolated human Cytomegalovirus envelope proteins. *J Virol* 1986; 58:661-664.

86. Gonczol E, Ianacone J, Ho WZ, Starr S, Meignier B, Plotkin SA. Isolated gA/gB glycoprotein complex of human Cytomegalovirus induces humoral and cellular immune-responses in human volunteers. *Vaccine*. 1990; 8:130-136.

87. Gozlan J, Salord JM, Chouaïd C, Duvivier C, Picard O, Meyohas MC, Petit JC. Human cytomegalovirus (HCMV) late-mRNA detection in peripheral blood of AIDS patients: diagnostic value for HCMV disease compared with those of viral culture and HCMV DNA detection. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1943-1945.
88. Gozlan J, Salord JM, Rouillet E, Baudrimont M, Caburet F, Picard O, Meyohas MC, Duvivier C, Jacomet C, Petit JC. Rapid detection of cytomegalovirus DNA in cerebrospinal fluid of AIDS patients with neurologic disorders [published erratum appears in *J Infect Dis* 1993; 167:995]. *J Infect Dis* 1992; 166:1416-1421.
89. Greenaway PJ, Oram JD, Downing RG, Patel K. Human Cytomegalovirus DNA: BamHI, EcoRI and PstI restriction endonuclease cleavage maps. *Gene* 1982; 18:355-360.
90. Grefte A, Harmsen MC, van der Giessen M, Knollema S, van Son W.J., The TH. Presence of human cytomegalovirus (HCMV) immediate-early mRNA but not ppUL83 (lower matrix protein pp65) mRNA in polymorphonuclear and mononuclear leukocytes during active HCMV infection. *J Gen Virol* 1994; 75:1989-1998.
91. Grefte A, van der Giessen M, van Son W., The T.H. Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis* 1993; 167, 270-277.
92. Gretch DR, Gerhz RC, Stinski MF. (a) Characterization of human glycoprotein complex gCI. *J Gen Virol* 1988; 69:1205-1215.

93. Gretch DR, Kari B, Gerhz RC, Stinski MF. (b) A multigene family encodes the human Cytomegalovirus glycoprotein complex gC II (gp47-52 complex). *J Virol* 1988; 62:1956-1962.
94. Gretch DR, Kari B, Rasmussen L, Gehrz RC, Stinski MF. (c) Identification and characterization of three distinct families of glycoprotein complexes in the envelopes of human Cytomegalovirus. *J Virol* 1988; 62:875-881.
95. Grundy JE, Downes KL. Up-regulation of LFA-3 and ICAM-1 on the surface of fibroblasts infected with cytomegalovirus. *Immunology*. 1993; 78:405-412.
96. Grundy JE, Lawson KM, MacCormac LP, Fletcher JM, Yong KL. Cytomegalovirus-infected endothelial cells recruit neutrophils by the secretion of C-X-C chemokines and transmit virus by direct neutrophil-endothelial cell contact and during neutrophil transendothelial migration. *J Infect Dis* 1998; 177:1465-1474.
97. Grundy JE, MacKeating JA, Ward PJ, Sanderson AR, Griffiths PD. β 2-microglobulin enhances the infectivity of Cytomegalovirus and when bound to the virus enables class I HLA molecule to be used as a virus receptor. *J Gen Virol* 1987; 68:793-803.
98. Guglielmo BJ, Wong-Beringer A, Linker CA. Immune globulin therapy in allogeneic bone marrow transplant: a critical review. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13:499-510.
99. Gyulai Z, Endresz V, Burian K, Pincus S, Toldy J, Cox WI, Meri C, Plotkin S, Berencsi K. Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-Exon

Bibliografía

- 4, pp150 and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs. *J Infect Dis* 2000; 181:1537-1546.
- 100.Haguenau F, Michelson FS. Cytomegalovirus: nucleocapsid assembly and core structure. *Intervirology* 1975; 5:293-299.
- 101.Hahn G, Jores R, Mocarski ES. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:3937-3942.
- 102.Hamilton AA, Manuel DM, Grundy JE, Turner AJ, King SI, Adair JR, White P, Carr FJ, Harris WJ. A humanized antibody against human cytomegalovirus (CMV) gpUL75 (gH) for prophylaxis or treatment of CMV infections. *J Infect Dis* 1997; 176:59-68.
- 103.Hamzeh FM, Lietman PS, Gibson W, Hayward GS. Identification of the lytic origin of DNA replication in human Cytomegalovirus by a novel approach utilizing ganciclovir-induced chain termination. *J Virol* 1990; 64:6184-6195.
- 104.Hanshaw JB, Moxley AW, Gaev L, Abel V. CNS sequelae of congenital cytomegalovirus infection. *Monograph* 1976: 47-54.
- 105.Hayashi K, Suwa Y, Shimomura Y, Ohashi Y. Pathogenesis of ocular cytomegalovirus infection in the immunocompromised host. *J Med Virol* 1995; 47:364-369.
- 106.He HL, Rinaldo CR, Morel PA. T cell proliferative responses to 5 human cytomegalovirus proteins in healthy seropositive individuals: implications for vaccine development. *J Gen Virol* 1995;76:1603-1610.

107. Heilbronn R, Jahn G, Burkle AM, Freese U-K, Fleckenstein B, Zur Hausen H. Genomic localization, sequence analysis, and transcription of the putative human Cytomegalovirus DNA polymerase gene. *J Virol* 1987; 61:119-124.
108. Hemmo H, Ripalti A, Landini M, Radsak K, Kern H, Hensen G. Human cytomegalovirus late-phase maturation is blocked by stably expressed UL32 antisense mRNA in astrocytoma cells. *J Gen Virol* 1997; 78: 2621-2631.
109. Hengel H, Brune W, Koszinowski UH. Immune evasion by cytomegalovirus -survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol* 1998; 6:190-197.
110. Hermiston TW, Malone CL, Witte PR, Stinski MF. Identification and characterization of the human Cytomegalovirus immediate-early region 2 gene that stimulates gene expression from an inducible promoter. *J Virol* 1987; 61:3214-3221.
111. Ho M. Cytomegalovirus Biology and infection. 2^a ed. Plenum Publishing Corporation, New York. 1991.
112. Ho M. Cytomegalovirus. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of infectious diseases. Fourth ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:1351-1364.
113. Hsia K, Spector DH, Lawrie J, Spector SA. Enzymatic amplification of human cytomegalovirus sequences by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1802-1815.

Bibliografía

114. Huang ES, Chen ST, Pagano JS. Human Cytomegalovirus. I. Purification and characterization of viral DNA. *J Virol* 1973; 12:1473-1481.
115. Huang ES, Kilpatrick BA, Huang YT, Pagano JS. Detection of human Cytomegalovirus and analysis of strain variation. *Yale J Biol Med* 1976; 49:29-43.
116. Huber M, Compton T. Characterization of a novel third member of the human Cytomegalovirus glycoprotein H-glycoprotein L complex. *J Virol* 1997; 71:5391-5398.
117. Huber M, Compton T. Intracellular formation and processing of the heterotrimeric gH-gL-gO (gCIII) glycoprotein envelope complex of Human Cytomegalovirus. *J Virol* 1999; 73:3886-3892.
118. Ibañez CE, Schrier R, Ghazal P, Wiley C., Nelson JA. Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J Virol* 1991; 65:6581-6588.
119. Irmiere A, Gibson W. Isolation and characterization of a noninfectious viron-like particle released from cells infected with human Cytomegalovirus. *Virology* 1983; 130:118-133.
120. Irmiere A, Gibson W. Isolation of human cytomegalovirus intranuclear capsids, characterization of their protein constituents, and demonstration that the B-capsid assembly protein is also abundant in noninfectious enveloped particles. *J Virol* 1985; 56:277-283.

121. Jacobson MA, Zegans M, Pavan PR, O'Donnell JJ, Sattler F, Rao N, Owens S, Pollard R. Cytomegalovirus retinitis after initiation of highly active antiretroviral therapy. *Lancet* 1997; 349:1443-1445.
122. Jahn G, Kouzarides T, Mach M, Schöll BC, Plachter B, Traupe B. (a) Map position and nucleotide sequence of the gene for the large structural phosphoprotein of human Cytomegalovirus. *J Virol* 1987; 61:1358-1367.
123. Jahn G, Mach M. Human Cytomegalovirus phosphoproteins and glycoproteins and their coding regions. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 154:171-188.
124. Jahn G, Schöll BC, Traupe B, Fleckenstein B. (b) The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human Cytomegalovirus and their antigenic properties. *J Gen Virol* 1987; 68:1327-1337.
125. Jesionek A, Kiolemenoglou B. Über einen befund von protozoenartigen gebilden in den organen eines heriditarluestischenfotus. *Munch Wed Wochenschr* 1904; 51:1905-1097.
126. Jiwa NM, Van Gemert GW, Raap AK, Van de Rijke FM, Mulder A, Lens PF, Salimans MM, Zwaan FE, Van Dorp W, Van der Ploeg M. Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction. *Transplantation* 1989; 48:72-76.

Bibliografija

127. Jonjic S, Pavic I, Polic B, Crnkovic I, Lucin P, Koszinowski U. Antibodies are not essential for the resolution of primary Cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med* 1994; 179:1713-1717.
128. Jones TR, Wiertz EJHJ, Sun L, Fish KN, Nelson JA. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:11327-11333.
129. Kari B, Gerhz R. A human Cytomegalovirus glycoprotein complex designated gCII is a major heparin-binding component of the envelope. *J Virol* 1992; 66:1761-1764
130. Kaye J, Gompels U, Minson A. Glycoprotein H of human Cytomegalovirus (HCMV) forms a stable complex with the HCMV UL115 gene product. *J Gen Virol* 1992; 73:2693-2698.
131. Keay S, Baldwin B. Anti-idiotypic antibodies that mimic gp86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment.. *J Virol* 1991; 65:5124-5128.
132. Keay S, Baldwin B. The human fibroblast receptor for human Cytomegalovirus is a phosphorylated glycoprotein. *J Virol* 1992; 66:4834-4838.
133. Keay S, Merigan TC, Rasmussen L. Identification of a cell surface receptor for the 86-Kilodalton glycoprotein of human Cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86:10100-10103.

134. Kemble GW, McCormick AL, Pereira L, Mocarski ES. A Cytomegalovirus protein with properties of Herpes simplex virus ICP8: partial purification and map position of the gene. *J Virol* 1987; 61:3143-3151.
135. Kemble GW, Mocarski ES. A host cell protein binds to a highly conserved sequence element (pac2) within the Cytomegalovirus a sequence. *J Virol* 1989; 63:4715-4728.
136. Kilpatrick BA, Huang ES. Human Cytomegalovirus genome: partial denaturation map and organization of genome sequences. *J Virol* 1977; 24:261-276.
137. Kim KS, Sapienza VJ, Carp RI, Moon HM. Analysis of structural polypeptides of purified human Cytomegalovirus. *J Virol* 1976; 20:604-611.
138. Klemola E, Kaariainen L. Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis. *Br Med J* 1965; 5470:1099-1102.
139. Kniess N, Mach M, Fay J, Britt WJ. Distribution of linear antigenic sites on glycoprotein gp55 of human Cytomegalovirus. *J Virol* 1991; 65:138-146.
140. Komanduri KV, Viswanathan MN, Wieder ED, Schmidt DK, Brecht BM, Jacobson MA, McCune JM. Restoration of cytomegalovirus-specific CD4+ T-lymphocyte responses after ganciclovir and highly active antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1. *Nat Med* 1998; 4:953-956.
141. Kondo K, Kaneshima H., Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:11879-11883.

- 142.Kondo K, Xu JK, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent gene-expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:11137-11142.
- 143.Kouzarides T, Bankier AT, Satchwell SC, Weston K, Tomlinson P, Barrell BG. Large-scale rearrangements of homologous regions in th genomes of HCMV and EBV. *Virology* 1987; 157:397-413.
- 144.Krause RM, Dimmock NJ, Morens DM. Summary of antibody workshop: The Role of Humoral Immunity in the Treatment and Prevention of Emerging and Extant Infectious Diseases. *J Infect Dis* 1997; 176:549-559.
- 145.LaFemina RL, Hayward GS. Replicative forms of human Cytomegalovirus with joined termini are found in permissively infected cells but not in non-permissive Balb/c-3T3 mouse cells. *J Gen Virol* 1983; 64:373-389.
- 146.Landini M, Re MC, Mirolo G, Baldassarri B, La Placa M. Human immune response to Cytomegalovirus structural polypeptides studied by immunoblotting. *J Med Virol* 1985; 17:303-311.
- 147.Landini M, Ripalti A, Sra K,Pouletty P. Human cytomegalovirus structural proteins: immune reaction against pp150 sinthetic peptides. *J Clin Microbiol* 1991; 29:1868-1872.

- 148.Lathey JL, Spector SA. Unrestricted replication of human cytomegalovirus in hydrocortisone-treated macrophages. *J Virol* 1991; 65: 6371-6375.
- 149.Lawrence GL, Chee M, Craxton MA, Gompels UA, Honess RW, Barrell BG. Human Herpesvirus 6 is closely related to human cytomegalovirus. *J Virol* 1990; 64:287-299.
- 150.Lazzarotto T, Varani S, Spezzacatena P, Pradelli P, Potena L, Lombardi A, Ghisetti V, Gabrielli L, Abate DA, Magelli C, Landini MP. Delayed acquisition of high-avidity anti-cytomegalovirus antibody is correlated with prolonged antigenemia in solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* 1998; 178:1145-1149.
- 151.Lehner PJ, Karttunen JT, Wilkinson GWG, Cresswell P. The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:6904-6909.
- 152.Lehner R, Meyer H, Mach M. Identification and characterization of a human Cytomegalovirus gene coding for a membrane protein that is conserved among human herpesviruses. *J Virol* 1989; 63:3792-3800.
- 153.Little SP, Jofre JF, Courtney RJ, Shaffer PA. A virion-associated glycoprotein essential for infectivity of Herpes simplex virus type 1. *Virology* 1981; 115:149-160.
- 154.Liu YN, Kari B, Gehrz RC. Human immune responses to major human cytomegalovirus glycoprotein complexes. *J Virol* 1988; 62:1066-70.

Bibliografia

- 155.Liu YNC, Klaus A, Kari B, Stinski MF, Eckhardt J, Gerhz RC. The N-terminal 513 amino acids of the envelope glycoprotein gB of human Cytomegalovirus stimulates both B and T cell immune responses in humans. *J Virol* 1991; 65:1644-1648.
- 156.Lobert PE, Hober D, Dewilde A, Wattré P. Cell membrane bound N-acetylneuraminic acid is involved in the infection of fibroblasts and phorbol-ester differentiated monocyte-like cells with human Cytomegalovirus. *Arch Virol* 1995; 140:1357-1371.
- 157.Lucht E, Sundqvist VA, Linde A, Bratt G, Sandstrom E, Heimdahl A, Nord CE, Wahren B. Presence of autologous neutralizing antibodies against cytomegalovirus (CMV) in serum of human immunodeficiency virus type 1 infected patients shedding CMV in saliva. *J Infect Dis* 1994; 169:1096-1100.
- 158.McKeating JA, Griffiths PD, Grundy JE. Cytomegalovirus in urine specimens has host beta 2 microglobulin bound to the viral envelope: a mechanism of evading the host immune response?. *J Gen Virol* 1987; 68:785-792.
- 159.MacCormac LP, Grundy JE. Human cytomegalovirus induces an Fc γ receptor (Fc γ R) in endothelial cells and fibroblasts that is distinct from the human cellular Fc γ R. *J Infect Dis* 1996; 174:1151-1156.
- 160.Macdonald JC, Torriani FJ, Morse LS, Karavellas MP, Reed JB, Freeman WR. Lack of reactivation of cytomegalovirus (CMV) retinitis after stopping CMV maintenance therapy in AIDS patients with sustained elevations in CD4 T cells in response to highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 1998; 177:1182-1187.

161. Maciejewski JP, Bruening EE, Donahue RE, Mocarski ES, Young NS., St Jeor SC. Infection of hemopoietic progenitor cells by human cytomegalovirus. *Blood* 1992; 80:170-178.
162. Maeda CL, Ihara S, Watanabe Y. Morphogenesis of nuclear inclusions and virus capsids in HEL cells infected with temperature sensitive mutants of human Cytomegalovirus. *J Gen Virol* 1979; 44:419-432.
163. Marshall GS, Rabalais GP, Stout GG, Waldeyer SL. Antibodies to recombinant glycoprotein B after natural infection correlate with neutralizing activity. *J Infect Dis* 1992; 165:381-384.
164. Mathiesen T, Brattstrom C, Andersson J, Linde A, Ljungman P, Wahren B. Immunoglobulin G subclasses and lymphocyte stimulatory responses to cytomegalovirus in transplant patients with primary cytomegalovirus infections. *J Med Virol* 1992; 36:65-69.
165. Mathiesen T, Sonnerborg A, von Sydow M, Gaines H, Wahren B. IgG subclass reactivity against human immunodeficiency virus (HIV) and cytomegalovirus in cerebrospinal fluid and serum from HIV-infected patients. *J Med Virol* 1988; 25:17-26.
166. McGeoch D, Cook S, Dolan A, Jamieson F, Telford E. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol* 1995; 247:443-458.

Bibliografia

167. McGravan MH, Smith MG. Ultrastructural, cytochemical and microchemical observations on Cytomegalovirus (salivary gland virus) infection of human cells in tissue culture. *Exp Mol Pathol* 1965; 4:1-10.
168. McLaughlin-Taylor E, Pande H, Forman, SJ, Tanamachi B, Li CR, Zaia JA, Greenberg PD, Riddell SR. Identification of the major late human matrix protein pp65 as a target antigen for CD8(+) virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol* 1994; 43:103-110.
169. Mendelsen M, Monard S, Sissons P, Sinclair J. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J Gen Virol* 1996; 77:3099-3102.
170. Meyer H, Masuho Y, Mach M. The gp116 of the gp58/116 complex represents the amino-terminal part of the precursor molecule and contains a neutralizing epitope. *J Gen Virol* 1990; 71:2443-2450.
171. Meyer H, Sundquist VA, Pereira L, Schiller D, Mach M. Glycoprotein B (gp116) of human Cytomegalovirus contains epitopes for strain-common and strain specific antibodies. *J Gen Virol* 1992; 73:2375-2383.
172. Meyer-König U, Serr A, von Laer D, Kirste G, Wolff C, Haller O, Neumann-Haefelin D, Hufert FT. Human cytomegalovirus immediate early and late transcripts in peripheral blood leukocytes: diagnostic value in renal transplant recipients. *J Infect Dis* 1995; 171:705-709.

173. Meyer-Köning U, Vogelberg Ch, Bongarts A, Kampa D, Delbrück Wolff-Vorbeck G, Kirste G, Haberland M, Hufert F, Von Laer D. Glycoprotein B genotype correlates with cell tropism in vivo of human cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 1998; 55:75-81.
174. Michaelsen TE, Garred P, Aase A. Human IgG subclass pattern of inducing complement-mediated cytotoxicity depends on antigen concentration and to a lesser extent on epitope patchiness, antibody affinity and complement concentration. *Eur J Immunol* 1991; 21:11-16.
175. Milne RS, Paterson DA, Booth JC. Human cytomegalovirus glycoprotein H/glycoprotein L complex modulates fusion-from-without. *J Gen Virol* 1998; 79: 855-865.
176. Minton EJ, Tysoe C, Sinclair JH, Sissons JGP. Human cytomegalovirus infection of the monocyte/macrophage lineage in bone marrow. *J Virol* 1994; 68, 4017-4021.
177. Mitchell SM, Membrey WL, Youle MS, Obi A, Worrell S, Gazzard BG. Cytomegalovirus retinitis after the initiation of highly active antiretroviral therapy: a 2 year prospective study. *Br J Ophthalmol* 1999; 83:652-655.
178. Mocarski EJ, Abenes GB, Manning WC, Sambucetti LC, Cherrington JM. Molecular genetic analysis of Cytomegalovirus gene regulation in growth, persistence and latency. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 154:47-74.

Bibliografia

179. Mocarski ES, Liu AC, Spaete RR. Evidence for postranscriptional modulation of human Cytomegalovirus gene expression. En: Wagner EK, ed. Herpesvirus transcription and its control. Boca Raton: CRC Press 1991; 287-300.
180. Mocarski ES, Liu AC, Spaete RR. Structure and variability of the a sequence in the genome of human Cytomegalovirus (Towne strain). *J Gen Virol* 1987; 68:2223-2230.
181. Mocarski ES, Pereira L, Michael N. Precise localization of genes on large animal virus genomes: use of lambda gt11 and monoclonal antibodies to map the gene for a Cytomegalovirus protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:1266-1270.
182. Mocarski ES. Cytomegalovirus, biology and replication. En: Roizman B, Whitley RJ, Lopez C, eds. The human herpesviruses. New York: Raven press, 1993; 173-226.
183. Muruyama T, Kuno K, Jisaki F, Obuchi M, Sakamuro D, Furukawa T, Mukaida N and Matsushima K. Enhancement of human cytomegalovirus replication in a human lung fibroblast cell line by interleukin-8. *J Virol* 1994; 68:7582-7585.
184. Navarro D, Lennette E, Tugizov S, Pereira L. Humoral immune response to functional regions of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J Med Virol* 1997; 52:451-459.
185. Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. Glycoprotein B of human Cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell and fusion of infected cells. *Virology* 1993; 197:143-158.

186. Nowlin DM, Cooper NR, Compton T. Expression of a human Cytomegalovirus receptor correlates with infectibility of cells. *J Virol* 1991; 65:3114-3121.
187. O'Sullivan CE, Drew WL, McMullen DJ, Miner R, Lee JY, Kaslow RA, Lazar JG, Saag MS. Decrease of cytomegalovirus replication in human immunodeficiency virus infected-patients after treatment with highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 1999; 180:847-849.
188. Pachl C, Probert WS, Hermsen KM, Masiarz FR, Rasmussen L, Merigan TC. The human Cytomegalovirus strain Towne glycoprotein H gene encodes glycoprotein p86. *Virology* 1989; 169:418-426.
189. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced Human immunodeficiency virus infection. *New Eng J Med* 1998 338:853-860.
190. Peek R, Verbraak F, Bruinenberg M, Van der Lelij A, Van den Horn G, Kijlstra A. Cytomegalovirus glycoprotein B genotyping in ocular fluids and blood of AIDS patients with cytomegalovirus retinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; Jun 39:1183-1187.
191. Pellegrin I, Garrigue I, Binquet C, Chene G, Neau D, Bonot P, Bonnet F, Fleury H, Pellegrin JL. Evaluation of new quantitative assays for diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3124-3132.

Bibliografia

- 192.Percivalle E, Revello MG, Vago L, Morini F, Gerna G. Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. *J Clin Invest* 1993; 92:663-670.
- 193.Pereira L. Function of glycoprotein B homologues of the family Herpesviridae. *Infect Agents Dis* 1994; 3:9-28.
- 194.Pereira L, Hoffman M, Cremer N. Electrophoretic analysis of polypeptides immunoprecipitated from extracts of Cytomegalovirus infected cells by human sera. *Infect Immun* 1982; 36:933-942.
- 195.Pereira L, Hoffman M, Gallo D, Cremer N. Monoclonal antibodies to human Cytomegalovirus: three surface membrane proteins with unique immunological and electrophoretic properties specify cross-reactive determinants. *Infect Immun* 1982; 36:924-932.
- 196.Pereira L, Hoffman M, Tatsuno M, Dondero D. Polymorphism of human Cytomegalovirus glycoproteins characterized by monoclonal antibodies. *Virology* 1984; 139:73-86.
- 197.Pereira L, Lennette E, Paz P, Navarro D. Humoral immunity to glycoprotein B in primary and recurrent human Cytomegalovirus infections. En: *Progress in Cytomegalovirus research*. Landini MP, ed. Amsterdam: Elsevier 1993; 145-148.

198. Pereira L, Navarro D, Jahn G. Proteins of human Cytomegalovirus that elicit humoral immunity. En: Molecular aspects of human Cytomegalovirus diseases. Becker Y, Darai G, Huang ES, eds. Heidelberg: Springer-Verlag 1993; 2:437-464.
199. Pereira L, Stagno S, Hoffman M, Volanakis JE. Cytomegalovirus-infected cell polypeptides immune-precipitated by sera from children with congenital and perinatal infections. *Infect Immun* 1983; 39:100-108.
200. Perez JL, Salvá J, Niubó J. La prueba de antigenemia para Citomegalovirus. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994; 12:252-269.
201. Pizzorno MC, Hayward GS. The IE2 gene products of human Cytomegalovirus specifically down-regulate expression from the major immediate-early promoter through a target located near the cap site. *J Virol* 1990; 64:6154-6165.
202. Pizzorno MC, O Hare P, Sha L, LaFemina RL, Hayward GS. Transactivation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human Cytomegalovirus. *J Virol* 1988; 62:1167-1179.
203. Pleskoff O, Treboute C, Alizon M. The cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 can enhance cell-cell fusion mediated by different viral proteins. *J Virol* 1998; 72:6389-6397.
204. Plotkin SA. Vaccination against cytomegalovirus, the changeling demon. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18:313-325.

Bibliografía

205. Plotkin SA, Starr SE, Friedman HM, Gonczol E, Brayman K. Vaccines for the prevention of human cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis* 1990; 12, Suppl 7:S827-838.
206. Polic B, Hengel H, Krmpotic A, Trgvicich J, Pavic I, Lucin P, Jonjic S, Koszinowski UH. Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J Exp Med* 1998; 188:1047-1054.
207. Pritchett RF. DNA nucleotide sequence heterogeneity between the Towne and AD169 strains of Cytomegalovirus. *J Virol* 1980; 36:152-161.
208. Qadri I, Navarro D, Paz P, Pereira L. Assembly of conformation-dependent neutralizing domains on human Cytomegalovirus glycoprotein B. *J Gen Virol* 1992; 73:2913-2921.
209. Quinnan GV, Manischewitz JE. The role of natural killer cells and antibody-dependent cell mediated cytotoxicity during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med* 1979; 150:1549-1554.
210. Quinnan GV, Kirmoni N, Rook AH, Manischewitz JF, Jackson L, Moreschi G, Santos GW, Saral R, Burns WH. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection. HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *New Engl J Med* 1982; 307:7-13.

- 211.Radsak K, Brucher KH, Britt W, Shiou H, Schneider D, Kollert A. Nuclear compartmentation of glycoprotein B of human Cytomegalovirus. *Virology* 1990; 177:515-522.
- 212.Rasmussen L, Hong C, Zipeto D, Morris S, Sherman D, Chou S, Miner R, Drew WL, Wolitz R, Dowling A, Warford A, Merigan TC. (b) Cytomegalovirus gB genotype distribution differs in human immunodeficiency virus-infected patients and immunocompromised allograft recipients. *J Infect Dis* 1997; 175:179-184.
- 213.Rasmussen L, Matkin C, Spaete R, Pachl C, Merigan TC. Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans. *J Infect Dis* 1991; 164:835-842.
- 214.Rasmussen L, Morris S, Wolitz R, Dowling A, Fessell J, Holodniy M, Merigan TC. Deficiency in antibody response to human cytomegalovirus glycoprotein gH in human immunodeficiency virus-infected patients at risk for cytomegalovirus retinitis. *J Infect Dis* 1994; 170:673-677.
- 215.Rasmussen L, Morris S, Zipeto D, Fessel J, Wolitz R, Dowling A, Merigan TC. Quantitation of human cytomegalovirus DNA from peripheral blood cells of human immunodeficiency virus-infected patients could predict cytomegalovirus retinitis. *J Infect Dis* 1995; 171:177-182.
- 216.Rasmussen L, Nelson RM, Kelsall DC, Merigan TC. Murine monoclonal antibody to a single protein neutralizes the infectivity of human Cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:876-880.

Bibliografía

217. Rasmussen L, Zipeto R, Wolitz RA, Dowling A, Efron B, Merigan TC. (a) Risk for Retinitis in patients with AIDS can be assessed by quantitation of threshold levels of cytomegalovirus DNA burden in blood. *J Infect Dis* 1997; 176: 1146-1155.
218. Reddehase MJ. The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:390-396.
219. Reichert CM, O'Leary TJ, Levens DL, Simrell CR, Macher AM. Autopsy pathology in the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Pathol* 1983; 112:357-382.
220. Revello MG, Percivalle E, Zavattoni M, Parea M, Grossi P, Gerna G. Detection of human cytomegalovirus immediate early antigen in leukocytes as a marker of viremia in immunocompromised patients. *J Med Virol* 1989; 29:88-93.
221. Rice GPA, Schrier RD, Oldstone MBA. Cytomegalovirus infects human lymphocytes and monocytes: virus expression is restricted to immediate-early gene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:6134-6138.
222. Roizman B, Carmichael LE, Deinhart F, de The G, Nahmias W, Plowright F, Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus study group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 1981; 16:201-217.
223. Roizman B, Whitley RJ, Lopez C. *The human Herpesviruses*. 1993. Raven press. New York.

224. Rowe WP, Hartley JW, Waterman S. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 92:418-424.
225. Saltzman RL, Quirk MR, Jordan MC. Disseminated cytomegalovirus infection - molecular analysis of virus and leukocyte interactions in viraemia. *J Clin Invest* 1988; 81:75-81.
226. Sambuccetti LC, Cherrington JM, Wilkinson GWG, Mocarski ES. NF-Kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *EMBO J* 1989; 8:4251-4258.
227. Sarmati L, Nicastri E, el-Sawaf G, Ventura L, Salanitro A, Ercoli L, Vella S, Andreoni M. Increase in neutralizing antibody titer against sequential autologous HIV-1 isolates after 16 weeks saquinavir (Invirase) treatment. *J Med Virol* 1997; 53:313-318.
228. Sarov I, Abady I. The morphogenesis of human Cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomeglovirions and dense bodies. *Virology* 1975; 66:464-473.
229. Severi B, Landini MP, Govoni E. Human Cytomegalovirus morphogenesis: an ultrastructural study of the late cytoplasmic phases. *Arch Virol* 1988; 98:51-64.
230. Schoppel K, Schmidt C, Einsele H, Hebart H, Mach M. Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus-specific proteins in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* 1998; 178:1233-1243.

Bibliografia

- 231.Schoppel K, Kropff B, Schmidt C, Vornhagen R, Mach M. The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein-specific antibodies. *J Infect Dis* 1997; 175:533-544.
- 232.Schrier RD, Freeman WR, Wiley CA, McCutchan JA. Immune predispositions for cytomegalovirus retinitis in AIDS. *J Clin Invest* 1995; 95:1741-1746.
- 233.Schrier RD, Freeman WR, Wiley CA, McCutchan JA. CMV-specific immune responses and HLA phenotypes of AIDS patients who develop CMV retinitis. *Adv Neuroimmunol* 1994; 4:327-336.
- 234.Schrier RD, Wiley CA, Spina C, McCutchan JA, Grant I. Pathogenic and protective correlates of T cell proliferation in AIDS. *J Clin Invest* 1996; 98:731-740.
- 235.Shahgasenpour S, Woodroffe SB, Garnett HM. Alterations in the expression of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 after in vitro infection of endothelial cells with a clinical isolate of human cytomegalovirus. *Microbiol Immunol* 1997; 41:121-129.
- 236.Shellam GR, Allan JE, Papadimitriou JM, Bancroft GJ. Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mice. *Proc Natl Sci USA* 1981; 78:5104-5108.
- 237.Shepp DH, Match ME, Ashraf AB, Lipson SM, Millan C, Pergolizzi R. Cytomegalovirus glycoprotein B groups associated with retinitis in AIDS. *J Infect Dis* 1996; 174:184-187.

238. Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM, Arnheim N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1988; 158:1185-1192.
239. Shinkai M, Bozzette SA, Powderly W, Frame P, Spector SA. Utility of urine and leukocyte cultures and plasma DNA polymerase chain reaction for identification of AIDS patients at risk for developing human cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 1997; 175:302-308.
240. Sia IG, Patel R. New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:83-121.
241. Simmons P, Kaushansky K, Torok-Storb B. Mechanisms of cytomegalovirus-mediated myelosuppression: perturbation of stromal cell function versus direct infection of myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:1386-1390.
242. Singzger C, Jahn G. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* 1996; 39:302-319.
243. Skolnik PR, Kosloff BR, Hirsch MS. Bidirectional interactions between human immunodeficiency virus type 1 and cytomegalovirus. *J Infect Dis* 1988; 157:508-514.
244. Slobedman B, Mocarski ES. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J Virol* 1999; 73:4806-4812.

Bibliografia

245. Smith JD, de Harven E. Herpes simplex virus and human Cytomegalovirus replication in WI-38 cells. An ultrastructural study of viral penetration. *J Virol* 1974; 14:945-956.
246. Smith MG. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 92:424-430.
247. Soderberg C, Giugni TD, Zaia JA, Larsson S, Wahlberg JM, Moller E. CD13 (human aminopeptidase N) mediates human Cytomegalovirus infection. *J Virol* 1993; 67:6576-6585.
248. Spaete R, Thayer R, Probert W, Masiarz F, Chamberlian S, Rasmussen L, Merigan T, Pachl C. Human cytomegalovirus strain Towne glycoprotein B is processed by proteolytic cleavage. *Virology* 1988; 167:207-225.
249. Speckner A, Glykofrydes D, Ohlin M, Mach M. Antigenic domain 1 of human cytomegalovirus glycoprotein B induces a multitude of different antibodies which, when combined, results in incomplete virus neutralization. *J Gen Virol* 1999; 80:2183-2191.
250. Spector DH, Hock L, Tamashiro JC. Cleavage maps for human Cytomegalovirus DNA strain for restriction endonucleases EcoRI, BgIII, and HIndIII. *J Virol* 1982; 42:558-582.
251. Spector SA, Merrill R, Wolf D, Dankner WM. Detection of human cytomegalovirus in plasma of AIDS patients during acute visceral disease by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2359-2365.

- 252.Spector SA, Wong R, Hsia K, Pilcher M, Stempien MJ. Plasma cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts CMV disease and survival in AIDS patients. *J Clin Invest* 1998; 101:497-502.
- 253.Spector SA, Wong R, Hsia K, Crager M, Pilcher M, Cabral S, Stempien MJ. Cytomegalovirus (CMV) DNA load is an independent predictor CMV disease and survival in advanced AIDS. *J Virol* 1999; 73:7027-7030.
- 254.Spiegelberg HL. Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. *Adv Immunol* 1974; 19:259-294.
- 255.Stagno S, Reynolds DW, Huang ES, Thames SD, Smith RJ, Alford CA. Congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 1977; 296:1254-1258.
- 256.Stanier P, Taylor DL, Kitchen AD, Wales N, Tryhorn Y, Tjoms AS. Persistence of cytomegalovirus in mononuclear cells in peripheral blood from blood donors. *Br Med J* 1989; 29:897-898.
- 257.Steffens H-P, Kurz S, Holtappels R, Reddehase MJ. Preemptive CD8 T-cell immunotherapy of acute cytomegalovirus infection prevents lethal disease, limits the burden of latent viral genome and reduces the risk of virus recurrence. *J Virol* 1998; 72:1797-1804.
- 258.Stenberg RM, Fortney J, Barlow SW, Magrane BP, Nelson JA, Ghazal P. Promoter-specific transactivation and repression by human Cytomegalovirus immediate-early protein involves common and unique protein domains. *J Virol* 1990; 64:1556-1565.

259. Stenberg RM, Witte PR, Stinski. Multiple spliced and unspliced transcripts from human Cytomegalovirus immediate-early region 2 and evidence for a common initiation site within immediate-early region 1. *J Virol* 1985; 56:665-675.
260. Stinski MF. Human Cytomegalovirus: glycoproteins associated with virions and dense bodies. *J Virol* 1976; 19:594-609.
261. Stinski MF. Sequence of protein synthesis in cells infected by human Cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. *J Virol* 1978; 26:686-701.
262. Sundqvist VA, Linde A, Kurth R, Werner A, Helm EB, Popovic M, Gallo RC, Wahren B. Restricted IgG subclass responses to HTLV-III/LAV and to cytomegalovirus in patients with AIDS and lymphadenopathy syndrome. *J Infect Dis* 1986; 153:970-973.
263. Taylor HP, Cooper NR. The human Cytomegalovirus receptor on fibroblasts is a 30-Kilodalton membrane protein. *J Virol* 1990; 64:2484-2490.
264. Taylor-Wiedeman J, Sissons P., Sinclair J. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J Virol* 1994; 68. 1597-1604.
265. Taylor-Wiedeman J, Sissons P, Borysiewicz LK, Sinclair JHG. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* 1991; 72:2059-2064.

266. Tevethia MJ, Spector DJ. Heterologous transactivation among viruses. *Prog Med Virol* 1989; 36:120-190.

267. Thomas LH, Cook RS, Wyld SG, Furze JM, Taylor G. Passive protection of gnotobiotic calves using monoclonal antibodies directed at different epitopes on the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 1998; 177:874-880.

268. Thomsen DR, Stenbergt RM, Goins WF, Stinski MF. Promoter-regulatory region of the major immediate-early gene of human Cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:659-663.

269. Tomazin R, Boname J, Hegde NR, Lewinsohn DM, Altschuler Y, Jones TR, Cresswell P, Nelson JA, Riddell SR, Johnson DC. Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat Med* 1999; 5:1039-1043.

270. Torok-Storb B, Boeckh M, Hoy C, Leisenring W, Myerson D, Gooley T. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation. *Blood* 1997; 90:2097-2102.

271. Tugizov S, Navarro D, Paz P, Wang Y, Qadri I, Pereira L. Function of human Cytomegalovirus glycoprotein B: syncytium formation in cells constitutively expressing gB is blocked by virus neutralizing antibodies. *Virology* 1994; 201:263-276.

Bibliografía

272. Tugizov S, Wang Y, Qadri I, Navarro D, Maidji E, Pereira L. Mutated forms of human cytomegalovirus glycoprotein B are impaired in inducing syncytium formation. *Virology* 1995; 209:580-591.
273. Tural C, Romeu J, Sirera G, Andreu D, Conejero M, Ruiz S, Jou A, Bonjoch A, Ruiz L, Arno A, Clotet B. Long-lasting remission of cytomegalovirus retinitis without maintenance therapy in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1998; 177:1080-1083.
274. Turtinen, L.W., Saltzman, R., Jordan. M.C., Haase, A.T. Interactions of human cytomegalovirus with leukocytes in vivo: analysis by in situ hybridization. *Microb Pathog* 1987; 3:287-297.
275. Vogelberg C, Meyer-König U, Hufert FT, Kirste G, von Laer D. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in renal transplant recipients. *J Med Virol* 1996; 50:31-34.
276. Urban M, Britt W, Mach M. The dominant linear neutralizing antibody-binding site of glycoprotein gp86 of human cytomegalovirus is strain specific. *J Virol* 1992; 66:1303-1311.
277. Urban M, Klein M, Britt WJ, Hassfurth E, Mach M. Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *J Gen Virol* 1996; 77:1537-1547.

278. Urban U, Winkler T, Landini M, Britt W, Mach M. Epitope-specific distribution of IgG subclasses against antigenic domains on glycoproteins of human Cytomegalovirus. *J Infect Dis* 1994; 169:83-90.
279. Utz U, Britt WJ, Vugler L, Mach M. Identification of a neutralizing epitope on glycoprotein gp58 of human Cytomegalovirus. *J Virol* 1989; 66:5290-5297.
280. Wagner B, Kropff B, Kalbacher H, Britt W, Sundqvist VA, Ostberg L, Mach M. A continuous sequence of more than 70 amino acids is essential for antibody binding to the dominant antigenic site of glycoprotein gp58 of human cytomegalovirus. *J Virol* 1992; 66:5290-5297.
281. Waldman WI, Knight DA, Huang EH, Sedmak DD. Bidirectional transmission of infectious cytomegalovirus between monocytes and vascular endothelial cells: an in Vitro model. *J Infect Dis* 1995; 171:262-272.
282. Wang JB, Adler SP. Salivary antibodies to cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B accurately predict CMV infections among preschool children. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2632-2634.
283. Watanabe M, Ito M, Kamiya H., Sakurai M. Adherence of peripheral blood leukocytes to cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Microbiol Immunol* 1996; 40:519-523.
284. Wathen MW, Stinski MF. Temporal regulation of human Cytomegalovirus transcription at immediate early and early times after infection. *J Virol* 1981; 38:446-459.

Bibliografía

285. Weinschenker BG, Wilton S, Rice GPA. Phorbol ester-induced differentiation permits productive human cytomegalovirus infection in a monocytic cell line. *J Immunol* 1988; 140, 1625-1631.
286. Weller TH, Hanshaw JB, Scott DE. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* 1960; 12:130-132.
287. Weller TH, Macauley JC, Craig JM. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957; 94:4-12.
288. Welsh RM, Brubaker JO, Vargas-Cortés M, O'Donnell CL. Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occurs independently of T and B cell function. *J Exp Med* 1991; 173:1053-1063.
289. Weststrate MW, Geelen JL, Van der Noordaa J. Comparison of the physical maps of the DNAs of two Cytomegalovirus strains. *J Gen Virol* 1983; 64:47-55.
290. Wiertz EJHJ, Jones TR, Sun L, Bogoyo M, Geuze HJ, Ploegh HL. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 1996; 84:769-779.
291. Wolf DG, Spector SA. Diagnosis of human cytomegalovirus central nervous system disease in AIDS patients by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 1992; 166:1412-1415.

- 292.Woo PC, Lo CY, Lo SK, Siau H, Peiris JS, Wong SS, Luk WK, Chan TM, Lim WW, Yuen KY. Distinct genotypic distributions of cytomegalovirus (CMV) envelope glycoprotein in bone marrow and renal transplant recipients with CMV disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4:515-518.
- 293.Wright HT Jr., Goodheart CR, Lielausis A. Human Cytomegalovirus. Morphology by negative staining. *Virology* 1964; 23:419-424.
- 294.Wright JF, Kurosky A, Wasi S. An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198: 983-989.
- 295.Zipeto D, Hong C, Gerna G, Zavattoni M, Katzenstein D, Merigan TC, Rasmussen L. Geographic and demographic differences in the frequency of human cytomegalovirus gB genotypes 1-4 in immunocompromised patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14: 533-536
- 296.Zipeto D, Revello MG, Silini E, Parea M, Percivalle E, Zavattoni M, Milanese G, Gerna G. Development and clinical significance of a diagnostic assay based on the polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus DNA in blood samples from immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1992; 30:527-530.

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la fecha,
acordó otorgar por unanimidad a esta Tesis doctoral de

D. Juan Alberto Eguídan

la calificación de Excel-lent cum laude

Valencia, a 21 de Diciembre de 2000

El Secretario.

El Presidente

