



Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Medicina

Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"

Cuantificación del receptor CD94/NKG2C en células mononucleares de mujeres embarazadas y su relación con infección y reactivación de citomegalovirus

Tesis para la obtención del Diploma de Especialidad en Ginecología y Obstetricia

Presenta

Dra. Adriana Arias Bautista

Asesores

Dr. Daniel E. Noyola Cherpitel

Dr. Manuel Zamarripa Leyva

**San Luis Potosí, San Luis Potosí
Febrero del 2009**



**Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina.
Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"**

Cuantificación del receptor CD94/NKG2C en células mononucleares de mujeres embarazadas y su relación con infección y reactivación de citomegalovirus

Tesis para la obtención del Diploma de Especialidad en Ginecología y Obstetricia

Presenta

Dra. Adriana Arias Bautista

Asesores:

Dr. Daniel E. Noyola Cherpitel 

Dr. J. Manuel Zamarripa Leyva 

Jefe de la División de Ginecología y Obstetricia

Dr. C. Julio Castelo Ruelas 

Sinodales

Dr. Salvador de la Maza Labastida

Dra. Patricia Padilla Zabalegui

Dr. Martín Magaña Aquino

**San Luis Potosí, San Luis Potosí
Febrero del 2009**

Agradecimientos

A Dios y mis Abuelos que me cuidan desde el cielo.

A José Antonio por ser mi apoyo en mis días oscuros, darme su amor y comprensión.

A mis padres por su amor y apoyo.

A mis hermanas por apoyarme incondicionalmente y hacerme reír.

A mis amigos y compañeros por hacerme más llevadero el tiempo de residencia.

Al Hospital Central por abrirme sus puertas y enseñarme en sus instalaciones.

A los doctores por sus enseñanzas y paciencia.

A los colaboradores de este estudio, Dr. Noyola por su grandísimo apoyo, Dr. Zamarripa por apoyarme, Andreu y Luis por quedarse todas las tardes a la recolección de muestras, Adriana, Samuel y la QFB Elizabeth en los laboratorios. Al Dr. González Amaro y Dr. López Botet por su apoyo.

INDICE

Antecedentes	1
· Introducción.....	1
· Infección por Citomegalovirus.....	1
· Inmunidad contra citomegalovirus	2
· Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por el citomegalovirus	3
· Reactivación de citomegalovirus durante el embarazo.....	4
Justificación	6
Hipótesis	6
Objetivos	6
Materiales y Métodos	7
· Tipo de estudio.....	7
· Lugar de estudio.....	7
· Universo de estudio.....	7
· Criterios de selección de muestra.....	7
· Recolección de datos.....	8
· Variables del estudio.....	8
· Variables predictoras.....	8
· Variables de respuesta.....	8
· Covariables.....	8
· Definiciones de las variables de estudio.....	9
· Aspectos éticos.....	10
· Selección y reclutamiento de los participantes.....	10
· Recolección y procesamiento de muestras.....	10
· Métodos de laboratorio.....	11
· Determinación de anticuerpos contra citomegalovirus.....	11
· Análisis por citometría de flujo.....	11
· Determinación de excreción de citomegalovirus.....	11
· Cultivo de citomegalovirus.....	12
· Determinación de citomegalovirus mediante PCR.....	12

· Extracción de ADN de secreción vaginal.....	12
· Detección de citomegalovirus mediante PCR.....	13
· Análisis estadísticos.....	14
Resultados	15
Discusión	19
Conclusiones	21
Bibliografía	22
Anexo 1.....	25
Anexo 2.....	28
Anexo 3.....	29

ANTECEDENTES

Introducción

El citomegalovirus (CMV) es un virus de distribución mundial y que causa infecciones muy frecuentemente. Las infecciones por citomegalovirus son comunes en la niñez y para la edad adulta la gran mayoría de la población ha sido infectada por este virus. La mayoría de las infecciones causadas por este virus no producen ningún síntoma (pasan desapercibidas) y no causan ningún daño a la persona que las padece. Sin embargo, en ciertas circunstancias este virus puede causar problemas al sujeto que padece de la infección. La transmisión del virus al recién nacido durante el embarazo sucede en aproximadamente una de cada 100 mujeres. Los recién nacidos que padecen de esta infección pueden tener problemas en la audición y en el desarrollo intelectual. Los motivos por los cuales algunas mujeres transmiten la infección a sus bebés mientras que en otras personas esto no ocurre aun no se conocen con claridad.

El propósito de este estudio fue identificar la frecuencia de reactivación del CMV durante el embarazo y su relación con la presencia de diversos receptores en las células mononucleares de sangre periférica. Esta información podría ser de utilidad para comprender mejor los mecanismos por los cuales se produce la infección del producto.

Infección por CMV

El CMV humano pertenece a la familia de los Herpesvirus. Es un virus de distribución mundial e infecta a la mayoría de la población a lo largo de la vida. Las infecciones por CMV generalmente se producen durante la infancia como una infección primaria. Posteriormente el virus se mantiene latente en el organismo originando reactivaciones que determinan su presencia periódica en la sangre, secreciones vaginales, orina, leche y saliva. Aproximadamente el 1% de los recién nacidos presentan excreción de este virus al nacimiento, debido a adquisición intrauterina del mismo.^{1,2} A partir del nacimiento los lactantes adquieren la infección de forma progresiva. El virus puede

adquirirse de la madre al momento del parto o a través de la lactancia materna. Posteriormente puede haber contagio a través de la exposición a secreciones, tales como la saliva, de sujetos que excretan el virus. Las infecciones por CMV son más frecuentes en niños pequeños y en niños que asisten a Centros de Desarrollo y Cuidado Infantil (CDCI) debido a la presencia del virus en la saliva. La infección cursa de forma asintomática en el 90% de los casos. Sin embargo, cuando se presenta en el embarazo puede causar daño al producto y originar complicaciones auditivas o neurológicas.^{3,4}

La frecuencia de excreción del CMV es variable y tiene relación con la edad. Pass y colaboradores encontraron que en menores de 1 año se excreta en un 9%. En el segundo año se llega a excretar hasta en un 89% de niños que acuden a CDCI, y el 59% tuvo liberación el CMV a lo largo de 12 meses.⁵ En estudios realizados en la ciudad de Iowa se encontró que los niños de CDCI presentaban excreción del CMV en saliva en un 71%, siendo la edad promedio de 24.6 meses de edad.⁶ En la ciudad de San Luis Potosí encontramos la presencia de CMV en saliva de 11.2 % de los niños evaluados en diversos CDCI.⁷

Inmunidad contra CMV

La infección por CMV induce formación de anticuerpos de forma temprana, sin embargo estos no tienen un efecto importante en el control de la infección de este virus. La excreción de CMV en sujetos con infección congénita o adquirida al momento del parto es muy prolongada.⁸ La respuesta inmune celular contra CMV parece ser poco eficiente en niños con infección congénita.⁹ Se desconoce con precisión los eventos inmunológicos que se desarrollan durante una infección aguda por CMV.¹⁰ La producción de anticuerpos no correlaciona directamente con la duración de excreción del virus, mientras que la proliferación de linfocitos en sujetos con infección por CMV se encuentra disminuida.¹⁰ El CMV produce infecciones persistentes y, cuando se logra controlar su replicación, entra en estado de latencia en diferentes células, incluyendo leucocitos, endotelio, entre otras.

Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por el CMV

El CMV es un virus DNA de doble cadena; su genoma de 230-kb codifica para alrededor de unos 200 marcos de lectura abierta (ORF, *open reading frames*). Este virus infecta a distintos tipos celulares (endoteliales, epiteliales, hepatocitos, músculo liso, neuronas, células hematopoiéticas); sin embargo, la infección productiva *in vitro* se da en fibroblastos.¹¹ El ciclo de vida viral está regulado por la expresión secuencial de genes inmediatos, tempranos y tardíos, siendo estos últimos los responsables del efecto citopático. Las células mielomonocíticas y algunas células endoteliales funcionan como reservorios y facilitan la diseminación viral.¹² La infección por CMV induce formación de anticuerpos de forma temprana, sin embargo estos no tienen un efecto importante en el control de la infección de este virus. La respuesta efectiva del huésped contra el CMV requiere de la participación coordinada tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa que involucra principalmente a las células NK y a los CTL específicos. Éstos reconocen péptidos derivados de diferentes moléculas del CMV. Varias de estas proteínas regulan a la baja la expresión de las moléculas MHC clase I e interfieren con la presentación de antígeno a los linfocitos T.¹²

Los receptores de células NK semejantes a inmunoglobulinas (*killer cell immunoglobulin-like receptors*, KIRs), los receptores de leucocitos semejantes a inmunoglobulinas o transcritos semejantes a inmunoglobulinas (*leukocyte Ig-like receptor*, LIR/LILRs o *Ig-like transcripts ILTs*) y los receptores de células NK semejantes a lectinas, CD94/NKG2 (KLRs), son moléculas que reconocen específicamente a las moléculas MHC clase I y se expresan en células NK y algunos subtipos de linfocitos T.¹³

CD94/NKG2A y CD94/NKG2C son lectinas codificadas en el complejo de células NK (NKC) en el cromosoma humano 12. El heterodímero CD94/NKG2A constituye un receptor inhibitorio que recluta a la proteína tirosin fosfatasa que contiene dominios SH2-1, (SHP-1) a través de las secuencias inhibitorias que contienen residuos de tirosina o ITIMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*) contenidas en la subunidad NKG2A;

mientras que CD94/NKG2C está acoplado a la vía de activación de cinasas de tirosina a través de la molécula adaptadora DAP12.^{14,15} Ambos receptores de células NK (NKR) reconocen específicamente a la molécula HLA-E, la cual puede presentar diversos péptidos.^{11,16} Por ejemplo, se ha observado que la secuencia líder de la glicoproteína UL40 del CMV contiene un péptido de unión a HLA-E y se ha demostrado que la expresión adenoviral de UL40 en líneas celulares induce un aumento en la expresión de superficie, independiente de TAP, de HLA-E.¹⁷ Se conoce relativamente poco del papel biológico de CD94/NKG2C. Recientemente se ha descrito que la infección por CMV puede modificar el repertorio de NKR de individuos sanos, y que esta tendencia a la expansión de células NKG2C+ puede actuar coordinadamente tanto en líneas de NKs como de células T. Un punto clave es si las células NK y T positivas para NKG2C realmente juegan un papel en la defensa contra el CMV o bien si su expansión corresponde exclusivamente a un epifenómeno de la infección.¹⁸ Con respecto a este punto Gumá y cols. demostraron que la expansión de la subpoblación de linfocitos positiva para NKG2C era consecuencia de la infección por CMV. La interacción de CD94/NKG2C con HLA-E concomitante a la inhibición de la expresión de HLA clase II puede contribuir a la proliferación de células positivas para NKG2C, sin embargo se ha observado una gran variabilidad de este fenómeno entre individuos, la explicación a este hallazgo permanece incierta; se cree que la frecuencia en los episodios de reactivación, la extensión de la infección latente y/o las diferencias genéticas entre los “aislados” de CMV pudieran ser relevantes en este contexto. Es por ello que se considera que el análisis de las células positivas para NKG2C puede ser un parámetro potencial para el monitoreo de la relación huésped-patógeno.¹¹

Reactivación de CMV durante el embarazo

La infección congénita por CMV puede presentarse tanto como consecuencia de una primoinfección o por reactivación del CMV durante el embarazo.¹ Cuando una mujer padece de primoinfección durante el embarazo la probabilidad de transmisión de la infección al feto es del 50% aproximadamente.¹⁹ Entre las mujeres embarazadas que cuentan con antecedente de infección previa por CMV, determinado mediante la presencia de anticuerpos (IgG) contra CMV, puede presentarse reactivación de

la infección latente. La frecuencia en que esto ocurre en las mujeres embarazadas, cuando se determina mediante el cultivo de secreciones vaginales o de orina es variable.²⁰ La frecuencia de excreción de CMV al final del embarazo suele ser mayor que al inicio del mismo. Shen y colaboradores encontraron excreción de CMV al inicio del embarazo en 13% de mujeres que fueron seguidas de forma longitudinal, mientras que la excreción del virus aumentó a 35.2% en el último trimestre. A pesar de la alta frecuencia de reactivación de CMV solamente aproximadamente el 1% de los recién nacidos padece de infección secundario a reactivación del virus. La transmisión vertical de CMV en mujeres seropositivas suele suceder en el grupo de mujeres que presentaron reactivación viral. Se desconoce cuál es el motivo por el cual se reactiva el CMV en un grupo de mujeres, mientras que en otro permanece en estado de latencia. Es probable que exista una reducción en la actividad de vigilancia inmune que habitualmente contiene a las infecciones latentes, tal como la acción de las células NK. Como se ha mencionado, el CMV induce una alteración en la expresión de moléculas de histocompatibilidad en las células infectadas, lo que conlleva a fallas en el reconocimiento por el sistema inmune. Por lo tanto, parece ser que las células NK juegan un papel importante en el control de la infección por CMV. Durante el embarazo, existen alteraciones similares en la expresión de antígenos de superficie a nivel placentario con el fin de evitar el rechazo del producto por el sistema inmune.²¹ Estas modificaciones parecen estar relacionadas a la evasión del reconocimiento de células no propias por las células NK. Es posible que la reactivación de CMV en mujeres embarazadas pudiera estar en relación a la expresión diferencial de los receptores de superficie de células NK en distintas mujeres, incluyendo la expresión del receptor CD94/NKG2C. Estos antecedentes sugieren la posibilidad de que las mujeres que presentaran una menor cantidad de células NK con moléculas activadoras (como CD94/NKG2C) se encuentren en mayor riesgo de presentar reactivación del CMV. Aún más, se ha descrito que cerca del 2% de la población carece de los genes que codifican para la molécula NKG2C.²² En vista de lo anteriormente expuesto, es posible que sean las mujeres con infección por CMV y ausencia de moléculas NKG2C las que tengan mayor riesgo de reactivación del CMV durante el embarazo, así como de transmisión del virus al feto.

JUSTIFICACIÓN

El CMV es un virus de distribución mundial e infecta a la mayoría de la población a lo largo de la vida. El CMV es la principal causa de infección congénita y causa daño neurológico y auditivo a los niños que padecen de esta infección. Es importante obtener mayor información acerca del mecanismo por el cual el CMV evade la respuesta inmune, permanece de forma latente en el huésped y se reactiva durante el embarazo. Se ha descrito que la infección por este virus puede modificar el repertorio de NKRs y que la subpoblación de células NK, NKG2C⁺ se encuentra aumentada en individuos sanos seropositivos para CMV; además, este aumento puede ser consecuencia de la infección viral. Es posible que las células NK, en particular aquellas que expresan NKG2C, tengan un papel importante en el desarrollo de la inmunidad contra este virus. De ser así, esta información sería muy relevante para entender el desarrollo de reactivación de CMV durante el embarazo y en consecuencia de la infección congénita por CMV.

HIPÓTESIS

1) La población de células mononucleares que expresan NKG2C es menor en las mujeres en quienes se reactiva el CMV durante el embarazo que en aquellas en que no se reactiva.

OBJETIVOS

- 1) Determinar la frecuencia de reactivación de CMV en mujeres embarazadas.
- 2) Determinar el número de células mononucleares que expresan el receptor NKG2C en mujeres embarazadas.
- 3) Determinar el número de células mononucleares que expresan otros receptores (NKG2A, KIR2DL1/SDS1/2DS3 y KIRSDLS/2DS2) en células mononucleares de mujeres embarazadas.

- 4) Comparar el porcentaje de células mononucleares que expresan los diversos receptores (NKG2C, NKG2A, KIR2DL1/SDS1/2DS3 y KIRSDLS/2DS2) entre pacientes con reactivación del CMV y pacientes sin reactivación de CMV.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Tipo de Estudio: Prospectivo, longitudinal, analítico.

2) Lugar de Realización

Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

Departamentos de Inmunología y de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

3) Universo de Estudio

Mujeres ≥ 18 años de edad y < 45 años de edad que acudieron a control prenatal en el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

4) Criterios de selección de la muestra

Criterios de inclusión

- Mujeres ≥ 18 años y < 45 años de edad.
- Diagnóstico de embarazo.
- Aceptación voluntaria para participar en el estudio, y consentimiento informado por escrito.
- Habitante del área urbana correspondiente a los municipios de San Luis Potosí y Soledad de Graciano Sánchez.

Criterios de exclusión

- Alteración conocida del sistema inmune:
Padecimiento oncológico.
Padecimiento autoinmune (artritis reumatoide, lupus eritematoso generalizado).
Inmunodeficiencia (congénita o adquirida).

- Padecimiento crónico tal como diabetes mellitus (pregestacional).

Criterios de eliminación

- Pacientes en los que no se pudiera llevar a cabo la toma de muestras o las determinaciones de laboratorio por cualquier causa.
- Mujeres con evidencia de infección reciente por CMV (anticuerpos IgM contra CMV positivos).
- Mujeres con ausencia de infección previa por CMV (anticuerpos IgG contra CMV negativos).
- Pacientes que decidieran abandonar el estudio.

5) Recolección de datos

Se recabó información demográfica y clínica en un formato de historia clínica de control prenatal con anexos de las recolecciones de muestras (Anexo 1).

6) Variables del estudio (Cuadro 1).

- **Variables predictoras**

Presencia de reactivación del CMV (presencia de CMV en orina o secreciones cervicales) en cualquiera de los tres trimestres del embarazo.

- **Variables de respuesta**

- 1) Porcentaje de células mononucleares que expresan el receptor CD94/NKG2C.
- 2) Porcentaje de células mononucleares que expresan los receptores CD94/NKG2A, KIR2DL1/2DS1/2DS3 y KIR2DLS/2DS2.

- **Posibles covariables**

Edad de la paciente.

Número de embarazo.

Duración de la gestación al ingreso al estudio.

Cuadro 1. Definiciones de las variables de estudio

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Codificación
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento al ingreso al estudio	Años de vida cumplidos por la paciente	Cuantitativa de intervalo	Años cumplidos (18 a 44 años)
Número de embarazo	Número de gestaciones que ha tenido la paciente incluida la gestación actual	Número de gestaciones referidas por la paciente	Numérica de conteo	Numérica (1, 2, 3, 4, n)
Duración de la gestación	Número de días transcurridos de gestación	Días entre la fecha de toma de primera muestra y la de inicio de la última menstruación	Cuantitativa de intervalo	Número de días
Porcentaje de células mononucleares que expresan CD94/NKG2C	Porcentaje de células mononucleares que expresan el receptor CD94/NKG2C	Porcentaje de células que expresan CD94/NKG2C identificadas por citometría de flujo	Cuantitativa de intervalo	Porcentaje (0 – 100%)
Porcentaje de células mononucleares que expresan CD94/NKG2A	Porcentaje de células mononucleares que expresan el receptor CD94/NKG2A	Porcentaje de células que expresan CD94/NKG2A identificadas por citometría de flujo	Cuantitativa de intervalo	Porcentaje (0 – 100%)
Porcentaje de células mononucleares que expresan KIR2DL1/2DS1/2DS3	Porcentaje de células mononucleares que expresan el receptor KIR2DL1/2DS1/2DS3	Porcentaje de células que expresan KIR2DL1/2DS1/2DS3 identificadas por citometría de flujo	Cuantitativa de intervalo	Porcentaje (0 – 100%)
Porcentaje de células mononucleares que expresan KIR2DLS/2DS2	Porcentaje de células mononucleares que expresan el receptor KIR2DLS/2DS2	Porcentaje de células que expresan KIR2DLS/2DS2 identificadas por citometría de flujo	Cuantitativa de intervalo	Porcentaje (0 – 100%)

7) Aspectos Éticos

Fue una investigación con riesgo mínimo en la cual se tomaron muestras biológicas (sangre, orina y secreciones cervicales) de las pacientes.

- Se obtuvo el consentimiento informado de las participantes (Anexos 2 y 3).
- No hubo costo para la participación en el estudio.
- El proyecto se revisó y aprobó por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Central.

8) Selección y reclutamiento de los participantes

Las participantes fueron pacientes femeninos que acudieron a la consulta de obstetricia del Hospital Central. Se entrevistó a las pacientes para explicar los objetivos y procedimientos del estudio. Se solicitó la firma de consentimiento informado para la inclusión de los sujetos en el estudio. Se tomaron muestras en tres ocasiones durante el embarazo (una muestra al inicio del control prenatal, una muestra hacia el final del segundo trimestre y la tercera en el último trimestre del embarazo).

Las muestras que se recolectaron fueron las siguientes:

- 1) Muestra sanguínea.
- 2) Muestra de orina.
- 3) Secreciones cervicales.

9) Recolección y procesamiento de muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante venopunción periférica. Las muestras de sangre se utilizaron para la cuantificación de leucocitos, así como las diversas subpoblaciones de células mononucleares. Además, la muestra obtenida durante la primera visita fue utilizada para la determinación de anticuerpos contra CMV.

Las muestras de orina se obtuvieron mediante técnica del chorro medio.

Las muestras de secreciones cervicales se tomaron con hisopos estériles.

Las muestras para cultivo viral se colocaron en medio de transporte (suero de ternera adicionado con antibióticos) y se colocaron en hielo para su transporte al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.²

10) Métodos de laboratorio

- **Determinación de anticuerpos contra CMV**

Se realizó la determinación de anticuerpos (IgM e IgG) contra CMV en la muestra tomada durante el primer trimestre del embarazo para determinar el antecedente de infección por CMV.

- **Análisis por citometría de flujo**

La detección de marcadores de superficie de leucocitos se llevó a cabo mediante protocolos estandarizados del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina. A continuación se describen brevemente los procedimientos. Se realizaron marcajes de superficie en sangre completa a partir de 1 ml de sangre venosa periférica utilizando los siguientes protocolos:

Protocolo 1- Se incubaron las células con anti-NKG2A-APC (R&D Systems) posterior a un lavado se incubaron con el anticuerpo anti-NKG2C-FITC (R&D Systems), por último se marcaron las células con anti-CD3-PerCP.

Protocolo 2- Las células se incubaron con diferentes anti-KIR (anti-KIR2DL1/2DS1, -KIR2DL1/2DS1/2DS3, -KIR3DL1, -KIR2DL2/2DS2) seguido de lavado y marcaje con un anticuerpo secundario Ig de conejo anti-ratón unido a FITC (Dako), posteriormente las muestras se incubaron con anti-CD56-PE y CD3-PerCP (BD Biosciences Pharmingen).

Protocolo 3- Las células se incubaron con los anti-KIR ya mencionados utilizando un anticuerpo secundario Ig de conejo anti-ratón unido a PE (Dako), posteriormente fueron incubadas con anti-NKG2A-APC o anti-NKG2C-FITC y por último con anti-CD3-PerCP.

Todas las células fueron analizadas en el citómetro de flujo FACScan, Becton Dickinson.

- **Determinación de excreción de CMV**

Se determinó mediante cultivo la excreción de CMV en orina y secreción vaginal. Adicionalmente se detectó la presencia del CMV mediante detección de ADN viral utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los procedimientos que se utilizaron se mencionan brevemente a continuación.

Procesamiento de la muestra:

- 1) Se agregó solución de antibióticos a las muestras.
- 2) Se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm en centrifuga refrigerada a 4 °C para separar los elementos celulares.

- **Cultivo de CMV**

Se inocularon 200 microlitros del sobrenadante de las muestras a monocapas de fibroblasto humano para el cultivo. Las líneas celulares inoculadas con la muestra se incubaron durante tres semanas a 37 °C. Las cajas de cultivo se inspeccionaron bajo microscopia de luz periódicamente para detectar la presencia del efecto citopático característico del CMV. La presencia de CMV se determinó en base a la presencia de efecto citopático el cual se observa al microscopio con un agrandamiento de las células formando un conglomerado en forma de huso.

- **Detección de CMV mediante PCR**

- Extracción de ADN de secreción vaginal**

Las muestras se procesaron siguiendo el siguiente procedimiento.

1. Se toman 200 µl de muestra (secreción cervical u orina).
2. Se coloca la muestra en un tubo Eppendorf de 1.5 ml de volumen y se agrega 500µl de buffer de lisis (Tris-HCL 10 mM pH8 , EDTA 02 mM pH 8, y NaCl 400 mM)
3. Se agregan 50 µl de SDS 10% en agua desionizada.
4. Se agregan 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml).
5. Se mezclar con vórtex durante 30 seg.
6. Se incuba a 55°C 90 minutos a 300 rpm en Thermomixer.
7. Se añaden 199.2 µl de NaCl 5 M y se mezcla suavemente por inversión manual.
8. Se centrifuga a 13 200 rpm (16 000 xg) por 15 minutos.
9. Se recuperar el sobrenadante en un tubo Eppendorf estéril y se etiqueta.
10. Se añaden 760 µl de isopropanol concentrado frio (almacenado a 4°C) y se mezcla por inversión manual.

11. Se deja reposar a -70°C durante 1 hora o -20°C toda la noche para precipitar el DNA
12. Se centrifuga a 13 200 rpm (16 000 xg) durante 10 minutos.
13. Se desecha el sobrenadante por decantación y se seca la pastilla de ADN dejando el tubo Eppendorf invertido en papel absorbente aproximadamente por 5 minutos.
14. Se lava con 500 μl de etanol al 70 % y se mezcla por inversión manual.
15. Se centrifuga a 10 000 rpm (9000 x g) por 10 minutos.
16. Se desecha el sobrenadante por decantación y se deja secar mediante inversión del Eppendorf sobre papel absorbente hasta sequedad total (aproximadamente 15 a 20 min).
17. Se resuspende la pastilla (DNA) en 50 μl de agua libre de nucleasas.
18. Se almacena en refrigeración (2 a 8°C) para realizar PCR.

- **Detección de CMV mediante PCR**

La detección de DNA de CMV se llevó a cabo utilizando un protocolo de PCR anidada. Se utilizaron dos pares de primers específicos que amplifican un segmento del gene que codifica para la proteína temprana inmediata 1 de CMV.

Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron los siguientes:

Oligonucleótido sentido, par externo: CMV CAA-F 5' GTC AAA CAG ATT AAG GTT CGA GTG G 3'.

Oligonucleótido antisentido, par externo: CMV CAA-R 5' TGT ACT CAT TAC ACA TTG TTT CCA CAC 3'.

Oligonucleótido sentido, par interno: CMV CAB-F 5' ACT GGC GCC TTT AAT ATG ATG GG 3'.

Oligonucleótido antisentido, par interno: CMV CAB-R 5' GAG CAC TGA GGC AAG TTC TGC 3'.

Se llevaron a cabo dos reacciones de PCR, cada una utilizando un volumen total de 12.5 microlitros. La composición de la mezcla de reacción de PCR se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Componentes de mezcla de reacción de PCR		
Reactivos	Volumen	Concentración Final
Agua	6-7	
Buffer 5X	2.5	1X
MgSO ₄ 25mM	1	2.0 mM
dNTP's 10 mM	0.25	0.2 mM
Oligonucleotido sentido	0.5	0.5 μM
Oligonucleótido antisentido	0.5	0.5 μM
Enz.TfDNA polim 5 U/μl	0.0625	0.3 u/reacción
Muestra	1	

Para la primera reacción de PCR se utilizó un microlitro del DNA obtenido de las muestras clínicas. Para la segunda reacción de PCR se utilizó un microlitro del producto de amplificación obtenido durante la primera PCR.

Para ambas reacciones se utilizó el mismo programa de termociclado, el cual consiste en un paso inicial de 5 min de desnaturalización a 94°C, el cual es seguido de 30 ciclos de PCR (desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 60°C durante 1 min, extensión a 72°C durante 1 min), y un paso final a 94°C durante 5 min.

Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, se visualizan bajo luz ultravioleta y se archivan mediante fotografía electrónica.

11) Análisis estadístico

Para los análisis comparativos en la proporción de células mononucleares que expresaron los diversos receptores se utilizó la prueba U de Mann Whitney. El análisis estadístico se efectuó mediante el programa estadístico SPSS para Windows.

RESULTADOS

Se incluyó a cuarenta y dos pacientes en el estudio. En la primer visita se encontró 40 pacientes con serología IgG positiva; dos de estas pacientes tuvieron además serología IgM positiva (Cuadro 3). Por lo tanto únicamente se incluyeron para el análisis a las 38 pacientes con antecedente de infección por CMV, sin evidencia de infección reciente por este virus. De estas 38 pacientes, 27 acudieron a la segunda visita (29% de pérdida) y 24 a la tercer visita (37% de pérdida).

		Frecuencia
IgG positiva	IgM negativa	38
IgG positiva	IgM positiva	2
IgG negativa	IgM negativa	2

Características de las pacientes

Las características demográficas se muestran en el Cuadro 4. En cuanto a los antecedentes gineco-obstétricos se encontró que 11 pacientes (28.9%) cursaban su primer embarazo, 8 (21.1%) su segundo embarazo y 19 (50%) eran multigestas; 13 (34.2%) pacientes ya habían presentado uno o más abortos y 5 (13.1%) tenían antecedente de cesárea previa.

Antecedentes	Media	Mediana	Mínimo	Máximo
Edad	24.8	24.5	18	39
Menarca	13.5	13	10	28
Inicio de vida sexual	18.4	18	14	26
Años desde el inicio de vida sexual	6.4	6	0	20
No. de parejas sexuales	1.5	1	1	5

De las 38 pacientes incluidas en el estudio, a 23 (60.5%) se les atendió su parto o cesárea en el hospital; uno de ellos fue un producto óbito prematuro. 15 (39.5%) pacientes se atendieron en otra unidad. 15 pacientes tuvieron parto vía vaginal y 8 fueron cesáreas (21.1%). Se identificó alguna complicación del embarazo en seis pacientes (Cuadro 5).

Cuadro 5. Complicaciones durante la gestación		
Complicaciones	Frecuencia	Porcentaje
Óbito	1	2.6
Enf. hipertensiva del embarazo	1	2.6
Trombocitopenia gestacional	2	5.3
DM gestacional	2	5.3
Ninguna	18	47.4
Se perdió el seguimiento	15	39.5

Detección de la reactivación de CMV

En total se obtuvieron 84 muestras de orina para cultivo y detección de CMV mediante PCR y 83 muestras de cérvix. Se detectó la reactivación de CMV en algún momento del embarazo en seis pacientes. En el Cuadro 6 se muestran los resultados de detección de CMV de acuerdo al trimestre del embarazo en que fueron tomadas las muestras.

En el Cuadro 7 se muestran los resultados de PCR de las pacientes que mostraron reactivación del virus. De las seis pacientes, en tres se detectó la reactivación tanto por cultivo como por PCR, mientras que en tres, ésta se detectó solamente mediante análisis de PCR.

Cuadro 6. Resultados de detección de CMV por trimestre				
Trimestre	Muestra	No. de muestras	Cultivo positivo	PCR positiva
1er trimestre	Orina	38	0	0
	Cérvix	38	2 (5.3%)	3 (7.9%)
2do trimestre	Orina	23	0	0
	Cérvix	22	0	1 (4.5%)
3er trimestre	Orina	23	0	0
	Cérvix	23	1 (4.3%)	3 (13%)

Cuadro 7. Resultados de reactivación de CMV												
Paciente	1er trimestre				2do trimestre				3er trimestre			
	Cultivo		PCR		Cultivo		PCR		Cultivo		PCR	
	Orina	Cérvix	Orina	Cérvix	Orina	Cérvix	Orina	Cérvix	Orina	Cérvix	Orina	Cérvix
1	-	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

ND, muestra no disponible

En el Cuadro 8 se muestran los distintos porcentajes de los receptores estudiados en células mononucleares, se desglosan por trimestre; no se observó una gran diferencia entre estos durante los diferentes trimestres de embarazo, a excepción del porcentaje de células que expresaban el receptor CD94/NKG2C durante el segundo trimestre del embarazo. Sin embargo, esta diferencia no se observó en las evaluaciones efectuadas durante el 1er o 3er trimestre.

Cuadro 8. Expresión de los diversos receptores en células mononucleares de mujeres embarazadas

Receptor	Trimestre	Pacientes que presentaron reactivación de CMV (n =6)	Pacientes sin reactivación de CMV (n = 32)	P
NKG2C	1er trimestre	6.29*	6.91	0.81
	2do trimestre	8.61	4.86	0.03
	3er trimestre	3.91	8.95	0.21
NKG2A	1er trimestre	2.89	5.13	0.77
	2do trimestre	5.76	2.67	0.42
	3er trimestre	5.79	7.48	0.59
KIR2DL1/2DS1/2DS3	1er trimestre	9.28	6.40	0.19
	2do trimestre	6.86	9.52	0.09
	3er trimestre	4.6	11.57	0.80
KIR2DLS/2DS2	1er trimestre	10.56	9.8	0.66
	2do trimestre	10.91	10.64	0.79
	3er trimestre	14.05	16.89	0.61

*Los datos representan la mediana de la proporción de células mononucleares que expresan cada uno de los receptores estudiados.

DISCUSIÓN

Se incluyeron en el estudio 38 pacientes portadoras de CMV en quienes se demostró la presencia de anticuerpos IgG positivos e IgM negativos contra este virus. Esto indica que en nuestra población al menos 90% de las pacientes tienen evidencia de infección previa por CMV (38 de 42 pacientes que aceptaron participar en el estudio). Además, encontramos que dos pacientes mostraron evidencia de infección reciente por CMV (serología IgM positiva). De interés, una de estas dos pacientes tuvo pérdida gestacional temprana.

Entre las 38 pacientes que se incluyó para análisis, se documentó la reactivación de CMV en seis, lo que equivale al 15.8%. Estos resultados van de acuerdo a lo descrito en la literatura.²³ A pesar de que hubo una gran cantidad de pacientes que abandonaron el estudio, pudimos demostrar la alta frecuencia de reactivación por este virus.

La toma de muestras para detección de reactivación se realizó en orina (84 muestras) y en secreciones cervicales (83 muestras). De las seis pacientes con reactivación, en ninguna de ellas se presentó excreción de CMV en cultivo o PCR de orina; todos los casos positivos fueron detectados a través del análisis de secreciones cervicales. Esto llama la atención, ya que otros autores han detectado la presencia del virus en orina durante el embarazo; sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, se ha visto que la tasa de detección en orina es menor a la de encontrada en secreciones cervicales.²⁰ La diferencia en detección del virus entre el cérvix y la orina puede indicar que los mecanismos de reactivación sistémica y local pueden ser diferentes; por otro lado, se ha sugerido que la mayor frecuencia de detección de CMV a nivel de tracto genital pudiera corresponder a casos de re-infección por transmisión sexual.²³

De las seis pacientes que mostraron reactivación en algún momento del embarazo se observa que, hasta cierto punto, es variable el momento de la reactivación: dos de los casos mostraron reactivación solamente durante el 1er trimestre (en una de ellas no se pudo continuar con las determinaciones de excreción viral debido a que abandono el estudio); una paciente mostró excreción de CMV durante el 1er y 2do trimestres, pero durante el 3er

trimestre no se detectó actividad viral; en los tres casos restantes se observó que en el 1er y 2do trimestre no se detectó el virus, pero durante el tercer trimestre hubo excreción de CMV. En general, de acuerdo a lo descrito en la literatura, encontramos que a mayor edad gestacional, la excreción viral fue mayor. Sería de gran interés efectuar estudios adicionales en los que se pueda contar con un mayor número de pacientes con seguimiento hasta el tercer trimestre.

Se estudió en especial el receptor CD94/NKG2C en pacientes con y sin reactivación de CMV, se ha observado una relación entre el antecedente de infección por este virus y la expresión de dicho receptor en células mononucleares de sangre periférica. Los resultados obtenidos muestran que en aquellas pacientes que presentaron reactivación hubo una tendencia a la disminución en el porcentaje de células que expresan este receptor, mientras que en las que no hubo reactivación hubo una tendencia a la estabilidad. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células que expresan este receptor en la evaluación efectuada durante el 2do trimestre del embarazo. Sin embargo, no hubo significancia estadística cuando se evaluaron los resultados durante el 3er trimestre, posiblemente debido a la pérdida del número de pacientes en el seguimiento.

Respecto a las determinaciones de los otros receptores, no encontramos diferencias significativas entre las pacientes con y sin reactivación por CMV. En el caso del receptor NKG2A no se observó ninguna diferencia en cuanto al porcentaje de células positivas en los diferentes trimestres del embarazo. En relación a la expresión de los receptores KIR2DL1/2DS1/2DS3, llama la atención que, a pesar de no haber diferencias entre ambas poblaciones, en las pacientes con excreción del virus se observó una tendencia a la disminución a lo largo del embarazo, mientras que en aquellas en que el virus no se detectó, hubo una tendencia a incrementarse el porcentaje de células positivas. Por último, en cuanto a la expresión del receptor KIR2DLS/2DS2, no se observó ninguna tendencia que llamara la atención en el número de células positivas durante los diversos trimestres del embarazo.

CONCLUSIÓN

El citomegalovirus es un virus de distribución mundial que causa infecciones muy frecuentemente y que es causa común de afección al recién nacido. Se demostró que en nuestra población de estudio hay una prevalencia alta de mujeres portadoras del virus y que existe una tasa elevada de reactivación durante el embarazo.

El estudio no fue fácil debido a la pérdida de un número importante de pacientes durante el seguimiento. Aunque no se logró comprobar la hipótesis establecida al inicio del estudio, observamos que el comportamiento de la expresión del receptor CD94/NKG2C es variable durante el embarazo. Sería de interés continuar la evaluación de diversos componentes de la respuesta inmunológica que se desarrolla en presencia de CMV durante el embarazo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Demmler G. J. Infectious Diseases Society of America and Centers for Disease Control. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. **Rev Infect Dis** 1991; 13: 315-29.
2. Noyola D.E., Mejía-Elizondo A.R., Canseco-Lima J. M., Allende-Carrera R., Hernández-Salinas A. E., Ramírez-Zacarias J. L. Congenital cytomegalovirus infection in San Luis Potosí, México. **Pediatr Infect Dis J** 2003; 22: 89-90.
3. Jones L., Duke-Ducaan P., Yeager A. Cytomegalovirus Infections in Infant-Toddler center: Centers of developmentally delayed versus regular day care. **J Infect Dis** 1985; 151: 953-5.
4. Suárez M., Briones H., Alarcón G., Aliaga P., Grunberg A., Diego S., Solar E. Virus del herpes simple y citomegalovirus en universitarias chilenas embarazadas. **Bol Oficina Sanit Panam** 1991; 111: 319-23.
5. Pass R. F. Cytomegalovirus Infection in a Day-Care Center. **N Engl J Med** 1982; 307: 477-9.
6. Doyle A. Incidence of illness in early group and family day care. **Pediatrics** 1976; 59: 607-12.
7. Noyola D. E., Valdez-López B. H., Hernández-Salina A. E., Santos-Díaz M. A., Noyola-Frías M. A., Reyes-Macías J. F., Martínez-Martínez L. G. Cytomegalovirus excretion in children attending day-care centres. **Arch Med Res** 2005; 36: 590-593.
8. Stagno S., Reynolds D. W., Tsiantos A., Fuccillo D.A., Long W., Alford C.A. Comparative serial virologic and serologic studies of symptomatic and subclinical congenitally and natally acquired cytomegalovirus infections. **J Infect Dis** 1975; 132: 568-577.
9. Pass R. F., Dworsky M. E., Whitley R. J., August A. M., Stagno S., Alford C. A. Specific-lymphocyte blastogenic responses in children with cytomegalovirus and herpes simplex virus infections acquired early in infancy. **Infect Immun** 1981; 34: 166-170.

10. Zanghellini F., Boppana S. B., Emery V. C., Griffiths P. D., Pass R.F. Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. **J Infect Dis** 1999; 180: 702-707.
11. Gumá M., Angulo A., López-Botet M. NK cell receptors involved in the response to human cytomegalovirus infection. **Curr Top Microbiol Immunol**. 2006; 298: 207-23.
12. López-Botet M., Angulo A., Gumá M. Natural killer cell receptors for major histocompatibility complex class I and related molecules in cytomegalovirus infection. **Tissue Antigens** 2004; 63: 195-203.
13. Brown D., Trowsdale J., Allen R. The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. **Tissue Antigens** 2004; 64: 215-225.
14. Carretero M., Palmieri G., Llano M. Specific engagement of the CD94/NKG2-A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2-A: evidence for receptor function in heterologous transfectants. **Eur J Immunol**. 1998; 28: 1280-1291.
15. Lanier L., Corliss B., Wu J., Phillips J. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. **Immunity** 1998; 8: 693-701.
16. Lee Ni, Llano M., Carretero M., Ishitani A., Navarro F., López-Botet M., Geraghty D. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptors CD94/NKG2A. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 95: 5199-5204.
17. Wang E., McSharry B., Retiere C., Tomasec P., Williams S., Borysiewicz L., Braud V., Wilkinson G. UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99: 7570-7575.
18. Gumá M., Angulo A., Vilches C., Gómez-Lozano N., Malats N., López-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. **Blood** 2004; 104: 3664-3671.
19. Kumar M. L., Gold E., Jacobs I. B., Ernhart C. B., Nankervis G. A. Primary cytomegalovirus infection in adolescent pregnancy. **Pediatrics** 1984; 74: 493-500.

20. Shen C. Y., Chang S. F., Yen M. S., Huang E. S., Wu C. W. Cytomegalovirus excretion in pregnant and nonpregnant women. **J Clin Microbiol** 1993; 31: 1635-1636.
21. Huddleston H., Schust D. J. Immune interactions at the maternal-fetal interface: a focus on antigen presentation. **Am J Reprod Immunol** 2004; 51: 283-289.
22. Hikami K., Tsuchiya N., Yabe T., Tokunga K. Variations of human killer cell lectin-like receptors: common occurrence of NKG2-C deletion in the general population. **Genes Immun** 2003; 4: 160-167.
23. Mandell G. L., Bennet E. J., Dolin R. Principles and practice of infection diseases. Ed. Churchill Livingstone 2000; 2: 1595-1596.

Anexo 1

Hoja de recolección de información

No. De paciente: _____

Nombre: _____

Edad: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Nombre del cónyuge: _____

Edad: _____

Fecha de firma del consentimiento informado: _____

Datos generales:

Menarca		FUM		Gesta	
Ritmo		PIE		Para	
IVSA		USG		Abortos	
No. PS		Tamiz		Cesárea	
MAC		VDRL		Grupo y Rh	
		Peso		Talla	

Muestras	Fecha	Trimestre	SDG	Sangre	Orina	Cérvix
1						
2						
3						

1er consulta:

Fecha: _____

Edad gestacional: _____

Toma de muestra: sangre orina secreciones cervicales

TA		FCF	
Peso		MF	
FU			

Observaciones: _____

Próxima cita: _____

2da consulta:

Fecha: _____.

Edad gestacional: _____.

Toma de muestra: sangre orina secreciones cervicales

TA		FCF	
Peso		MF	
FU			

Observaciones: _____

Próxima cita: _____.

3er consulta:

Fecha: _____.

Edad gestacional: _____.

Toma de muestra: sangre orina secreciones cervicales

TA		FCF	
Peso		MF	
FU			

Observaciones: _____

Próxima cita: _____.

4ta consulta:

Fecha: _____.

Edad gestacional: _____.

Toma de muestra: sangre orina secreciones cervicales

TA		FCF	
Peso		MF	
FU			

Observaciones: _____

Próxima cita: _____.

Resolución del embarazo:

Fecha		Aborto	
Edad gestacional		Peso del producto	
Parto		Sexo	
cesárea		Capurro	

Observaciones: _____

Anexo 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Protocolo de Investigación

“Presencia del receptor CD94/NKG2C en células NK de mujeres embarazadas y su relación con infección y reactivación de citomegalovirus”

Por este acto _____ (nombre de la paciente) otorgo mi consentimiento informado para la participación en el estudio denominado “Presencia del receptor CD94/NKG2C en células NK de mujeres embarazadas y en edad fértil y su relación con infección y reactivación de citomegalovirus” estando a cargo los médicos Dr. Daniel Noyola Cherpitel, Dr. José Manuel Zamarripa Leyva y Dra. Adriana Arias Bautista. Se me ha explicado el objetivo, procedimiento, molestias, beneficios y procedimientos alternativos. Entiendo que se guardará la confidencialidad de los resultados y que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento sin que esto afecte la atención médica que recibiré. He recibido la información adecuada y respuesta a cualquier pregunta.

Nombre _____

Firma _____ Fecha _____

Cónyuge (en el caso de estar embarazada)

Nombre _____

Firma _____ Fecha _____

Testigo 1

Testigo 2

Nombre _____

Nombre _____

Dirección _____

Dirección _____

Firma _____

Firma _____

Médico participante en el estudio

Nombre _____

Dirección _____

Firma _____

HOJA DE INFORMACIÓN PARA PARTICIPANTES

“Expresión del receptor CD94/NKG2C en células NK de mujeres embarazadas y su relación con infección y reactivación de citomegalovirus”.

El citomegalovirus es un virus de distribución mundial y que causa infecciones muy frecuentemente. Las infecciones por citomegalovirus son comunes en la niñez y para la edad adulta la gran mayoría de la población ha sido infectada por este virus. La mayoría de las infecciones causadas por este virus no producen ningún síntoma (pasan desapercibidas) y no causan ningún daño a la persona que las padece. Sin embargo, en ciertas circunstancias este virus puede causar problemas al sujeto que padece de la infección. La transmisión del virus al recién nacido durante el embarazo sucede en aproximadamente una de cada 100 mujeres. Los recién nacidos que padecen de esta infección pueden tener problemas en la audición y en el desarrollo intelectual. Los motivos por los cuales algunas mujeres transmiten la infección a sus bebés mientras que en otras personas esto no ocurre aun no se conocen con claridad.

El propósito de este estudio es identificar la frecuencia de reactivación del citomegalovirus durante el embarazo y su relación con la actividad de algunas células del sistema de defensa del organismo humano. Esta información podría ser de utilidad para comprender mejor el riesgo de desarrollo de dicha infección en el recién nacido.

De aceptar, usted será una de aproximadamente 53 mujeres que participaran en este estudio. El estudio consiste en tomar muestras de secreciones genitales, orina y sangre para estudiar la presencia de este virus y de las células de defensa. La participación en este estudio es voluntaria y no tiene ningún costo. La participación en el estudio puede retirarse en cualquier momento. De no desear participar en el estudio la atención que usted recibirá no se verá afectada.