

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA DE ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGIA

**VIRUS DEL EPSTEIN-BARR Y SU RELACION CON EL DESARROLLO DE
SINDROMES LINFOPROLIFERATIVOS, ESPECIFICAMENTE EL LINFOMA
DE HODGKIN, EL LINFOMA DE BURKITT Y LOS DESORDENES
LINFOPROLIFERATIVOS POSTRASPLANTE**

Trabajo final de investigación sometido a la consideración de la Comisión del Programa de
Estudios de Posgrado en Especialidades en Microbiología para optar al grado y título de
Especialista en Hematología

VANESSA VILLALOBOS ALFARO
A96750

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

Julio, 2021

Dedicatoria

A Dios,

A Papi y a Mami,

A Andre y Nati,

A Julio.

Agradecimientos

A Dios, por todas las bendiciones que me ha dado a través de mi vida.

A mis papás por todo el apoyo y amor incondicional.

A mis hermanas por escucharme y aconsejarme diariamente.

A Julio, por ser mi ejemplo de superación y mi apoyo incondicional.

A todas las personas que de una u otra forma hicieron posible que pudiera asistir a lecciones, que me ayudaron con los cambios de horario y las reposiciones, y a siempre buscar mi superación personal.



**SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA**

ACTA-62-2021

Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el martes 27 de julio de 2021 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante **Vanessa Villalobos Alfaro** carné #A96750, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de **Especialista en Hematología**. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador Melissa Granados Zamora, MSc., tutora, quien preside, lectores Luisa Vindas Angulo, Esp. y Melvin Calvo Solis, Esp.

ARTICULO 1

Quien preside solicita a la postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: **"Virus del Epstein-Barr y su relación con el desarrollo de síndromes linfoproliferativos"**.

ARTICULO 2

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado ☒ Reprobado ☐

ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 19:55 horas.

Nombre	Firma	No. Cédula
Melissa Granados Zamora, MSc. Quien preside		1-1206-0870
Luisa Vindas Angulo, Esp.		2-0621-0942
Melvin Calvo Solis, Esp.		3-0357-0684
Vanessa Villalobos Alfaro Estudiante		1-1462-0506

Observaciones: _____

Nota: Solamente firmarán el acta los responsables de la actividad descrita
Si el trabajo es merecedor de mención de honor anotar en observaciones

Tabla de contenido

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN	VI
RESUMEN EN INGLÉS.....	VII
LISTA DE CUADROS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
OBJETIVO GENERAL:	1
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	1
ANTECEDENTES.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	5
METODOLOGÍA.....	8
CAPÍTULO 1. ASPECTOS BIOLÓGICOS DEL VIRUS DEL EPSTEIN-BARR	9
CAPÍTULO 2. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE TRANSFORMACIÓN ASOCIADOS AL VIRUS DEL EPSTEIN-BARR	21
CAPÍTULO 3. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLOGICAS, MORFOLÓGICAS, INMUNOFENOTÍPICAS Y GENÉTICAS DE LAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS ASOCIADAS AL VIRUS DEL EPSTEIN-BARR, ESPECÍFICAMENTE LINFOMA DE HODGKIN, LINFOMA DE BURKITT Y LOS DESÓRDENES LINFOPROLIFERATIVOS POSTRASPLANTE.....	37
1. LINFOMA DE HODGKIN:.....	41
2. LINFOMA DE BURKITT:	50
3. DESÓRDENES LINFOPROLIFERATIVOS POSTRASPLANTE:	60
CAPÍTULO 4. EFECTO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL EPSTEIN- BARR EN EL PRONÓSTICO DEL LINFOMA DE HODGKIN, LINFOMA DE BURKITT Y DE LOS DESÓRDENES LINFOPROLIFERATIVOS POSTRASPLANTE.....	70
CONCLUSIONES	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

Resumen

El virus del Epstein-Barr (EBV) es un herpes humano 4 extendido por toda la población mundial y se transmite como una infección asintomática latente en la gran mayoría de las personas. Sin embargo, este mismo virus es un agente infeccioso con una capacidad poderosa de transformación y está relacionado etiológicamente con una variedad de lesiones linfoproliferativas y linfomas malignos, y se ha demostrado su contribución en la patogénesis de estos desórdenes. La asociación del EBV con varias neoplasias linfoides es contundente y se ha indicado un rol etiopatogénico en su desarrollo; sin embargo, dado que la infección por el EBV es prácticamente ubicua en adultos sanos, es difícil establecer su rol causal en la génesis de linfomas. En el linfoma de Burkitt, el rol principal del EBV es favorecer las propiedades proliferativas sobre las propiedades pro-apoptóticas del c-myc, promoviendo la expansión clonal no controlada de los linfocitos B. En el linfoma de Hodgkin, las células de Reed-Sternberg probablemente deriven de la célula B pre-apoptótica del centro germinal infectada con el virus. Por último, en los desórdenes linfoproliferativos postrasplante, el desorden se produce como resultado del aumento de la proliferación de células B después del trasplante y es principalmente impulsado por el EBV.

Resumen en inglés

The Epstein-Barr virus (EBV) is a human herpes 4 spread throughout the world population and is transmitted as a latent asymptomatic infection in most people. However, this same virus is an infectious agent with a powerful transformation capacity and is etiologically related to a variety of lymphoproliferative lesions and malignant lymphomas, and its contribution to the pathogenesis of these disorders has been demonstrated. It is related to a very broad spectrum of clinical disorders from acute and chronic infections to lymphoid and epithelial neoplasms, and its contribution to the pathogenesis of these neoplasms has been demonstrated. The association of EBV with various lymphoid neoplasms is strong and an etiopathogenic role in its development has been indicated; however, since EBV infection is practically ubiquitous in healthy adults, it is difficult to establish its causal role in the genesis of lymphomas. In Burkitt's lymphoma, the main role of EBV is to favor the proliferative properties over the pro-apoptotic properties of c-myc, promoting uncontrolled clonal expansion of B lymphocytes. In Hodgkin's lymphoma, the Reed-Sternberg cells probably derive from the pre-apoptotic B cell of the germinal center infected with the virus. Finally, in post-transplant lymphoproliferative disorders, the disorder occurs as a result of increased B cell proliferation after transplantation and is primarily driven by EBV.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Patrones de latencia de EBV..... 16

Cuadro 2. Clasificación de la OMS de los desórdenes linfoproliferativos postrasplante y su porcentaje de asociación con el EBV62

Lista de figuras

Figura 1. Modelo del ciclo de vida del EBV e interacciones con la respuesta inmune del huésped.....	17
Figura 2. Latencia y persistencia del EBV en linfocitos B.....	18
Figura 3. Detección de EBV en células de Hodgkin y Reed-Sternberg en un linfoma de Hodgkin clásico. a) Hibridación in situ, b) Inmunohistoquímica positiva para LMP1.....	20
Figura 4. Características de los antígenos de latencia del EBV en linfomas de células B...	25
Figura 5. Actividades biológicas de los antígenos nucleares del EBV.....	29
Figura 6. Actividades biológicas de LMP-1 en la tumorigénesis.....	31
Figura 7. Persistencia del EBV en células B del huésped y demostración del origen de linfomas de células B asociados al EBV.....	33
Figura 8. Malignidades epiteliales y hematológicas asociadas al EBV.....	38
Figura 9. Proceso de linfomagénesis asociado al EBV.....	41
Figura 10. Rol del EBV en la generación del fenotipo anómalo de las células de Reed-Sternberg en el linfoma de Hodgkin.....	50
Figura 11. Patogénesis del linfoma de Burkitt.....	55
Figura 12. Modelo del origen del linfoma de Burkitt.....	60

Lista de abreviaturas

EBV: virus del Epstein-Barr

OMS: Organización Mundial de la Salud

CAEBV: infección crónica activa por EBV

HTLV-1/HTLV-2: virus linfotrópicos de células T humanas tipo I y tipo II

HHV-4: virus del herpes humano 4

ADN: ácido desoxirribonucleico

ORF: marcos abierto de lectura

ARN: ácido ribonucleico

HIV: virus de la inmunodeficiencia humana

EBER (1 y 2): ARN no traducidos codificado por el virus del Epstein-Barr

EBNA (1,2,3A, 3B, 3C): antígenos nucleares codificados por el virus del Epstein-Barr

LMP (1, 2A, 2B): proteínas de latencia de membrana del virus del Epstein-Barr

OriP: origen de replicación episomal viral

HAUSP: enzima desubiquitinante del huésped

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

BCR: receptor de células B

ncARN: ARN no codificante

miARN: ARN pequeño que se une al ARN mensajero para evitar la transcripción de proteínas.

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa donde las transcripciones de ARN se cuantifican mediante transcripción inversa en ADN copia y luego se lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativo.

ddPCR: reacción en cadena de la polimerasa digital (digital droplet).

HLA: sistema del antígeno leucocitario humano

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida

AID: enzima citidina desaminasa inducida por activación

IGH: cadena pesada de inmunoglobulina

IGK: cadena ligera kappa

IGL: cadena ligera lambda

MICA: moléculas de HLA clase I denominadas no clásicas

pRb: proteína del retinoblastoma

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Vanessa Villalobos Alfaro, con cédula de identidad 114620506, en mi condición de autor del TFG titulado Virus del Epstein-Barr y su relación con el desarrollo de síndromes linfoproliferativos, específicamente el linfoma de Hodgkin, el linfoma de Burkitt y los desórdenes linfoproliferativos postrasplante

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI ☒ NO * ☐

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

Objetivo general:

Determinar la asociación existente entre el virus del Epstein-Barr con el desarrollo de neoplasias hematológicas, específicamente el linfoma de Hodgkin, el linfoma de Burkitt y los desórdenes linfoproliferativos postrasplante.

Objetivos específicos:

1. Describir los principales aspectos biológicos de la infección por el virus del Epstein-Barr.
2. Describir los mecanismos fisiopatológicos de transformación maligna asociado al virus del Epstein-Barr.
3. Detallar las características morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas de las neoplasias hematológicas asociadas al virus del Epstein-Barr, específicamente del linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt y de los desórdenes linfoproliferativos postrasplante.
4. Explicar el efecto de la infección por el virus del Epstein-Barr en el pronóstico del linfoma de Hodgkin, el linfoma de Burkitt y de los desórdenes linfoproliferativos postrasplante.

Antecedentes

La linfomagénesis es considerado un proceso complejo con múltiples pasos. Se reconocen cuatro mecanismos fundamentales necesarios para que se dé el proceso: 1) acumulación de alteraciones genéticas en la célula tumoral, 2) inmunodeficiencia del huésped, 3) una infección por un virus oncogénico y 4) estimulación y selección de las células tumorales por un antígeno (Beltramino, 2005).

El virus del Epstein-Barr (EBV) está muy extendido en todas las poblaciones mundiales y se transmite como una infección asintomática latente en la gran mayoría de las personas. Sin embargo, este mismo agente tiene una poderosa capacidad de transformación y está relacionado etiológicamente con una variedad de lesiones linfoproliferativas y linfomas malignos (Lowe, 2017). Se ha asociado con un espectro muy variado de desórdenes clínicos desde infecciones agudas y crónicas hasta neoplasias linfoides y epiteliales, y se cree que contribuye en la patogénesis de estas neoplasias (Beltramino, 2005). De hecho, la asociación del EBV con varias neoplasias linfoides es contundente, indicando un rol etiopatogénico en su desarrollo; sin embargo, dado que la infección por el EBV es prácticamente ubicua en adultos sanos, es difícil establecer su rol causal en la génesis de linfomas (Beltramino, 2005).

Al EBV infectar preferentemente las células B a través del receptor CD21, tiene una fuerte asociación con las enfermedades linfoproliferativas o linfomas de linaje B, como por ejemplo el linfoma de Burkitt, el linfoma de Hodgkin y los trastornos linfoproliferativos postrasplante. No obstante, el espectro de los desórdenes linfoproliferativos de células B asociados al EBV es amplio, desde linfadenitis linfoproliferativa reactiva hasta linfomas (Kim, 2017). En la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 2016 de los desórdenes linfoproliferativos asociados al EBV, además se incluyen en la lista la mononucleosis infecciosa, el linfoma difuso de células B grandes EBV positivo, infección crónica activa por EBV en células B, úlcera mucocutánea por EBV, linfoma difuso de células B grandes asociado a inflamación crónica y granulomatosis linfomatoide (Kim, 2017).

No obstante, el EBV también es capaz de infectar a las células de linaje T o NK con menor frecuencia y se asocia con neoplasias malignas en estas líneas celulares (Okuno, 2019). Los

desórdenes linfoproliferativos de línea T y NK asociados al EBV abarcan entidades patológicas con un amplio espectro clínico-patológico (Kim, 2017).

En la clasificación de la OMS del 2016 también se incluyen los desórdenes linfoproliferativos T asociados al EBV, y son un subconjunto de linfomas periféricos de células T, linfomas angioinmunoblásticos de células T, linfomas extraganglionares nasales de linfocitos T asesinos naturales/linfocitos T, linfocitosis hemafagocítica asociada al EBV, infección crónica activa por EBV de células T o NK, alergia severa a la picadura de mosquito, desórdenes linfoproliferativos tipo hidra vacciniiforme y linfoma de células T EBV positivas sistémico. Por último, también se incluyeron dos entidades de células NK asociadas al EBV, la leucemia agresiva de células NK y el linfoma de células T/NK nodal EBV positivo (Kim, 2017).

La infección crónica activa por EBV (CAEBV) de tipo T y/o NK muestra una amplia gama de manifestaciones clínicas, desde formas indolentes y localizadas como desórdenes linfoproliferativos tipo hidra vacciniiforme y alergia grave a picadura de mosquito, hasta una forma más sistémica caracterizada por fiebre, hepatoesplenomegalia y linfadenopatía con o sin manifestaciones cutáneas (Swerdlow, 2016). Los pacientes con CAEBV muestran una predisposición a la leucemia manifiesta y el linfoma de linajes de células T/NK (Okuno, 2019).

El concepto de que el EBV es un virus oncogénico está avalado por su capacidad para infectar y transformar células B normales in vivo e in vitro determinando su inmortalización y permitiendo el continuo crecimiento de las células B. Si se compara la alta frecuencia de linfomas positivos por EBV, por medio de la presencia viral en todas las células tumorales derivadas de una célula madre linfomatosa también positiva por EBV, en comparación con la baja frecuencia de células B positivas en portadores sanos, sirve como evidencia de apoyo a la relación entre el EBV y la transformación de células B. En algunas ocasiones, se encuentra al EBV integrado al genoma celular, lo cual indica que el virus podría haber estado presente en más casos de linfomas al inicio y luego haber desaparecido (Beltramino, 2005).

Los tres tipos principales de linfomas asociados a EBV difieren marcadamente en su patogénesis y en el probable rol del virus en el proceso. Además, para una comprensión completa del papel del EBV en la patogenia de los linfomas, es importante saber en qué etapa del desarrollo de las células B se infectan con el virus y si la infección por EBV ocurre antes o después de la adquisición de otros eventos transformadores (Kuppers, 2003). Primero, en el caso del linfoma de Burkitt endémico, el rol principal del EBV es favorecer las propiedades proliferativas sobre las propiedades pro-apoptóticas del c-myc, promoviendo la expansión clonal no controlada de los linfocitos B (Beltramino, 2005). En el linfoma de Hodgkin, las células de Reed-Sternberg probablemente deriven de la célula B pre-apoptótica del centro germinal infectada con el virus. En ambos tipos de linfoma, el evento crítico podría ser una mutación durante las alteraciones inmunológicas asociadas con la infección aguda por el EBV (Thorley, 2004). Por último, en los desórdenes linfoproliferativos postrasplante, la mayoría de los casos podrían derivar de las células B del centro germinal, de precursores seleccionados por la expansión del receptor de células B o provenir de células B de centro germinal alteradas. En estas patologías es necesaria la expresión del programa de crecimiento o latencia III para la expansión de los clones tumorales, aunque en ocasiones la adquisición de eventos transformantes evita la necesidad de expresar el programa completo de latencia (Beltramino, 2005; Kuppers, 2003).

Justificación

El aumento en el número de casos de cáncer a nivel mundial es una grave amenaza para la salud pública debido al rápido crecimiento de la incidencia y la mortalidad por cáncer. Aproximadamente 2,2 millones de nuevos casos de cáncer se asociaron con agentes infecciosos en el 2018. Para ese mismo año, se estimó que el número de casos nuevos de linfoma de Hodgkin y linfoma de Burkitt llegó a 92 000 casos, de los cuales el 51% de los casos fueron atribuidos a la infección por EBV (Pei, 2020).

El EBV fue el primer virus humano directamente implicado en la carcinogénesis. Se descubrió en 1964 por Anthony Epstein, Yvonne Barr y Bert Achong, durante una investigación que realizaban sobre el linfoma de Burkitt. Desde entonces, se ha encontrado el EBV en una gran variedad de tipos de tumores, siendo esta asociación más fuerte con el linfoma de Burkitt, el linfoma de células T y NK, el carcinoma nasofaríngeo, el linfoma de Hodgkin y con linfomas malignos en pacientes inmunosupresos; no obstante, también se ha encontrado el EBV en ciertos tumores malignos de células epiteliales, como el carcinoma gástrico y el carcinoma de mama y en otros tipos de neoplasias malignas (Grywalska, 2013).

Se describe que el EBV infecta a más del 90% de la población mundial adulta, generalmente durante la infancia. Estas infecciones son más frecuentes en países en vías de desarrollo en poblaciones de bajo nivel socioeconómico. En países con estrictas prácticas de higiene, la seroprevalencia del EBV tiende a aumentar gradualmente con la edad y muestra dos picos de seroconversión: el primero entre los 2 y 4 años y el segundo entre los 14 y 18 años (Grywalska, 2013; Hislop, 2007). La seroprevalencia media en niños es aproximadamente del 50% y aumenta de manera constante hasta un valor del 90% al 99% en adultos (Grywalska, 2013, Tinoco, 2014).

Normalmente, la mayoría de las infecciones primarias por EBV en individuos sanos no son evidentes y cursan asintomáticas, pero ocasionalmente el virus puede causar un cuadro llamado mononucleosis infecciosa en adolescentes y adultos jóvenes, que es una enfermedad autolimitada. Después de la infección primaria por EBV, el individuo sigue siendo portador del virus de por vida, donde el virus persiste de forma latente en el huésped dentro de las

células B de memoria de larga duración. El crecimiento de las células B infectadas de forma latente con el virus normalmente está controlado por la respuesta inmune del huésped, en particular por las células T específicas (Hislop, 2007); además el EBV ha desarrollado estrategias que le permiten minimizar o eliminar su potencial patogénico para mantener la infección y la supervivencia del huésped en el cual persiste (Beltramino, 2005). No obstante, en algunos individuos el virus está implicado en el desarrollo de malignidad. En los huéspedes inmunosupresos, la interacción entre la replicación, la latencia y el control inmunológico del EBV puede alterarse y provocar una proliferación prolongada de linfocitos infectados por EBV y su transformación maligna (Grywalska, 2013). Al desregularse el crecimiento celular, se favorece la aparición de alteraciones genéticas, con la consiguiente transformación celular y desarrollo de linfomas (Beltramino, 2005).

Los virus y las enfermedades hematológicas están relacionados de forma importante. Dentro de los principales agentes virales que se han asociado con alteraciones hematológicas se pueden mencionar al parvovirus B19, agente viral implicado en la inhibición de la eritropoyesis; el virus herpes tipo 8, principalmente asociado al desarrollo de Enfermedad de Castleman multicéntrica y síndromes hemofagocíticos y los virus linfotrópicos de células T humanas tipo I y tipo II (HTLV-1 y HTLV-II respectivamente), estando el HTLV-1 asociado a la leucemia/linfoma de células T (Góngora, 2003). Dentro de los efectos de los agentes virales en la hematopoyesis, se puede citar la anemia, linfopenia, linfocitosis o plaquetopenia. Las enfermedades virales también pueden asociarse con inhibición de la hematopoyesis, a citopenias autoinmunes, a fiebres hemorrágicas, síndromes hemofagocíticos y a síndromes linfoproliferativos (Góngora, 2003). Como el EBV infecta preferentemente células B, para el desarrollo de este trabajo se abarcarán los tres desórdenes hematooncológicos más frecuentemente asociados al EBV, los cuales son el linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt y los desórdenes linfoproliferativos postrasplante.

Al conocer la importancia que tiene el EBV en la población con enfermedades hematológicas, esta revisión puede conectar la literatura con la práctica clínica e incluso servir como justificación para que a todo paciente que se atienda en la consulta de Hematología, se le cuantifique la carga viral de forma periódica, para lograr un control

estricto del paciente y abordar de forma temprana una reactivación o persistencia de altas cargas de ácido nucleico del virus en el plasma.

Metodología

Para poder abarcar los puntos de interés de esta revisión bibliográfica y poder cumplir con los objetivos propuestos, se analizó de forma exhaustiva la literatura disponible sobre el tema. Para esto, se buscaron artículos científicos referentes a Epstein-Barr en bases de datos como Science Direct, Access Journals, Access Medicine, PubMed, SIBDI, EBSCOhost, Journal of Clinical Microbiology, Journal of General Virology, JAMA Oncology, Microbiology and Molecular Biology Reviews, Nature Reviews Clinical Oncology, entre otras. Aunado a eso, se buscó información en revistas científicas como Hematology/Oncology Clinics of North America, Advances in Hematology, British Journal of Haematology, Clinical Advances in Hematology and Oncology, entre otras.

Para obtener los artículos científicos, libros y revistas de interés, se utilizaron las siguientes frases o palabras clave: “Epstein-Barr”, “virus Epstein-Barr”, “transformación oncológica”, “desórdenes linfoproliferativos”, “infección viral por Epstein-Barr”, “linfomas asociados a virus”, “patogénesis de linfomas”, “asociación hematológica con Epstein-Barr”, “malignidad hematológica asociada a infección crónica activa”, “oncogénesis”, “linfomagénesis”, “CAEBV”, “B-Lymphocytes”, “cell transformation”, “Epstein-Barr virus infections”, “virus latency”, “lymphoma”; dicha búsqueda se realizó tanto en idioma español como en inglés.

Capítulo 1. Aspectos biológicos del virus del Epstein-Barr

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer estima que aproximadamente uno de cada cinco casos de cáncer en todo el mundo es causado por una infección viral, siendo un problema de salud pública tanto para países subdesarrollados como desarrollados (Moore, 2010). Aproximadamente, el 10-20% de los cánceres son causados por agentes infecciosos, que oscilan entre el 10% del número total de casos de cáncer en países desarrollados y hasta el 20% en los países en vías de desarrollo (Mundo, 2020). El EBV es el primer virus al cual se le ha identificado una asociación con la patogenia del cáncer (Grywalska, 2015), llamada carcinogénesis o tumorogénesis (Grywalska, 2013). De hecho, en 1997 la OMS clasificó el EBV como un agente carcinogénico (Saha, 2011).

El EBV es también llamado virus del herpes humano 4 (HHV-4), y pertenece a la familia Herpesviridae, subfamilia Gammaherpesvirinae y género Linfocriptovirus (Grywalska, 2015). Este virus fue descubierto en 1964 por Anthony Epstein, Yvonne Barr y Bert Achong, mientras realizaban investigaciones de microscopía electrónica con células de linfoma de Burkitt de pacientes africanos; desde entonces el EBV ha sido implicado en una gran variedad de tipos de tumores (Grywalska, 2013).

Una vez que se logró aislar el EBV de células de linfoma de Burkitt, se confirmó que el EBV era un potente virus transformador a nivel de cultivo celular. Melnick et al (1971) describen que los cambios observados en las propiedades de las células después de la transformación por virus oncogénicos incluyen un patrón de crecimiento alterado con una mayor tasa de crecimiento y una mayor vida útil in vitro, anomalías cromosómicas, síntesis de nuevos antígenos y el potencial de formar tumores. Actualmente, el EBV sigue siendo el agente transformador más eficaz, convirtiendo aproximadamente del 3 al 10% de todas las células B diana en líneas de células linfoblastoides de crecimiento permanente, evidenciando con esto su naturaleza linfotrópica y su habilidad de immortalizar linfocitos B normales (Grywalska, 2013; Sixbey, 1984). Se estima que el EBV está asociado a más de 200,000 casos de cáncer al año (Buschle, 2020) y que el 1.8% de todas las muertes por cáncer son atribuibles al EBV (Young, 2016).

Los viriones del EBV poseen un genoma de ADN lineal bicatenario, de aproximadamente 172 Kbp con más de 85 genes codificadores de proteínas (en marcos de lectura abiertos (ORF)). Los ORF codifican por proteínas implicadas en la regulación del ADN, en la expresión génica y el mantenimiento de la integridad del genoma en las células hijas. Los genes que codifican proteínas se dividen en genes líticos y genes latentes que desempeñan funciones estructurales y no estructurales. El genoma viral se divide además en dominios de secuencia única largos y cortos que están separados por una serie de repeticiones directas terminales de 0,5 Kbp que se encuentran al final de cada dominio de secuencia. Las repeticiones directas terminales aumentan la capacidad de codificación del genoma y sirven como biomarcador para determinar el origen del progenitor del EBV en las células infectadas (Ayee, 2020).

Además, los viriones poseen una cápside icosaédrica y una envoltura proteolipídica compleja (Tinoco, 2014). Entre la cápside y la envoltura viral, se encuentra el tegumento. Cuando el virion es maduro, tiene un diámetro de entre 120 y 180 nm (Grywalska, 2013). En las partículas virales, el genoma tiene forma lineal, pero después de la infección, el ADN viral toma forma circular y persiste como un episoma en el núcleo de la célula infectada, estableciendo de esta forma una infección latente; no obstante, el virus también puede entrar a un ciclo lítico, en el cual se producen nuevos virus que finalmente ocasionan la muerte de la célula infectada y la liberación de las partículas virales (Kuppers, 2003). Es decir, el virus puede causar infecciones latentes y/o infecciones líticas (Okano, 2000).

El EBV es un patógeno humano ubicuo que infecta a más del 90% de la población mundial (Montes, 2020); por lo tanto, se considera que es un virus de gran éxito (Kuppers, 2003). Juega un papel importante en la oncogénesis de un amplio espectro de neoplasias que incluyen tumores sólidos y linfomas de células B y T (Montes, 2020). La habilidad del EBV de immortalizar y transformar células en cultivo acentúa la formación de cáncer y demuestra su participación en la tumorigénesis; sin embargo, por sí solo no es un factor suficiente, pues se requieren otros factores como falla inmune, estimulación de linfocitos B dada por otras infecciones y la aparición de aberraciones o mutaciones genéticas (Grywalska, 2013, Raab-Traub, 2007).

El EBV se puede clasificar en dos genotipos principales, A y B, o tipos 1 y 2, según la divergencia de secuencia en las proteínas nucleares EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B y EBNA3C. Los dos genotipos de EBV se encuentran en todo el mundo, pero varían en distribución geográfica, el EBV tipo 1 se encuentra en todo el mundo pero predomina en las poblaciones estadounidenses, chinas, europeas y del sudeste asiático; mientras que el EBV tipo 2 se encuentra predominantemente en África. Otra diferencia entre ambos genotipos son las propiedades biológicas, ya que el EBV tipo 1 es más eficaz para immortalizar las células B y el EBV tipo 2 tiene mayor capacidad lítica (Ayee, 2020).

La mayor parte de las infecciones por EBV ocurren de forma asintomática durante la infancia o durante la primera década de vida, lo que resulta en una infección crónica latente en las células B (Kuppers, 2003; Montes, 2020). Las infecciones con EBV son más prevalentes en países en vías de desarrollo, especialmente en poblaciones de bajo nivel socioeconómico. Se ha visto que la prevalencia de infecciones por EBV tiende a aumentar con la edad, mostrando dos picos de seroconversión: un primer pico entre los 2 y los 4 años y el segundo pico entre los 14 y 18 años. La seroprevalencia en niños ronda el 50% mientras que en adultos es del 90-99% (Grywalska, 2013; Hislop, 2007).

Después de la infección primaria, el virus persiste durante toda la vida en el huésped, generalmente como un pasajero inofensivo que reside en células B. La principal célula diana del EBV es la célula B, pero en algunas circunstancias, también puede infectar células T, NK y células epiteliales (Kuppers, 2003). El EBV exhibe un tropismo dual al infectar dos objetivos fisiológicos principales: las células epiteliales y los linfocitos B (Ayee, 2020). Los portadores de EBV secretan el virus en la saliva, lo que permite la transmisión viral de un ser humano a otro a través de la vía oral (Kuppers, 2003). Sólo una pequeña porción de pacientes desarrolla un cuadro conocido como mononucleosis infecciosa, el cual es una enfermedad autolimitada linfoproliferativa que suele aparecer en la segunda década de vida (Montes, 2020). En pacientes inmunosupresos, el EBV puede transformar las células B y desarrollar linfomas malignos (Kuppers, 2003), ya que se ha evidenciado que la relación entre la replicación del EBV, la latencia y el control inmune puede fallar y provocar proliferación

viral prolongada de linfocitos infectados con EBV y favorecer la transformación maligna (Capello, 2009).

Una vez que el individuo se infecta con el EBV por vía oral, la infección primaria ocurre en el epitelio de la orofaringe, donde el virus primero amplifica la carga viral por medio de un ciclo lítico de la infección (Hislop, 2007), en células permisivas de la orofaringe como células epiteliales escamosas y posiblemente también linfocitos infiltrantes localmente. Este comportamiento conduce a un alto nivel de diseminación viral en la garganta (Rickinson, 2014). El EBV puede infectar células epiteliales a través de distintos procesos, incluida la transferencia desde células B infectadas. Las células epiteliales son sitios importantes de infección lítica, que producen una progenie viral que amplifica la propagación de célula a célula y permite la transmisión a nuevos huéspedes (Hatton, 2014). Después de la replicación lítica, el virus se propaga por los tejidos linfoides e infecta las células B vírgenes circulantes mediante la unión de la principal glicoproteína gp350 de la envoltura viral al receptor CD21 en la superficie de la célula B (Grove, 2011; Linke-Serinsoz, 2017), para posteriormente entrar por endocitosis (Tinoco, 2014). Una vez dentro del citoplasma, ocurre la decapsidación y luego el ADN se transporta al núcleo (Tinoco, 2014). Al entrar en las células B, el genoma viral se integra en el genoma del huésped y persiste como un provirus o permanece en el núcleo como un episoma circular no integrado y expresa un conjunto restringido de genes que impulsan la latencia y la supervivencia de la célula huésped (Ayee, 2020). A partir de este momento, se inicia la colonización del huésped a través de una infección latente transformadora con crecimiento de células B en tejidos linfoides (Rickinson, 2014). (Figura 1).

Posterior a la colonización del huésped, las células B infectadas desencadenan una fuerte respuesta de células T citotóxicas primarias específicas que finalmente controlan la infección por el EBV (Grove, 2011; Linke-Serinsoz, 2017). Para poder evadir la inmunovigilancia de las células T, el EBV regula de forma negativa la expresión de antígenos en las células y se establece de forma estable en células B de memoria en reposo, donde las proteínas virales latentes ya no se expresan y el genoma del EBV permanece de forma episomal (Linke-Serinsoz, 2017). De esta forma, persiste por el resto de la vida en el hospedero como una

infección latente asintomática (Hislop, 2007), dentro de las agrupaciones de células B de memoria en recirculación (Rickinson, 2014), en subconjuntos de células B de memoria, tanto IgD⁺ CD27⁺ sin cambio de clase, como IgD⁻ CD27⁺ con cambio de clase, pero nunca en células B vírgenes (Hatton, 2014).

Después de la infección, los linfocitos B comienzan el ciclo celular y proliferan continuamente en un proceso conocido como transformación o inmortalización, generando líneas celulares linfoblastoides inmortalizadas, pudiéndose propagar in vitro de forma indefinida (Tinoco, 2014). In vivo, estas células de memoria inactivas pero infectadas por el EBV, están sujetas a las reglas que normalmente influyen en el comportamiento de las células de memoria, incluyendo la posibilidad de que un encuentro fortuito con un antígeno afín impulse a una célula de memoria hacia la diferenciación de las células plasmáticas. Esta diferenciación puede ser una de las claves que desencadenan el ciclo lítico de las células B infectadas, ocasionando nuevos focos de replicación viral en células B transformadoras del crecimiento (Rickinson 2014). La forma en que el EBV persiste selectivamente en las células de memoria ha sido un área de gran interés, y se han propuesto varios modelos que incluyen la infección directa de las células de memoria o procesos dependientes del centro germinal en los que las células B vírgenes infectadas con el EBV dependen de varias proteínas del ciclo latente para atravesar reacciones de centro germinal y emerger como células de memoria que albergan el virus (Hatton, 2014). (Figura 7).

Bajo ciertas circunstancias y estímulos, la infección por EBV se puede reactivar, iniciar la expresión de genes virales y producir proteínas antiapoptóticas, citoquinas y distintos transductores de señales, que alteran la homeostasis celular y conducen a transformación neoplásica (Grywalska, 2013); o también podría reactivarse para entrar en ciclo lítico y producir viriones infecciosos capaces de transmitir el virus a otro hospedero (Hislop, 2007). Al igual a como ocurre con otros herpesvirus, el EBV tiene la característica de persistencia en el huésped para ocasionar una infección latente, pero presenta características adicionales que lo distinguen de otros géneros de herpesvirus, como por ejemplo: a) tiene restricción para hospederos primates, b) tiene tropismo para infectar linfocitos B, c) posee capacidad

(aparente tanto *in vivo* como *in vitro*) para ocasionar transformación del crecimiento de las células B a través de la expresión coordinada de genes latentes del virus (Rickinson, 2014).

El modelo más aceptado de cómo el EBV permanece de forma latente en células de memoria es la expresión coordinada de genes de latencia viral específicos que se expresan secuencialmente dependiendo del tipo de célula, la ubicación y el estado de diferenciación de la célula B infectada (Thorley, 2001); este modelo es conocido como tipos o patrones de latencia (Hatton, 2014; Lu, 2016). (Cuadro 1 y Figura 2).

La latencia III o programa de crecimiento implica la expresión irrestricta de los nueve genes latentes, incluidos seis antígenos nucleares codificados por EBV (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C y LP), tres proteínas latentes de membrana (LMP1, LMP2A y LMP2B), varios ARN no traducidos (EBERs), específicamente EBER1 y EBER2, y los ARN de BART (Saha, 2019), en linfoblastos. Este programa de latencia ocurre sólo durante una infección aguda por EBV, pero también se puede ver en individuos severamente inmunosupresos con desórdenes linfoproliferativos postrasplante y en líneas celulares linfoblastoides (Grywalska, 2015). Este programa activa una célula B en reposo para que se convierta en un linfoblasto en proliferación (Thorley, 2001). El promotor de la latencia III es dependiente del PAX5, específico de célula B, por lo que garantiza la especificidad viral hacia esta línea celular (Massini, 2009). Estas proteínas virales son altamente inmunogénicas y pueden desencadenar una fuerte reacción citotóxica de células T (Linke-Serinsoz, 2017; Montes, 2020). (Cuadro 1 y Figura 1).

Bajo la presión selectiva de una eficaz respuesta inmunitaria mediada por células, el EBV regula a la baja la expresión de varias proteínas virales (principalmente EBNA2) que entran en una etapa de latencia II o programa predeterminado (Montes, 2020), donde se expresan EBNA1, LMP1, LMP2A, LMP2B, EBER y los transcritos de BART en centroblastos del centro germinal infectados (Hatton, 2014). EBNA2 y LMP1 se caracterizan por ser las principales proteínas transformadoras del EBV. La presencia de EBNA2 demuestra latencia III, mientras que la expresión de LMP1 en ausencia de EBNA2 demuestra latencia II. Se ha demostrado *in vitro* que la proteína LMP1 funciona como un oncogén clásico y esencial para

la transformación de células B inducida por EBV, ya que proporciona señales de crecimiento y diferenciación a las células B (Dolcetti, 2003; Linke-Serinsoz, 2017). Las principales funciones que se le han atribuido a este programa son proporcionar las señales de supervivencia necesarias para que los linfoblastos infectados se diferencien en células de memoria y el mantenimiento de dichas células infectadas (Thorley, 2001) (Cuadro 1 y Figura 2).

Por último, la latencia I está restringida a la expresión de EBNA1, EBER y el ARN de BART. El EBNA1 se expresa en todas las células infectadas y es responsable del mantenimiento y replicación del genoma episomal de EBV (Montes, 2020). Existe una latencia 0, que es cuando el EBV está presente en células B de memoria en reposo pero la expresión del antígeno viral se suprime al máximo, con expresión únicamente de EBER y ARN de BART (Linke-Serinsoz, 2017). Las latencias 0 y I se restringen a células B de memoria y se caracterizan por la falta de expresión de cualquier gen viral, excepto de EBNA1 (Hatton, 2014), buscando exclusivamente la persistencia viral de manera no patógena y no detectable por el sistema inmunológico (Thorley, 2001). Adicionalmente, el virus es monitoreado continuamente por el sistema inmunológico, ya que los niveles estables de linfocitos T citotóxicos y anticuerpos séricos contra las proteínas líticas y en etapa latente acompañan a la infección persistente (Thorley, 2001). Estos distintos programas de latencia muestran una adaptación muy alta a la fisiología de las células B (Massini, 2009) (Cuadro 1 y Figura 1).

Cuadro 1. Patrones de latencia de EBV. Elaboración propia. (Tomado de: Dolcetti, 2003; Linke-Serinsoz, 2017; Saha, 2019, Thorley, 2001).

Programa	Genes expresados	Función
Latencia III	EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, LP, LMP1, LMP2A y LMP2B y varios ARN no traducidos	Activar una célula B en reposo para que se convierta en un linfoblasto en proliferación
Latencia II	LMP1, EBNA1, LMP2A	Proporcionar las señales de supervivencia necesarias para que los linfoblastos infectados se diferencien en células de memoria y el mantenimiento de dichas células infectadas
Latencia I	EBNA1	Es responsable del mantenimiento y replicación del genoma episomal de EBV
Latencia 0	Ninguno	Persistencia viral de manera no patógena y no detectable por el sistema inmunológico

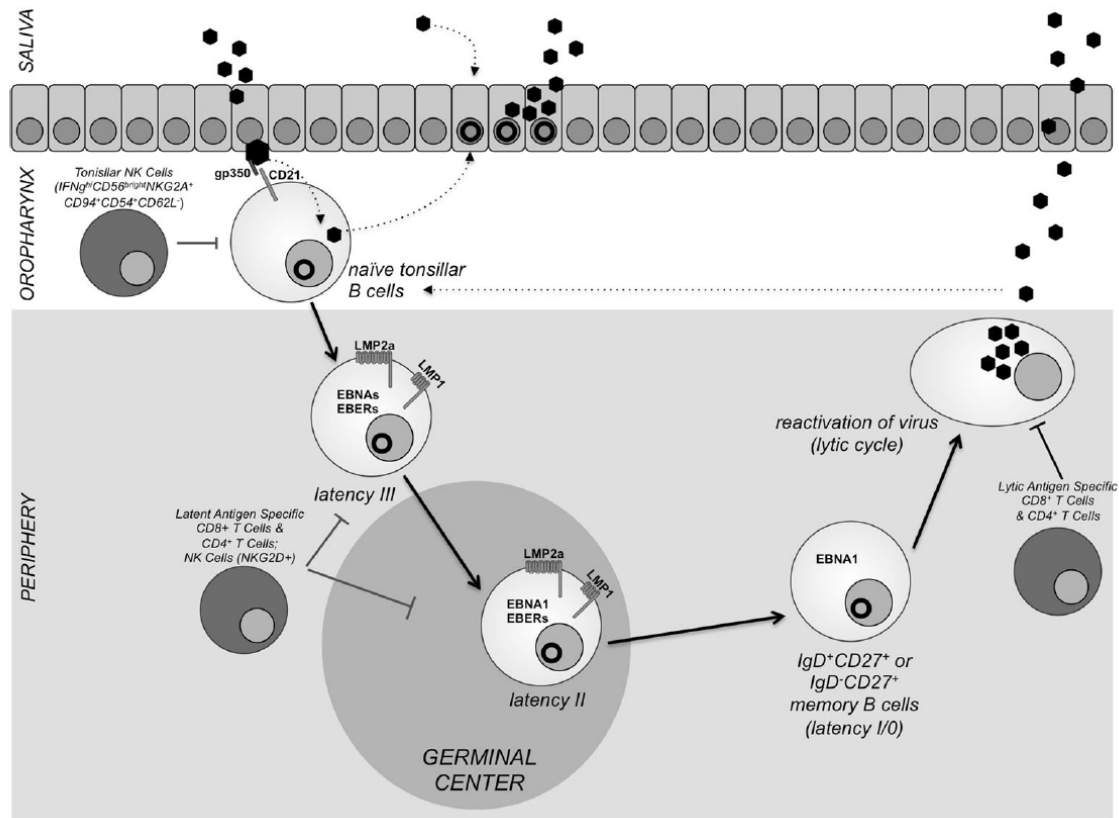


Figura 1. Modelo del ciclo de vida del EBV e interacciones con la respuesta inmune del huésped (Tomado de Hatton, 2014).

Se especula que el EBV infecta preferentemente a las células B vírgenes que se activan y pasan a través de una reacción normal del centro germinal. Durante este proceso de diferenciación, los programas de latencia cambian de la latencia III a la latencia 0 en la población de células B de memoria de larga duración. Por lo tanto, el EBV puede persistir en las células B de memoria de forma irreconocible por las células T citotóxicas (Massini, 2009).

Curiosamente, estos mismos programas de ciclo latente viral también se expresan en varias neoplasias malignas de EBV (Hatton, 2014). Por ejemplo, la expresión de genes de latencia III se asocia con los desórdenes linfoproliferativos postrasplante asociados al EBV, al linfoma primario de Sistema Nervioso Central y una fracción de los linfomas difusos de células B grandes (Saha, 2019). Por su parte, la expresión de genes de latencia II se asocia con el linfoma de Hodgkin clásico, el carcinoma nasofaríngeo, la linfocitosis hemofagocítica y el linfoma de células T/NK (Dolcetti, 2003). Por último, el linfoma de

Burkitt se asocia predominantemente a la expresión de genes de latencia I (Grywalska, 2013; Saha, 2019).

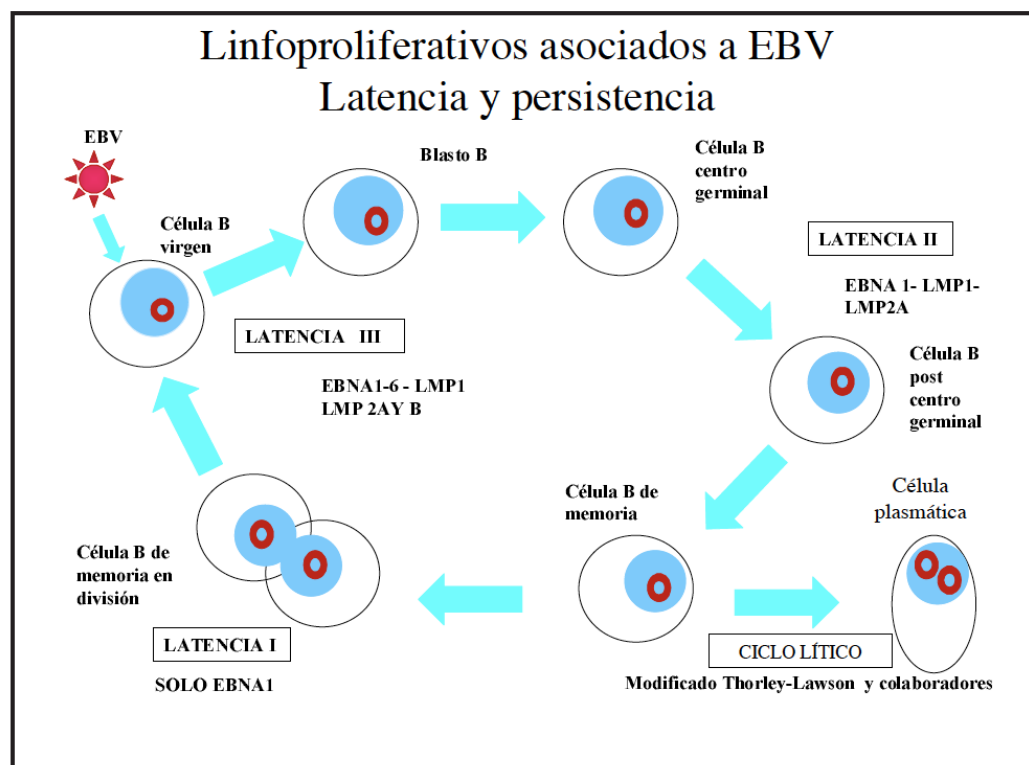


Figura 2. Latencia y persistencia del EBV en linfocitos B. (Tomado de Beltramino, 2005).

El EBV fue el primer virus relacionado con el desarrollo de enfermedades malignas tipo linfomas; de hecho, se ha informado que especialmente juega un papel en el desarrollo de una variedad de linfomas relacionados con HIV. Según la literatura, el EBV se ha identificado en el 30-90% de los casos de pacientes HIV con linfoma difuso de células B grandes, entre el 30-40% de linfoma de Burkitt HIV+, con el 70-80% de los casos de linfoma plasmablastico HIV+, con el 90% de los casos de linfoma de derrame primario y con casi el 100% de los casos de linfoma de Hodgkin (Linke-Serinsoz, 2017). A nivel inmunohistoquímico, la expresión de la hibridación in situ de la región codificadora de Epstein-Barr (EBER) es una característica constante de todas las células infectadas por EBV y, por lo tanto, es el mejor marcador para demostrar la infección por EBV (Montes, 2020).

Dada su naturaleza linfotrópica, el EBV infecta preferentemente células B a través del receptor CD21, lo que le confiere una fuerte asociación con enfermedades linfoproliferativas o linfomas de linaje B, como los trastornos linfoproliferativos postrasplante, linfoma de Burkitt y linfoma de Hodgkin. No obstante, también infecta a los linfocitos T y NK, pero con mucho menor frecuencia y se asocia con neoplasias malignas de linaje T o NK, como el linfoma extraganglionar de células T/NK y la leucemia agresiva de células NK (Okuno, 2019).

En general, un tumor se denomina “asociado a un virus” cuando el genoma del virus o sus productos (ARN o proteínas) son detectables dentro de las células tumorales. El método más utilizado para detectar el EBV es la hibridación in situ de los ARN codificados por EBV (EBER) en las células (Cader, 2010). La técnica de hibridación in situ es una técnica de referencia para la detección de la infección latente del EBV en los tejidos. Los protocolos para la hibridación de los EBER utilizan distintas sondas, como oligonucleótidos para ADN y sondas para ARN, y pueden estar marcadas con biotina, digoxigenina, fluoresceína, entre otras. En general, en todas las células neoplásicas asociadas al EBV se observará positividad para los EBER, mientras que estos están ausentes en las células normales adyacentes. Posteriormente identificado el tumor y la asociación con el virus, los EBER pueden usarse como marcadores de recurrencia de la enfermedad (Mate, 2016) (Figura 3).

Adicionalmente, en la mayoría de los tumores asociados al EBV, es posible demostrar que el genoma del EBV es monoclonal. Cuando el EBV infecta una célula, el genoma lineal se circulariza mediante la fusión de cualquiera de los extremos, dando lugar a una secuencia de fusión única para cada célula infectada. La detección de una sola secuencia de fusión en una muestra de tejido demuestra la monoclonalidad; es decir, todas las células infectadas con EBV se originaron a partir de una única célula infectada con EBV (Cader, 2010).

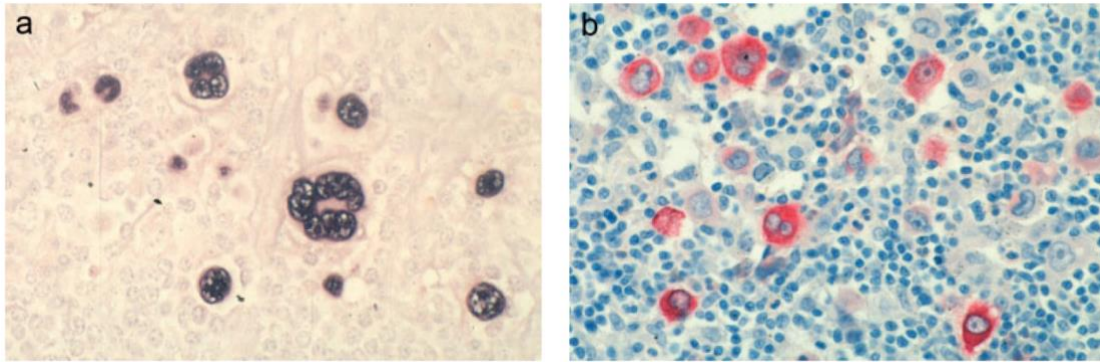


Figura 3. Detección de EBV en células de Hodgkin y Reed-Sternberg en un linfoma de Hodgkin clásico. a) Hibridación in situ, b) Inmunohistoquímica positiva para LMP1 (Tomado de Jarret, 2006).

Capítulo 2. Mecanismos fisiopatológicos de transformación asociados al virus del Epstein-Barr

El EBV es altamente inmunogénico, con más del 90% de la población mundial seropositiva. El ciclo de vida del EBV comprende el establecimiento en las células epiteliales de la orofaringe y linfocitos B locales, para posteriormente promover su proliferación y luego evolucionar hacia la infección latente en células hospederas (Bergbauer, 2010). El EBV puede immortalizar eficazmente linfocitos B vírgenes y establecer una infección latente a largo plazo (Lu, 2016).

El EBV expresa distintos productos génicos virales según la célula o el tipo de tumor donde se establece la infección. En una infección natural, el EBV induce a las células B en reposo a un programa proliferativo que asemeja una reacción del centro germinal de células B dirigida por antígenos, por medio de una combinación entre proteínas virales y ARN no codificante. Es decir, la infección por EBV imita los programas de desarrollo normales de las células B pero lo hace en ausencia de una señal antigénica exógena normal (Lu, 2016).

El EBV puede infectar a las células en estado latente o lítico. La latencia viral se caracteriza por la expresión de un subconjunto de genes que codifican por las proteínas virales que se conoce que son necesarias para la immortalización de los linfocitos B primarios. La entrada al ciclo lítico de la infección se desencadena por la expresión de cualquiera de los dos genes del EBV inmediatos tempranos, ya sea el BZLF1 o el BRLF1. Ambos genes funcionan como activadores de la transcripción e inician una cascada ordenada de expresión génica lítica viral que culmina con la liberación del virus y la muerte de la célula hospedera. Otra función que se cree tienen tanto BZLF1 como BRLF1 es modular la respuesta inmune del huésped para evitar que elimine el virus (Hong, 2005).

Dentro del huésped inmunocompetente, el EBV se mantiene de forma latente no patógena durante toda la vida en células B de memoria; pero de forma intermitente, estas células B de memoria se pueden diferenciar a células plasmáticas y activar la fase lítica de la infección, para promover la infección de otros linfocitos B en reposo. No obstante, en hospederos

inmunosupresos, la infección por EBV demuestra una fuerte asociación con varios linfomas de células B principalmente (Saha, 2019).

Todas las neoplasias asociadas al EBV tienen, predominantemente, un patrón de latencia génica viral y se ha demostrado que varias proteínas de latencia viral son necesarias para la transformación de linfocitos B in vitro. Esto ha llevado a la creencia de que sólo la fase latente de la expresión génica viral es importante durante el desarrollo de las neoplasias malignas asociadas al EBV. Sin embargo, se han detectado pequeñas cantidades de células infectadas líticamente en biopsias de enfermedad linfoproliferativa asociada al EBV en individuos inmunosupresos (Hong, 2005).

La lista de síndromes asociados al EBV incluye al linfoma de Burkitt, al linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Hodgkin clásico, linfoma primario de Sistema Nervioso Central, linfoma de efusión primaria, linfoma plasmablastico (Saha, 2019), enfermedades linfoproliferativas postrasplante asociadas al EBV, linfomas B asociados al HIV, granulomatosis linfomatoide y trastornos linfoproliferativos de células B seniles asociados al EBV (Saha, 2011). Una de las características más importantes de la infección por el EBV es la participación de diferentes tipos de células y enfermedades asociadas. El EBV está asociado con un amplio espectro de cánceres humanos, no solo desórdenes hematopoyéticos sino también tumores sólidos epiteliales, preferentemente en pacientes postrasplante y con HIV-SIDA (Saha, 2011).

Cada uno de los linfomas citados exhibe un patrón distinto de expresión de genes de latencia del EBV (Kang, 2015), por lo que las transcripciones virales codificantes y no codificantes, afectan simultáneamente múltiples cascadas de señalización acompañadas de alteraciones genéticas o epigenéticas que conducen al desarrollo de varios linfomas de células B asociados al EBV (Saha, 2019). Incluso, algunos estudios han mencionado que el EBV también afecta el microambiente del linfoma, en el que las oncoproteínas latentes manipulan los mecanismos celulares favoreciendo a las células del linfoma para el escape inmune y proliferación (Satoh, 2014). En la célula hospedera, el ADN viral está asociado con nucleosomas, lo que contribuye a la expresión restringida del gen viral; mientras que durante la fase inicial de la

infección, todo el ADN viral es accesible a la maquinaria de transcripción celular, por lo que muchos genes virales se logran expresar simultáneamente (Woellmer, 2013).

La transformación de linfocitos B mediada por el EBV está asociada tanto con la alteración de la expresión génica viral como la celular (Saha, 2015). Durante la infección inicial se expresan casi todos los genes, tanto los líticos como los latentes. El ADN dentro de la partícula viral no está metilado, pero en las células B infectadas de manera latente, la metilación progresiva del material genético viral regula el uso del promotor y la represión transcripcional. De hecho, la proteína Zta, codificada por BZLF1, induce el ciclo lítico del EBV; pero para codificar por esta proteína e inducir la fase lítica, se requieren dinucleótidos de CpG metilados en el ADN, por lo que la fase lítica de la infección se retrasa hasta que haya suficiente ADN viral metilado, con el fin de favorecer la represión y activación de los genes requeridos para el ciclo de vida del EBV en su hospedero. La base molecular de este mecanismo no se ha descifrado completamente (Bergbauer, 2010). Bergbauer et al, 2010 mencionan que los experimentos realizados con EBV demostraron que el virus utiliza la metilación gradual de su genoma con dos objetivos: 1) producir suficiente progenie viral para no ser eliminado por el sistema inmune, y 2) que al mismo tiempo, esta progenie viral no sea suficiente para eliminar al hospedero.

La infección por EBV tiene un patrón diferencial de expresión génica viral; además genera cambios en la expresión génica y epigenética celular. Ejemplos de esto son: 1) reducción en las marcas de heterocromatina asociadas con la activación transcripcional durante la fase inicial de la infección en linfocitos B inactivos, 2) aumento global de la metilación del promotor de genes supresores de tumores, lo que conduce a una proliferación y transformación aberrantes en células B infectadas (Saha, 2019).

La modulación del sistema de metilación del hospedador puede tener implicaciones para la patogenia de los tumores asociados al EBV. Para los carcinomas gástricos, se ha informado que la frecuencia de metilación de los genes supresores de tumores es mucho mayor en los casos de EBV+ que en los de EBV-, lo que indica la posibilidad de que el EBV induzca la hipermetilación de genes celulares críticos para la patogénesis del tumor. Curiosamente, la

activación de DNMT1 parece no estar limitada a la tumorigénesis inducida por EBV, pero recientemente se sugirió que juega un papel esencial en la metilación aberrante de novo en varios tumores que están asociados con la infección viral (Massini, 2009).

Estos cambios en la metilación de CpG en el genoma viral parecen desempeñar un papel importante en la regulación de la latencia viral y en la limitación de la expresión génica viral en linfocitos normales y en tumores. Durante la transformación de células B, el genoma viral se metila cada vez más tras la propagación celular, lo que puede reflejar la situación in vivo de una transición de una célula B proliferante linfoblastoide infectada por EBV a células B infectadas de forma latente (latencia II, I o 0) en tejidos linfoides de individuos sanos (Massini, 2009).

En linfocitos y tumores normales de pacientes inmunocompetentes, algunos de los promotores latentes del EBV deben regularse negativamente para silenciar o limitar la expresión del gen inmunodominante viral y así evadir la vigilancia inmunitaria del huésped. Una regulación transcripcional compleja de estos genes del EBV permite que el virus persista en el huésped con o sin una potente respuesta inmunitaria. La metilación de los genes del EBV se logra aprovechando el sistema de metilación del ADN de la célula huésped (Massini, 2009).

Debido a la asociación crítica de las enfermedades linfoproliferativas asociadas al EBV con la latencia viral, las funciones de los antígenos latentes han sido ampliamente estudiados. No obstante, conocer el ciclo de vida del EBV, su regulación genética y los mecanismos moleculares subyacentes son esenciales para comprender completamente la fisiopatología de la infección por EBV en el espectro de síndromes linfoproliferativos ligados al EBV. El conocimiento actual ha permitido inferir que los antígenos latentes codificados por EBV han desarrollado muchas estrategias sofisticadas para manipular vías celulares importantes en el desarrollo de varios cánceres humanos, como se ejemplifica en la figura 4 (Saha, 2011).

El EBV infecta las células B principalmente y las células epiteliales, y causa enfermedades que van desde la mononucleosis infecciosa hasta las neoplasias malignas. Como modelo de

la linfomagénesis, el EBV es capaz de transformar células B humanas primarias en líneas de células linfoblastoides. Estas líneas linfoblastoides siguen un programa de expresión génica llamado latencia III, que se caracteriza por la expresión constitutiva de seis antígenos nucleares del EBV (EBNA), tres proteínas de membrana latente (LMP) y más de 40 ARN no codificantes. Debido a que el programa de latencia III refleja la expresión génica de los linfomas en los pacientes inmunosupresos, estas líneas celulares proporcionan un modelo práctico y accesible para el estudio de la linfomagénesis (Grossman, 2017).

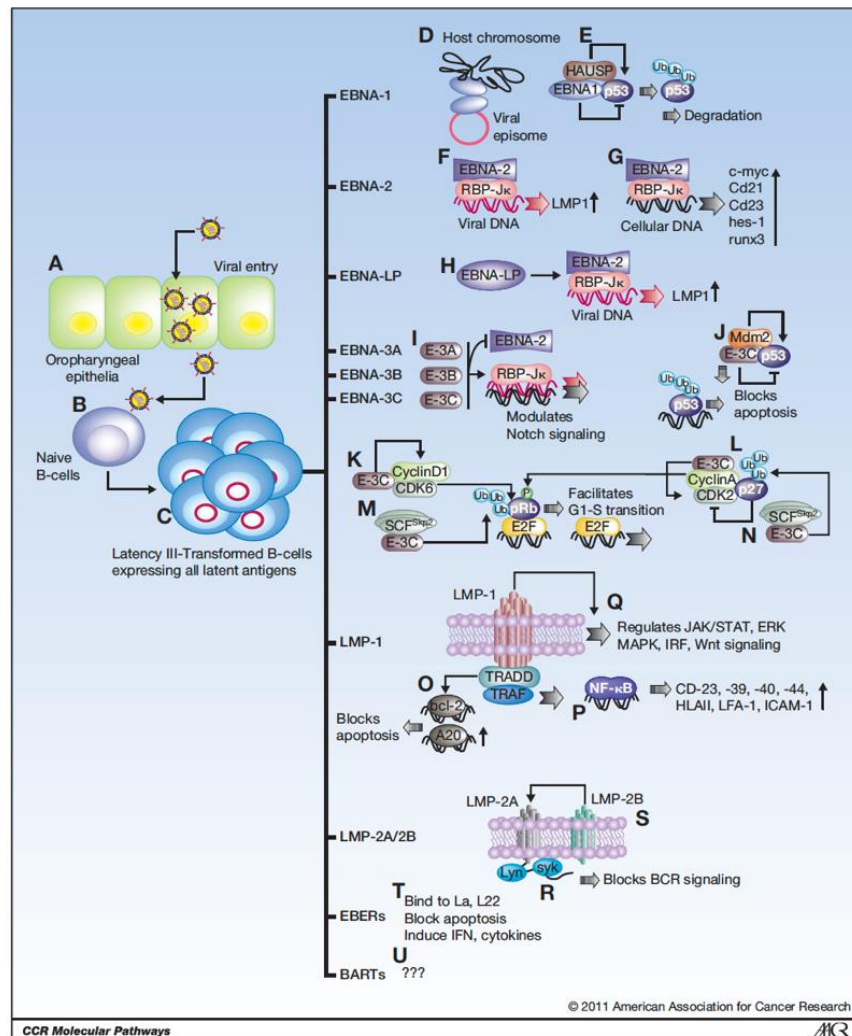


Figura 4. Características de los antígenos de latencia del EBV en linfomas de células B. A) Una vez ocurrida la infección inicial en células epiteliales de la orofaringe, B) el EBV infecta preferiblemente linfocitos B vírgenes, C) las células B infectadas se transforman y entran en latencia III, expresando la totalidad de antígenos del EBV. D-E) EBNA1 une el episoma viral al cromosoma de la célula huésped, coopera en la replicación y segregación viral; y bloquea la interacción entre p53 y HAUSP e induce su degradación. F-G) EBNA2 regula la transcripción de genes virales y celulares a través de

RBP-Jκ. H) EBNA-LP promueve la transcripción génica mediada por EBNA2. I) EBNA3 modula la transcripción del gen viral así como la vía de señalización Notch al bloquear la asociación de EBNA-2 con RBP-Jκ. J) EBNA3C forma un complejo con p53 y Mdm2 para reclutar la ligasa Mdm2-E3 para facilitar su degradación y bloquear la apoptosis dependiente de p53. K-L) EBNA3C mejora la actividad quinasa de los complejos Ciclina D1/CDK6 y Ciclina A/CDK2 para fosforilar pRb. M-N) EBNA3C recluta a la ligasa SCFSkp2 E3 y p27KIP1 hiperfosforilados para su degradación y facilitar la transición de fase G1 a S. O-P) LMP1 inhibe la apoptosis mediada por p53 transactivando bcl-2 y A20; aumenta NF-κB para transactivar genes celulares a través de la interacción con factores asociados a los receptores del factor de necrosis tumoral y la proteína del dominio de muerte TRADD. Q) LMP1 modula las vías de señalización JAK/STAT, ERK MAPK, IRF y Wnt. R-S) LMP2A bloquea la señalización del BCR mediante la interacción con las tirosina quinasas celulares Lyn y Syk. LMP2B regula las funciones de LMP2A. T) EBER bloquea la apoptosis, se une a proteínas celulares e induce la IL-10 y el IFN tipo I. U) El papel de BART en el desarrollo de linfomas de células B sigue en análisis. (Tomado de Saha, 2011).

En estudios in vitro se ha demostrado que EBNA2, EBNA1P, EBNA3A, EBNA3C y LMP1 son esenciales para la transformación celular. Adicionalmente, se conocen otros antígenos latentes y ARN no codificantes que también influyen en la transformación celular y el mantenimiento subsiguiente de la infección en linfocitos B. La expresión de estos antígenos varía según los programas de latencia establecidos por el EBV en las células infectadas. Durante la latencia III, los seis EBNA se expresan; sin embargo, en la latencia II y I, solo se expresa EBNA1, y no se expresa ninguna proteína EBNA durante la latencia 0. Todos los EBNA están involucrados en la regulación de la transcripción y también participan en la activación transcripcional de genes LMP virales (LMP1 y LMP2) en células infectadas (Ayee, 2020). A continuación, se enlistan las principales características de cada una de estas proteínas:

EBNA1: es una proteína esencial para la replicación del ADN, pues une el episoma viral al cromosoma huésped y ayuda a la replicación y segregación viral. Es también esencial en el mantenimiento e inmortalización del genoma latente viral, por lo que se expresa en todos los programas de latencia (I, II y III) (Saha, 2011). Es una proteína de unión al ADN específica de secuencia que interactúa con tres sitios diana de secuencia palindrómica únicos (FR, DS y OP) que se repiten varias veces en el genoma del EBV. EBNA1 se une a elementos FR, que actúan como potenciadores del promotor C viral para dirigir la transcripción de los seis

EBNA; mientras que la participación de los elementos DS conducen a la regulación de la replicación del ADN viral asociado a la fase S y la interacción con OP regula negativamente la transcripción de EBNA1 (Ayee, 2020). La unión de EBNA1 al origen de replicación episomal viral (OriP) recluta gran número de proteínas celulares, incluidas aquellas necesarias para la replicación del ADN viral. Con respecto a su rol en la transformación de linfocitos B y su papel en oncogénesis, se sabe que facilita la degradación de p53 al bloquear la interacción entre p53 y HAUSP (enzima desubiquitinante del huésped) (Saha, 2011), y por lo tanto, promueve la oncogénesis (Kang, 2015; Saha, 2019). Las repeticiones de la secuencia de aminoácidos ocultan al EBNA1 del reconocimiento inmune por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I y previene la presentación de antígenos a través de la ruta ubiquitina-proteosoma (Ayee, 2020). La expresión de EBNA1 se asocia con el linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, con linfomas asociados al HIV-SIDA y con los desórdenes linfoproliferativos postrasplante. EBNA1 puede servir como una diana terapéutica atractiva para la inhibición de la replicación latente viral y la persistencia en tumores asociados con EBV. Además, la evidencia creciente sugiere un papel oncogénico para EBNA1 en la progresión de cánceres humanos asociados con EBV (Saha, 2011). (Figuras 4 y 5).

EBNA2 y EBNA-LP: son los primeros genes latentes que se expresan después de la infección primaria de linfocitos B, por lo que se sugiere que están involucrados en la transición de la fase G0 a G1 (Middeldorp, 2003). EBNA2 activa factores de transcripción celular como CBF1/RBP-Jk, PU.1 y otras proteínas para regular al alza la expresión de genes virales y celulares. EBNA2 contribuye a la proliferación de células B a través de la activación transcripcional de cerca de 300 genes celulares, como c-myc, RUNX3, CD23, entre otros. La activación de c-myc conduce a la expresión de proteínas como las ciclinas de tipo D y la ciclina E, que están asociadas con la división celular. EBNA2 también interactúa con otros factores de transcripción como los factores de unión Cp, LMP1 y LMP2 para la regulación positiva de los genes virales que son responsables de la immortalización de las células B (Ayee, 2020). Aunque EBNA2 es esencial para la transformación del crecimiento inicial de las células B infectadas con el EBV in vitro, su expresión puede ser menos crítica durante la propagación del cáncer como se observa en la mayoría de los casos de tumores ligados al

EBV, aparte de los observados en pacientes inmunosupresos (Middeldorp, 2003). (Figuras 4 y 5).

Por otro lado, EBNA-LP (o EBNA5) es un coactivador transcripcional de genes virales y celulares dependiente de EBNA2 y es esencial en la transformación e immortalización de células B por EBV (Saha, 2011; Vindas, 2019). EBNA-LP interactúa con EBNA2 para inactivar p53 y pRb (proteína del retinoblastoma) y otros genes supresores de tumores (p14ARF y Fte1/S3a), interactúa con reguladores del ciclo celular (DNA-PKcs y HA95), con una proteína antiapoptótica (HAX-1) e interactúa con factores de transcripción en la vía de señalización NOTCH (Saha, 2011), lo que facilita la transición de fase G0 a G1 de las células B primarias en reposo después de la infección por EBV (Middeldorp, 2003). Tanto EBNA2 como EBNA-LP se asocian con linfomas asociados al HIV-SIDA y con los desórdenes linfoproliferativos postrasplante. EBNA2 y EBNA-LP se asocian con el programa de latencia III (Saha, 2011). EBNA-LP regula positivamente el gen de la quimiocina regulada por activación (TARC), que se ha propuesto que desempeña un papel clave en la transformación y supervivencia de las células B (Ayee, 2020). (Figuras 4 y 5).

Familia de las proteínas de EBNA3: comprende tres fosfoproteínas: EBNA3A, EBNA3B y EBNA3C, las cuales son factores de transcripción que regulan la expresión de genes en el huésped y la proliferación de células B, especialmente en un medio inmunosupresor. Algunos estudios genéticos han revelado que EBNA3A y EBNA3C, junto con EBNA2 y LMP1, son necesarios para la transformación de linfocitos B, mientras que EBNA3B es prescindible, básicamente por el hecho de que EBNA3A y EBNA3C actúan de forma cooperativa como oncoproteínas virales predominantes mediante la regulación de la transcripción de genes celulares; mientras que EBNA3B actúa como un gen supresor de tumores. EBNA3A y EBNA3C bloquean la diferenciación de células B a un fenotipo de células plasmáticas mediante la activación transcripcional del inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina p18iNK4c y el regulador transcripcional de la diferenciación de células plasmáticas, el BLIMP-1 (Saha, 2019) (Figura 4). EBNA3A es esencial para la immortalización de células B ya que interactúa con RBP-Jk y regula la vía de señalización NOTCH; EBNA3C es esencial para la immortalización de células B ya que supera varios puntos de control en el ciclo celular,

interactúa con RBP-Jk, activa LMP1, bloquea la apoptosis dependiente de p53, mejora la actividad quínasa de los complejos de ciclina D1/CDK6 y ciclina A/CDK2. Además, forma un complejo ternario con p53 y Mdm2, recluta la actividad de la ligasa Mdm2-E3, a la ligasa SCF^{Skp2} E3 y p27^{KIP1} para facilitar su degradación y hacer la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Todas las proteínas EBNA3 se asocian con el programa de latencia III (Saha, 2011). (Figuras 4 y 5).

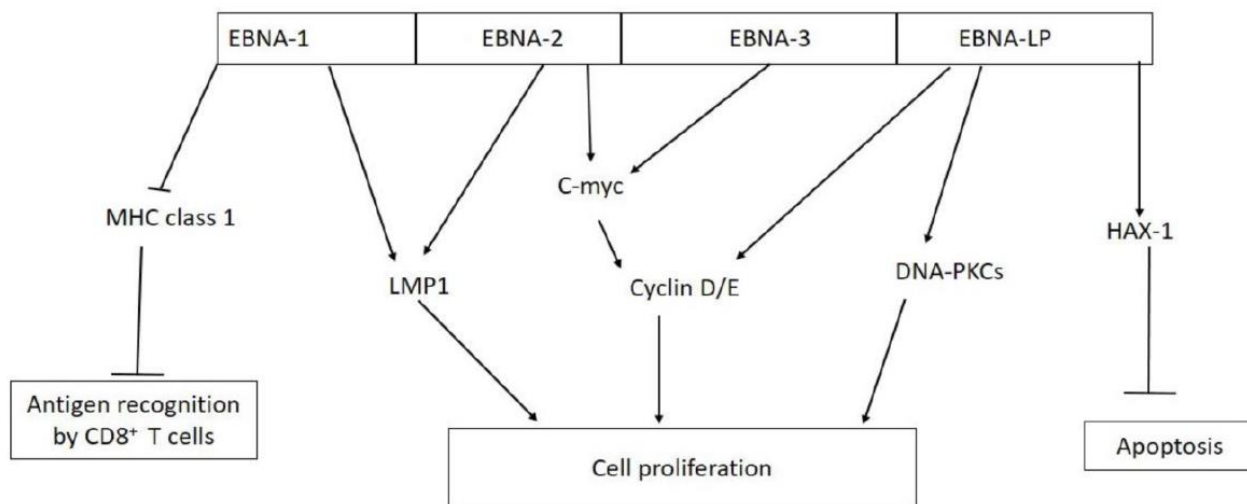


Figura 5. Actividades biológicas de los antígenos nucleares del EBV. EBNA1 inhibe la presentación de antígenos CMH de clase I. EBNA1 y EBNA2 activan la expresión de LMP1. EBNA2 y EBNA3 interactúan con C-myc que activan constitutivamente la ciclina D/E que conduce a la proliferación celular no regulada; EBNA-LP puede activar directamente la ciclina D/E y la proteína quínasa dependiente del ADN (ADN-PKC) para promover la proliferación celular. EBNA-LP promueve la supervivencia celular al interactuar con la proteína antiapoptótica específica de células hematopoyéticas proteína 1 (HS-1) asociada a la proteína HAX-1. (Tomado de Ayee, 2020).

LMP: Son las proteínas latentes de membrana. Tres proteínas de membrana latente, LMP1, LMP2A y LMP2B, son expresadas por EBV durante la latencia II y III en células infectadas por el virus. Las tres proteínas se expresan como proteínas de la membrana de la superficie celular y son necesarias para la supervivencia y transformación de las células infectadas en células en proliferación permanente (Ayee, 2020). Las LMP regulan particularmente la respuesta inmune del huésped y, por lo tanto, contribuyen a la activación y proliferación de

células B infectadas, lo que conduce a linfomas de células B en ausencia de vigilancia inmunitaria.

El gen LMP1 es un oncogén esencial que se expresa como un receptor constitutivamente activo en la mayoría de las células tumorales asociadas al EBV. LMP1 representa una de las principales oncoproteínas codificadas por EBV que imitan la vía de señalización del receptor CD40. Es esencial para la transformación de linfocitos B inducida por EBV a través de la activación de múltiples vías celulares, como las cascadas NF- κ B, JNK, p38, MAPK, PI3K y JAK/STAT. La activación de estas principales vías de señalización da como resultado la regulación positiva de la expresión de proteínas antiapoptóticas como A20, Bcl-2 y la regulación negativa de p53, lo que promueve el crecimiento y la supervivencia celular. LMP1 activa la JAK3/STAT3 que aumenta la expresión del VEGF y promueve la metástasis tumoral y la invasividad (Ayee, 2020). LMP1 también puede afectar la biogénesis de citocinas y del receptor de citocinas, lo que altera la angiogénesis y las respuestas inflamatorias, contribuyendo al escape inmunológico y a la propagación del cáncer (Middeldorp, 2003). LMP1 también promueve la proliferación de células infectadas por EBV a través de la activación del receptor EGFR y las vías de señalización de AKT/proteína quinasa B con activación de ciclina E y telomerasa, respectivamente (Ayee, 2020). En resumen, LMP1 activa vías celulares que conducen a la invasión tumoral y metástasis, que favorecen proliferación celular e inhibición de la apoptosis (Figura 4 y 6) (Ayee, 2020). LMP1 se asocia con linfoma de Hodgkin, linfomas asociados al HIV-SIDA y con los desórdenes linfoproliferativos postrasplante (Saha, 2011).

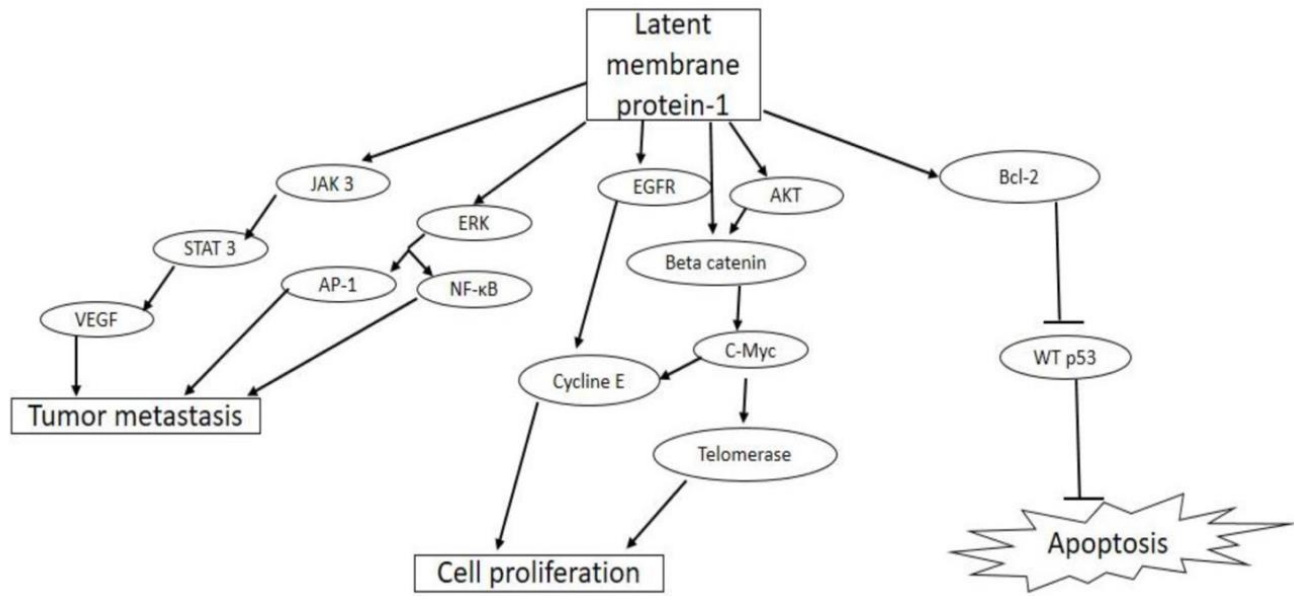


Figura 6. Actividades biológicas de LMP-1 en la tumorogénesis. La LMP-1 del EBV activa distintas vías celulares que conducen a la invasión tumoral y la metástasis, inducen proliferación celular y la inhibición de la apoptosis. (Tomado de Ayee, 2020).

Por otro lado, LMP2 está formado por dos variantes, LMP2A y LMP2B. Es esencial para la persistencia a largo plazo del episoma viral al proporcionar señales de crecimiento temporal y supervivencia de las células B en órganos linfoides (Thompson, 2004). LMP2A actúa como un homólogo funcional del receptor de células B (BCR) (Saha, 2011), lo que promueve la supervivencia de células B y es necesaria para la transformación del crecimiento de células B (Saha, 2019). La señalización similar a BCR, mediada por LMP2A, proporciona una fuerte señal de supervivencia que rescata a las células BCR negativas de la apoptosis (Ayee, 2020). LMP2A es esencial para la activación, proliferación y la supervivencia de las células B infectadas con EBV en los primeros momentos, después de lo cual se requiere para la supervivencia a largo plazo de las células B.

LMP2A ayuda a las células infectadas por el EBV a escapar de la eliminación por las células T CD8⁺ regulando negativamente (i) la expresión de genes en etapa latente específicos de las células T CD8⁺, especialmente EBNA1, (ii) la expresión de proteínas del CMH de clase 1 para prevenir la presentación de antígenos, y (iii) la expresión del receptor co-activatorio NKG2D para evadir el reconocimiento de las células T (Ayee, 2020). LMP2B regula la

función de LMP2A, se sabe que no es esencial en la immortalización de células B (Saha, 2011) (Figura 4), pero conduce a las células B latentemente infectadas a la reactivación lítica (Thompson, 2004). Las LMP se asocian con la aparición de linfoma de Hodgkin, linfomas asociados al HIV-SIDA y con los desórdenes linfoproliferativos postrasplante. Todas las LMP se asocian con los programas de latencia II y III (Saha, 2011).

ARN no codificantes (ncARN): El EBV expresa una variedad de ncARN al infectar las células B, como por ejemplo EBER1 y EBER2. Aunque la mayoría de estos ncARN no son esenciales para la transformación de linfocitos B, su función radica en la evasión inmune y se expresan abundantemente en los diferentes tipos de programas de latencia, proporcionando herramientas para la detección viral en neoplasias asociadas al EBV (Saha, 2019). La expresión de EBER aumenta la formación de colonias celulares, induce el crecimiento de células B y bloquea la fosforilación del factor de iniciación eucariota 2 alfa (eIF2) dependiente de PKR, lo que produce un bloqueo de la inhibición de proteínas mediada por eIF2 y la resistencia la apoptosis inducida por INF-alfa (Samanta, 2006). Se asocian con el linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfomas asociados al HIV-SIDA y desórdenes linfoproliferativos pos trasplante, y están presentes en todos los programas de latencia (Saha, 2011) (Figura 4).

miARNs: Son transcriptos de BART y BHRF1. El EBV expresa 44 miARN en todas las formas de latencia y tejidos tumorales, regulando genes celulares y virales. A pesar de que los miARNs se expresan abundantemente en los linfocitos B infectados, su función en la transformación celular aún no es clara. Se sabe que tienen función en evasión inmune al regular a la baja la expresión de antígenos virales inmunogénicos, interfieren con la apoptosis, proliferación de linfocitos B y mantenimiento de células infectadas (Kang, 2015; Saha, 2019; Vindas, 2019, Ayee, 2020) (Figura 4).

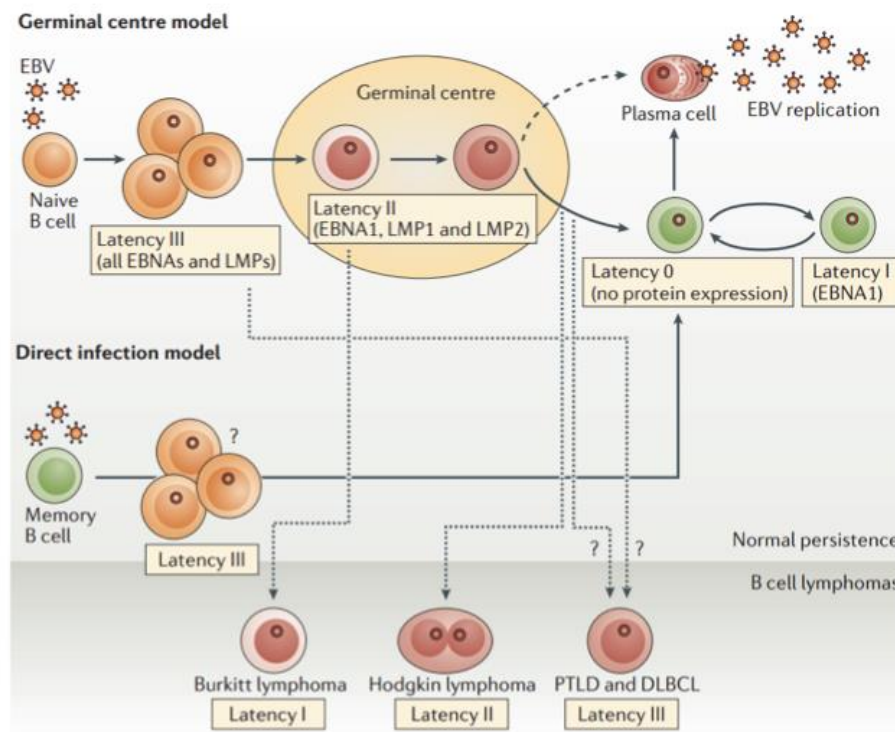


Figura 7. Persistencia del EBV en células B del huésped y demostración del origen de linfomas de células B asociados al EBV. (Tomado de Young, 2016).

En la parte superior de la figura 7, se demuestra la persistencia normal del EBV en el hospedero. El EBV reside en las células B de memoria del huésped de forma latente, generando infecciones asintomáticas. En este escenario, hay dos modelos para explicar cómo el EBV ingresa a las células B de memoria, uno es el modelo de centro germinal y el otro es el modelo de infección directa. En el modelo de centro germinal, la infección por EBV conduce a las células B vírgenes a un programa de crecimiento de latencia III, en el que la proliferación y expansión de las células B infectadas es impulsada por la expresión de todos los genes latentes del EBV. Posteriormente, las células ingresan al centro germinal y expresan el programa de latencia II, que se caracteriza por la expresión de EBNA1, LMP1 y LMP2. LMP1 proporciona una señal similar a CD40 y LMP2 proporciona una señal similar a un receptor BCR. Luego, las células B del centro germinal infectadas con EBV salen y pueden tomar dos caminos: 1) convertirse en células B de memoria, donde la expresión de proteínas del EBV se silencia (entran en latencia 0), con el objetivo de evadir el sistema inmune. Para

que estas células proliferen, requieren las mismas señales que inducen proliferación de células B de memoria normales, pero adicionalmente requieren la expresión del EBNA1 (cambio a latencia I) para la segregación del episoma viral. Las células B de memoria pueden diferenciarse terminalmente en células plasmáticas, lo que desencadena la replicación viral; o 2) pueden diferenciarse directamente en células plasmáticas. En el modelo de infección directa, el EBV accede a las células B de memoria después de la infección directa de estas células, que puede implicar la activación del programa de latencia III (Young, 2016).

En la parte inferior de la figura 7, se representa el origen de los linfomas de células B asociados al EBV. Actualmente, aún existe incertidumbre acerca de las etapas exactas de diferenciación a partir de las cuales surgen los linfomas de células B positivas para EBV (representado con las líneas negras punteadas), ya que no se puede suponer, por el patrón de latencia expresado en la célula progenitora, el tumor desarrollado. No obstante, según la evidencia hasta ahora conocida, la figura ilustra la célula supuesta de origen de la enfermedad del linfoma de Burkitt, del linfoma de Hodgkin, de la enfermedad linfoproliferativa postrasplante y el linfoma difuso de células B grandes (Young, 2016).

El EBV utiliza una multitud de estrategias para evadir la detección y eliminación por parte del sistema inmunológico del huésped. Las estrategias de evasión inmunitaria del EBV se pueden clasificar ampliamente en tres categorías: 1) las que modulan la función de las células inmunes, 2) las que modulan las vías de presentación de antígenos y 3) las que modulan las vías apoptóticas (Hatton, 2014).

In vitro, el EBV infecta a cualquier célula B en reposo, expulsándola del estado de reposo para convertirse en un linfoblasto con proliferación activa. Paradójicamente, el EBV persiste in vivo en un estado inactivo en las células B de memoria en reposo que circulan en la sangre periférica. Una posible explicación a cómo llega el EBV específicamente a este compartimento celular de memoria, es que dos genes codificados por el virus, LMP1 y LMP2A, permiten que el EBV utilice las vías normales de diferenciación de las células B para que el linfocito B infectado se convierta en una célula de memoria en reposo (Thorley, 2001).

La transformación del EBV estimula la agregación celular, lo que indica que el EBV induce la producción de moléculas que median la adhesión célula a célula. En una investigación realizada por Grossman et al en el 2017, demostraron que el EBV indujo de forma potente la expresión de la molécula de adhesión CD226, que normalmente se expresa en linfocitos T y NK y sólo en un 3% de las células B, poco después de la infección primaria. Observaron que los niveles de CD226 aumentaron de manera creciente desde las células B positivas al EBV en proliferación temprana hasta las líneas de células linfoblastoides, y que la expresión de CD226 era alta en las células B infectadas con EBV que expresaban el programa de latencia III, pero baja en las líneas celulares de linfoma B infectadas con latencia I y expresión negativa en las células sin EBV. Además, se observó que los niveles de CD226 aumentaron aproximadamente 5 veces al día 3 post-infección y luego permanecieron estables hasta el día 13 post-infección. Desde el día 13 hasta el día 35, la expresión de CD226 siguió aumentando, y se estabilizó al llegar a un aumento de 50 veces en relación con las células B no infectadas. El aumento más dramático en la expresión superficial de CD226 ocurrió 3 semanas después de la infección, que es el mismo período de tiempo en el que el EBV induce dianas de NF- κ B concomitantes con la expresión de LMP1 (Grossman, 2017).

Durante la transformación, el EBV induce amplios cambios en la expresión génica del huésped impulsados por la expresión de LMP1, aproximadamente 2 a 3 semanas después de la infección. LMP1 imita al receptor CD40, se activa constitutivamente y proporciona señales de la membrana celular que activan la vía NF- κ B. Además de alterar el crecimiento y la supervivencia celular, la expresión de LMP1 y la activación de la vía NF- κ B promueven la agregación intercelular en las células linfoblastoides, lo que hace que se agrupen en cultivo. Las interacciones entre LFA-1 (CD18/CD11a) e ICAM-1 (CD54) son críticas para mantener esta agregación constitutiva (Grossman, 2017). Por su parte, LMP2 imita la función del BCR y brinda, junto con LMP1, las señales necesarias para la supervivencia de las células infectadas por EBV en el centro germinal y su salida del centro germinal como células de memoria (Vockerodt, 2015). Además de un conjunto restringido de proteínas virales expresadas durante la infección latente por EBV, el virus puede afectar la homeostasis de la célula huésped al interferir con la expresión de miARN celular y al codificar sus propios miARN (Mundo, 2020).

No obstante, a pesar de todos los mecanismos acá descritos, no se conocen bien los mecanismos exactos por los cuales el EBV contribuye a las neoplasias linfoides. El papel del virus se confunde aún más por el hecho de que, dentro de cada cáncer asociado con el EBV, la infección viral de las células tumorales se documenta mediante métodos de rutina sólo en una fracción de los casos. Por esto, el grupo de investigación de Mundo et al, 2020, propuso una hipótesis de "golpe y fuga" o "hit and run". La propuesta consiste en que el EBV puede mediar en la transformación celular a través de un impacto inicial determinado por el programa de expresión génica viral. Después de que el virus haya inducido cambios hereditarios en la expresión génica celular y/o después de que se hayan adquirido mutaciones somáticas en oncogenes celulares o genes supresores de tumores, el genoma del virus puede no ser estrictamente necesario para el mantenimiento del tumor, de hecho podría ser contraproducente al ser un objetivo potencial de una respuesta inmunitaria del huésped. Por lo tanto, el virus puede perderse progresivamente del clon de linfoma después de cada ciclo celular, debido a la duplicación imperfecta conocida y al reparto asimétrico de los episomas del EBV durante la fase S y la fase M, respectivamente.

Sin embargo, hasta ahora existen pocos datos que apoyen tales hipótesis y los métodos de rutina para detectar el virus, como la inmunohistoquímica para la proteína viral LMP1 y la hibridación in situ para los ARN codificados por EBV (EBER), pueden tener una sensibilidad subóptima. Actualmente, los métodos más sensibles son RT-qPCR y el análisis de ARNscope in situ (Mundo, 2020). Mundo et al 2020, utilizaron métodos de rutina y de mayor sensibilidad como el qPCR, ddPCR y detección in situ de mARN de EBNA1 mediante ARNscope, para evaluar la infección por EBV en una cohorte grande de distintos tipos de linfoma asociados a EBV (19 linfomas de Burkitt, 34 linfomas difusos de células B grandes, 44 linfoma de Hodgkin clásico, 50 linfomas foliculares, 10 linfomas linfoblásticos T, 20 tricoleucemias y 10 linfomas de células del manto). Según los resultados obtenidos, qPCR, ddPCR y ARNscope documentaron consistentemente la presencia de múltiples ácidos nucleicos de EBV en células tumorales de varios casos de EBV negativos por métodos convencionales; por lo tanto, concluyeron que el EBV puede contribuir a la patogénesis del linfoma más ampliamente de lo que se reconoce actualmente (Mundo, 2020).

Capítulo 3. Características epidemiológicas, morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas de las neoplasias hematológicas asociadas al virus del Epstein-Barr, específicamente linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt y los desórdenes linfoproliferativos postrasplante

La linfomagénesis es considerado como un proceso complejo con múltiples pasos. Se reconocen cuatro mecanismos fundamentales:

- 1) Acumulación de alteraciones genéticas en la célula tumoral.
- 2) Estimulación y selección de las células tumorales por un antígeno.
- 3) Inmunodeficiencia del huésped.
- 4) Infección por virus oncogénicos (Beltramino, 2005).

Desde su descubrimiento, el EBV se ha encontrado en una variedad de tipos de tumores (Grywalska, 2013). Las neoplasias malignas asociadas con el EBV son distintos tipos de cánceres que se desarrollan en el contexto de inmunosupresión, ocurren con patrones endémicos de incidencia o son un subconjunto discreto de cánceres comunes (Raab-Traut, 2007).

La mayoría de las personas infectadas con virus oncogénicos no desarrollarán cáncer como consecuencia de su infección. El EBV es un virus de alta prevalencia a nivel mundial (más del 90% de la población es seropositiva); sin embargo, solo una minoría de las personas infectadas desarrollará un cáncer asociado con el EBV. Los virus tumorales suelen ser insuficientes para causar malignidad, ya que la infección por virus es solo un paso en el proceso que conduce a un cáncer (Cader, 2010).

La evidencia de una asociación con EBV es más fuerte para el linfoma de Burkitt, linfoma de células T/NK, carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Hodgkin y para linfomas malignos en pacientes inmunosupresos (Figura 8) (Raab-Traut, 2007; Grywalska, 2013). Además, se ha asociado a ciertos tumores de células epiteliales, como el carcinoma gástrico y el carcinoma de mama. Sin embargo, la lista no se limita a estos tumores sino que el EBV se puede encontrar en otros tipos de neoplasias malignas (Grywalska, 2013).

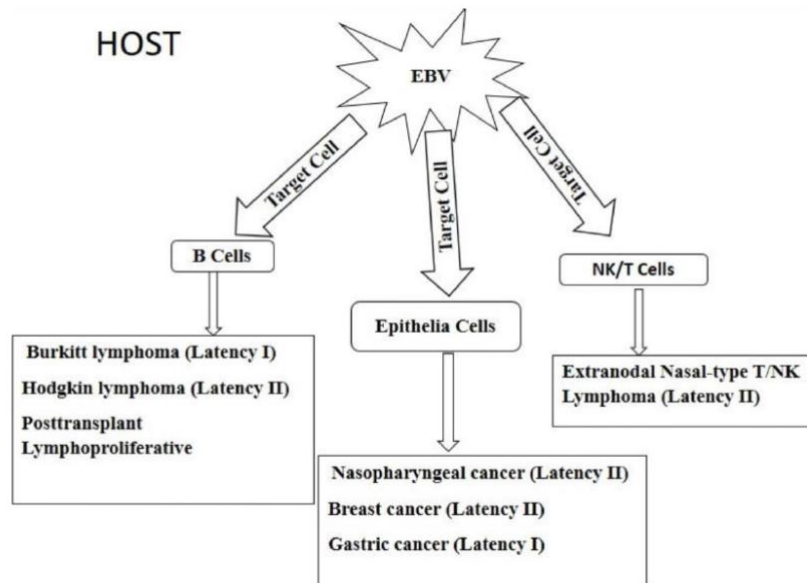


Figura 8. Malignidades epiteliales y hematológicas asociadas al EBV. (Tomado de Ayee, 2020).

Los linfocitos B infectados por EBV portan el genoma viral en forma latente. En algunas circunstancias, la latencia del EBV puede reactivarse, dando como resultado la expresión de genes virales que codifican una serie de productos que estimulan moléculas anti-apoptóticas, citocinas y transductores de señales. El descontrol de las vías celulares que regulan una amplia variedad de funciones celulares homeostáticas conduce a la transformación neoplásica (Grywalska, 2013). La capacidad del EBV para transformar eficazmente las células B en cultivos en células transformadas e inmortalizadas acentúa su conexión con los cánceres humanos (Raab-Traut, 2007). Aunque EBV puede ser esencial para la tumorigénesis, generalmente no es suficiente por sí solo. También pueden ser importantes otros factores como el fallo inmune, la proliferación de células B por estimulación infecciosa, la aparición de aberraciones genéticas secundarias o mutaciones (Thompson, 2004).

Como el EBV infecta las células B a través del receptor de CD21 específico de células B, las neoplasias hematológicas malignas asociadas al EBV son predominantemente del tipo de células B. No obstante, también se asocia con neoplasias malignas de células T y NK. Los linfomas positivos para el EBV se pueden dividir en los que se presentan en individuos

inmunosupresos, que son verdaderos linfomas impulsados por EBV, y los que se presentan en individuos inmunocompetentes (Grywalska, 2013).

Es útil considerar a los linfomas como la contrapartida neoplásica de reacciones que normalmente ocurren en el tejido linfoide para comprender su patogenia. La linfomagénesis es considerada un proceso con múltiples pasos durante el cual se produce la acumulación de alteraciones genéticas. Además, la estimulación antigénica crónica juega un rol importante en la linfomagénesis. La presencia de un antígeno no sólo estimula la proliferación celular transmitiendo las aberraciones genéticas a las células hijas, sino que también induce los procesos de rearreglos de inmunoglobulinas y por lo tanto, aumenta la probabilidad de que ocurran nuevos rearreglos aberrantes (Beltramino, 2005). (Figura 9).

En la mayoría de los desórdenes linfoproliferativos asociados al EBV, la expresión génica viral es limitada y no involucra la replicación lítica del genoma o la producción de nuevos viriones. En las neoplasias asociadas al EBV, el genoma viral se encuentra en las células tumorales en su forma episomal latente y se replica durante la división celular utilizando la maquinaria de la célula huésped (Beltramino, 2005).

Para comprender mejor el rol del EBV en la patogénesis de los linfomas, es importante conocer en qué estado del desarrollo de la célula B que origina el linfoma se produce la infección y si esa infección ocurre antes o después de los eventos transformantes (Kuppers, 2003). Para lograr ser oncogénico, el EBV debe mantener su genoma adentro de la célula blanco, prevenir la muerte de la célula infectada y evitar que la misma sea reconocida por la respuesta inmune; además, el EBV debe activar vías de señalización que controlen el crecimiento celular (Thompson, 2004).

El EBV activa a las células B con infección latente e induce su transformación a blastos proliferantes para convertirlas en células B de memoria de larga sobrevivencia. Este mecanismo tiene importancia en la patogénesis de las enfermedades asociadas al EBV. Por un lado, la activación de células recientemente infectadas es peligrosa tanto para el huésped como para el virus, por el riesgo de desarrollar una enfermedad neoplásica potencialmente fatal que limitará el tiempo en que el virus pueda diseminarse a otros huéspedes; pero por el otro lado,

el virus se asegura que los linfoblastos proliferantes tengan corta sobrevida (Beltramino, 2005).

El riesgo para el huésped surge si el EBV infecta a una célula B bajo condiciones en las cuales la célula infectada no puede salir del ciclo celular, quedando bloqueada su maduración en el estadio de centro germinal, determinando la expresión constitutiva de los genes del programa de latencia tipo II, o si las células de memoria accidentalmente expresan los genes del programa de crecimiento. Ambas situaciones podrían llevar al crecimiento desregulado y al desarrollo de tumores. Lo anterior se evita porque el EBV tiene la propiedad de conservar los blancos virales que las células T citotóxicas reconocen en los linfoblastos infectados. Por lo tanto, el EBV en los linfoblastos proliferantes es un blanco seguro de la respuesta inmune, lo que garantiza que los linfoblastos que expresan el programa de crecimiento pero que no pueden diferenciarse y salir del ciclo celular serán destruidos (Thorley, 2004).

Algunos genes latentes pueden ejercer su función predominantemente en la transformación inicial de las células B, como EBNA2 y EBNA-LP, y luego ser subregulados o cambiados por otros. Otros genes latentes, como el EBNA1 y LMP2A, pueden ser más importantes, en el mantenimiento de la sobrevida a largo plazo del genoma del EBV en las células B latentes, mientras que LMP1 puede mantener el crecimiento temporal de estas células al pasar a través de los ganglios linfáticos. Los efectos provocados por la expresión de LMP1, junto con el crecimiento externo o los estímulos que inducen diferenciación proveen las bases para el crecimiento pre-maligno. El mantenimiento de la expresión de LMP1 en bajos niveles, es crucial para la persistencia de las células B transformadas por el EBV. Cuando estas células se activan, se expresan genes virales adicionales que proveen funciones de crecimiento y sobrevida. Los transcriptos codificados por BHRF1 (los cuales son homólogos funcionales de BCL-2) se encuentran principalmente en linfomas de células B, tanto en pacientes inmunosupresos como en inmunocompetentes. Se cree que el efecto de la proteína BHRF1 se suma al efecto de la proteína BCL-2 inducida por LMP1 para evitar la apoptosis y estimular la sobrevida de las células del huésped durante la producción de la progenie viral (Middeldorpp, 2003).

La mayoría de los linfomas de células B derivan de los linfocitos B del centro germinal o de sus descendientes. Esto se debe principalmente a la extensa proliferación de las células B del centro germinal, lo cual podría aumentar el riesgo de transformación maligna; y a los procesos de remodelación del gen de inmunoglobulinas, hipermutación somática y cambio de clase de las cadenas pesadas que ocurren en el centro germinal y que podrían causar lesiones genéticas. El análisis de los linfomas B asociados al EBV demuestra que, en la mayoría de los casos, estas patologías neoplásicas derivan de las células B centro germinales o de los sobrevivientes atípicos de las reacciones del centro germinal (Beltramino, 2005).

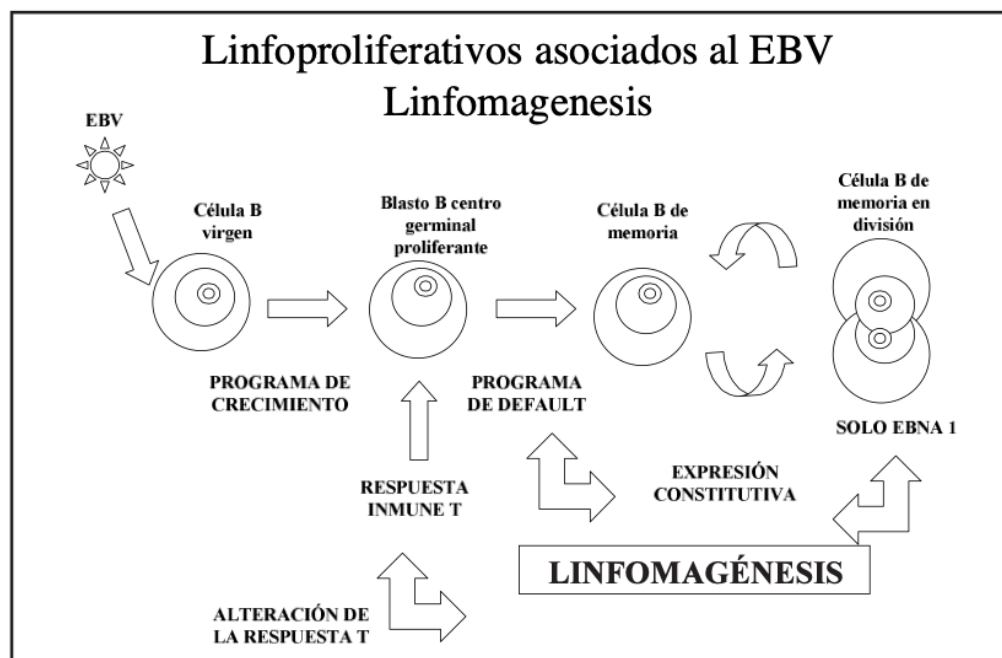


Figura 9. Proceso de linfomagenesis asociado al EBV. (Tomado de Beltramino, 2005).

A continuación se describen las principales características epidemiológicas, morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas de las tres neoplasias hematológicas más frecuentemente asociadas al EBV.

1. Linfoma de Hodgkin:

El linfoma de Hodgkin es una enfermedad maligna del tejido linfoide que se origina en los linfocitos B y menos común, en linfocitos T. Representa aproximadamente el 1% de todos

los cánceres y el 30% de las neoplasias malignas linfoides en todo el mundo (Grywalska, 2013) y tiene una incidencia de 2-3 casos por cada 100 000 personas por año (Momotow, 2021). Se caracteriza por la presencia de un 1% de células gigantes binucleadas o multinucleadas, conocidas como células de Reed-Sternberg, y su equivalente mononuclear, la célula de Hodgkin (Farrell, 2011). Es un trastorno poco común con características clínicas, histológicas y epidemiológicas heterogéneas. Con respecto a la clasificación, el linfoma de Hodgkin se puede dividir histológicamente en dos grandes grupos: el linfoma de Hodgkin predominio nodular linfocítico y el linfoma de Hodgkin clásico, el cual a su vez se subdivide en 4 subgrupos: linfoma de Hodgkin clásico esclerosis nodular, linfoma de Hodgkin clásico celularidad mixta, linfoma de Hodgkin clásico rico en linfocitos y linfoma de Hodgkin clásico de depleción linfocítica (Pérez, 2019).

Con respecto a la fisiopatología del linfoma de Hodgkin, las células de Reed-Sternberg y las células de Hodgkin tienen reordenamientos detectables en los genes de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, lo que confirma un origen de células B, y como los reordenamientos son idénticos, se confirma la naturaleza clonal de los genes. Además, las regiones del gen de la cadena variable de inmunoglobulina muestran evidencia de hipermutación somática, lo que revela un origen de célula B de centro germinal (Schwering, 2003, Farrell, 2011). Esto está respaldado por el hallazgo de que en el 25% de los casos de linfoma de Hodgkin clásico, las células de Reed-Sternberg presentan reordenamientos clonales en los genes de inmunoglobulina conmutados, lo que da como resultado genes de inmunoglobulina no funcionales que carecen de la expresión del receptor de células B (BCR) de la superficie celular. En una célula sana, esto debería conducir a la apoptosis; sin embargo, en el linfoma de Hodgkin, estas células parecen ser rescatadas de la apoptosis por eventos oncogénicos adicionales (Momotow, 2021) o por un evento de transformación. Este evento de transformación probablemente sea la infección por el EBV, ya que se demostró mediante la infección in vitro de las células B, que el EBV puede rescatar a las células B deficientes de BCR de la apoptosis y transformarlas en líneas celulares de larga vida. Se cree que este rescate celular se debe a la expresión de LMP2A que imita a BCR (Massini, 2009). Otro argumento a favor del rescate de las células B deficientes en BCR por el EBV es el hecho de

que los casos de linfoma de Hodgkin deficientes en BCR son todos EBV positivos. De forma general, el 40% de los linfomas de Hodgkin muestran asociación con EBV (Massini, 2009).

Además de la supervivencia intracelular continua y la señalización de la proliferación, las células de Hodgkin y Reed-Sternberg requieren un microambiente celular peculiar. De hecho, es ese microambiente el que constituye la mayoría de las lesiones en el linfoma de Hodgkin, mientras que las células de Hodgkin y Reed-Sternberg representan solo un porcentaje pequeño de las células analizadas en la lesión tumoral. Este microambiente consta de linfocitos, eosinófilos, mastocitos, macrófagos y fibroblastos. Los análisis genómicos de las células de Hodgkin y Reed-Sternberg han demostrado que ciertas aberraciones genéticas contribuyen significativamente a su interacción alterada con el microambiente inflamatorio. La presentación reducida del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I o II en la superficie de las células de Hodgkin y Reed-Sternberg, ya sea por regulación a la baja, mutaciones de pérdida de función o translocaciones, alteran la presentación del antígeno. También se ha demostrado que las células de Hodgkin y Reed-Sternberg albergan con frecuencia un mayor número de copias de genes localizados en el cromosoma 9p24.1 que codifica para los ligandos del receptor de muerte programada PDL1 y 2, y esta interacción PLD1/2 se considera un mecanismo relevante en el agotamiento de las células T. Además, la respuesta inmune antitumoral mediada por células NK podría ser inhibida por la expresión aberrante de MICA (moléculas de HLA clase I denominadas no clásicas) en células de Hodgkin y Reed-Sternberg (Momotow, 2021).

A pesar de ser células de origen B, el inmunofenotipo de las células de Reed-Sternberg y de Hodgkin no revelan un origen de célula B; han perdido la expresión de genes típicos del linaje de células B y, en cambio, muestran una fuerte expresión de moléculas de señalización y factores de transcripción de linajes celulares distintos (Massini, 2009). Los marcadores de linaje, como CD20, CD19, CD79 e Ig de superficie, tienden a estar regulados negativamente en estas células (Schwering, 2003). La expresión de PAX5, específico de célula B, está expresado pero en niveles bajos y es útil para diferenciar las células de linfoma de Hodgkin de células de linfomas T. También expresan CD30 y CD15. Aberrantemente, expresan CD3, CD4, granzima B18 y marcadores de células dendríticas como fascin y TARC (Farrell, 2011).

El linfoma de Hodgkin es una de las neoplasias malignas más comunes en la edad adulta joven y es una enfermedad curable en la mayoría de los pacientes. Presenta una distribución bimodal con un primer pico entre la segunda y tercera década de vida, y un segundo pico después de los cincuenta años. El linfoma de Hodgkin EBV positivo es más frecuente en pacientes de edad avanzada, ya que se sospecha una disminución de la inmunidad específica al EBV con el avance de la edad (Vockerodt, 2015).

En cuanto a la diferencia entre sexos, los hombres presentan mayor afectación que las mujeres (Mozaheb, 2013). La epidemiología del linfoma de Hodgkin varía con la edad al momento del inicio clínico. En los países en vías de desarrollo, el trastorno aparece predominantemente durante la infancia y su incidencia disminuye con la edad, mientras que en los países industrializados la tasa de incidencia aumenta con la edad. Se sospecha que el linfoma de Hodgkin tiene un precursor infeccioso y la evidencia ha implicado al EBV como agente causal. La etiología de los casos EBV negativos sigue siendo oscura (Mozaheb, 2013). No todos los subtipos albergan EBV en el mismo grado. La positividad del EBV en el tejido del linfoma se detecta en el 70% de los linfoma de Hodgkin clásico celularidad mixta, en el 95% de los linfomas de Hodgkin depleción linfocítica y en el 10-40% de los linfomas de Hodgkin clásico esclerosis nodular; mientras que el linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico casi siempre es EBV negativo (Massini, 2009). Alrededor del 30-40% de los casos de linfoma de Hodgkin en América del Norte y Europa son EBV positivos, mientras que en otras partes del mundo, como América Latina, Asia y África, el EBV se ha encontrado en casi el 100% de todos los casos de linfoma de Hodgkin (Ayee, 2020). Adicionalmente, se han hecho estudios donde se asocian diferentes tipos de HLA con la resistencia genética a desarrollar la enfermedad (Caporaso, 2009). Por último, la gran mayoría de los casos de linfoma de Hodgkin que surgen en el contexto de la infección por HIV están relacionados patogenéticamente con el EBV, con tasas de positividad para EBV que oscilan entre el 80% y el 100% (Massini, 2009).

Existen marcadas variaciones geográficas en la incidencia del linfoma de Hodgkin, pero son diferentes para varios grupos de edad. También existe una asociación entre el linfoma de Hodgkin y los marcadores de clase social. Se produce una mayor incidencia en los países

occidentales y es menos común en los países asiáticos. Existe evidencia que sugiere que el linfoma de Hodgkin es un complejo de afecciones relacionadas que están mediadas en parte por enfermedades infecciosas, inmunodeficiencias y susceptibilidades genéticas (Mozaheb, 2013).

A pesar de las distintas características epidemiológicas, se desconocen las causas de la enfermedad de Hodgkin. Varios factores parecen favorecer la aparición del linfoma de Hodgkin. Se han descrito unos cuantos polimorfismos en los genes que regulan las funciones inmunológicas que se asocian con un mayor riesgo de desarrollar linfoma de Hodgkin (Momotow, 2021). En los adultos jóvenes, los hallazgos epidemiológicos sugieren que la enfermedad de Hodgkin puede surgir como una respuesta patológica del huésped a una infección común tardía. La infección por el EBV que se manifiesta como mononucleosis infecciosa es una de esas infecciones tardías que se ha asociado con un mayor riesgo de enfermedad de Hodgkin en estudios de cohorte (Hjalgrim, 2000). De hecho, se ha demostrado que las personas con evidencia serológica de infección por EBV tienen de 2,5 a 4 veces más riesgo de desarrollar linfoma de Hodgkin que las personas sin infección por EBV (Mozaheb, 2013). Por ejemplo, hay un importante aumento en el riesgo de linfoma de Hodgkin después de la mononucleosis infecciosa, la manifestación clínica típica de la infección primaria por el EBV en la adolescencia (Hjalgrim, 2003).

A pesar de que el EBV se detecta en un 40% de casos de linfoma de Hodgkin, algunos subtipos rara vez muestran el genoma viral del EBV intracelular. Por lo tanto, una infección por EBV pasada parece ser un mecanismo desencadenante para el desarrollo de linfoma de Hodgkin en algunos pacientes, pero no es suficiente para el desarrollo de linfoma por sí solo (Momotow, 2021).

La sospecha de que el EBV tiene un papel causal en el linfoma de Hodgkin se ve reforzada por la demostración de antígenos del EBV en las células de Reed-Sternberg en el 40% de los pacientes con linfoma de Hodgkin. Este riesgo de linfoma de Hodgkin después de un cuadro de mononucleosis infecciosa aumenta principalmente entre adolescentes y adultos jóvenes. No obstante, acá se ha descrito una discrepancia, ya que el EBV se puede demostrar en células

de Reed-Sternberg en solo un tercio de los pacientes con linfoma de Hodgkin en ese grupo etario. Esta aparente inconsistencia puede deberse al sesgo que surge de una clasificación errónea causada por la similitud entre los síntomas del linfoma de Hodgkin y los de la mononucleosis infecciosa. También es posible que la conexión entre la infección por EBV relacionada con la mononucleosis infecciosa y el linfoma de Hodgkin en adultos jóvenes esté restringida a un subgrupo de linfomas que contienen EBV, o que el virus se pierda de las células de Reed-Sternberg (hipótesis "hit-and-run") (Hjalgrim, 2003).

En un estudio realizado en Dinamarca en el 2003, se investigó el riesgo de desarrollar linfoma de Hodgkin entre personas con antecedentes de mononucleosis infecciosa. Se analizaron dos cohortes de pacientes, unos con seropositividad al EBV y otro grupo con pacientes seronegativos al EBV (prueba de Paul-Bunnell positiva y negativa respectivamente). La prueba de Paul-Bunnell está basada en la detección de anticuerpos heterófilos producidos tras la infección con el EBV. Es el test serológico más específico y sensible para diagnosticar la infección por el EBV. Estas inmunoglobulinas reaccionan de forma cruzada con antígenos presentes en la superficie de los glóbulos rojos. El resultado reportado es la máxima dilución que produce la aglutinación de los eritrocitos al ponerlos en contacto con el suero en estudio. Estos anticuerpos aparecen en el 65% de los pacientes en la primera semana de la enfermedad y en el 85% de los pacientes en la tercera o cuarta semana. Existe la posibilidad de que esta prueba arroje un resultado falso positivo, principalmente en pacientes con leucemia, linfoma y hepatitis viral; pero también puede arrojar falsos negativos en niños muy pequeños o cuando se realiza muy temprano en la enfermedad (Gómez, 2009).

Dentro de los principales resultados que obtuvieron, se vio que en la cohorte con la prueba de Paul-Bunnell negativa, el riesgo relativo de desarrollar linfoma de Hodgkin aumentó durante los primeros dos años post-diagnóstico de mononucleosis infecciosa, siendo un riesgo marcado e inmediato, pero se redujo a un 1% después de dos años. Por el contrario, el riesgo de linfoma de Hodgkin en la cohorte seropositiva siguió aumentando durante dos décadas posteriores a la realización de la prueba inmunológica. Además, se determinó que el riesgo de desarrollar linfoma de Hodgkin posterior a un cuadro de mononucleosis infecciosa era de 2,5 veces mayor en comparación con las personas que no hayan desarrollado

mononucleosis infecciosa. Incluso, debido a que la mononucleosis infecciosa ocurre típicamente en la adolescencia, el riesgo de desarrollar linfoma de Hodgkin en adolescentes, asciende 3,5 veces. Epidemiológicamente, se vio que la exposición temprana al EBV protege contra el desarrollo de mononucleosis infecciosa en la adolescencia, y como consecuencia, protege contra el linfoma de Hodgkin EBV positivo en adultos jóvenes (Hjalgrim, 2003).

Adicionalmente en ese mismo estudio, el diagnóstico de linfoma de Hodgkin se confirmó por biopsia en 33 de 46 pacientes con mononucleosis infecciosa. De estas 33 muestras, el 61% correspondían a linfoma de Hodgkin clásico subtipo escleritis nodular, el 30% correspondían a linfoma de Hodgkin clásico subtipo celularidad mixta y el 9% correspondían a linfoma de Hodgkin de predominio nodular linfocítico. El EBV se demostró en 17 de 32 muestras analizadas, es decir, en un 53% (Hjalgrim, 2003). Como conclusión del estudio, se encontró una asociación causal entre la infección por EBV relacionada con mononucleosis infecciosa y el linfoma de Hodgkin positivo para EBV en adultos jóvenes (Hjalgrim, 2003).

Varios estudios han informado que existe un mayor riesgo de linfoma de Hodgkin poco después de que se diagnostica la mononucleosis infecciosa. Aunque un aumento inmediato del riesgo puede reflejar una progresión rápida de la infección por EBV al linfoma de Hodgkin, es más probable que se deba a las presentaciones clínicas superpuestas de mononucleosis infecciosa y linfoma de Hodgkin. No obstante, se debe tener presente que el riesgo de desarrollar linfoma de Hodgkin posterior a una mononucleosis infecciosa ronda 1 caso por cada 1000 personas, ya que deben estar presentes otros cofactores, que actúan junto con la infección por EBV para que la infección de lugar al linfoma de Hodgkin (Hjalgrim, 2003).

Varios factores se han asociado con mayor riesgo de desarrollar linfoma de Hodgkin asociado al EBV, dentro de los que se encuentran individuos con antecedentes de mononucleosis infecciosa, títulos altos de anticuerpos contra el antígeno de la cápside viral de EBV y la demostración del virus en las células malignas del linfoma. Se ha descrito que las células de Reed-Sternberg y de Hodgkin tienen un rol importante en la activación constante del factor de transcripción anti-apoptótico NF- κ B, el cual es esencial para la supervivencia de las

células de Reed-Sternberg (Farrell, 2011), y de hecho se ha visto que hay una sobreexpresión de NF- κ B en las células de Reed-Sternberg (Massini, 2009).

El factor de transcripción NF- κ B parece jugar un papel importante en el rescate de las células precursoras de Reed-Sternberg. NF- κ B activa la expresión del inhibidor antiapoptótico DISC c-FLIP e induce la expresión de citocinas proinflamatorias. En el linfoma de Hodgkin, el EBV muestra un patrón de expresión génica de latencia II, que incluye la expresión de LMP1, LMP2A y EBNA1. LMP1 imita al receptor CD40 constitutivamente activo, por lo que actúa como un fuerte activador de NF- κ B, y se presume que es el responsable de la expresión constitutiva de NF- κ B en casos de linfomas de Hodgkin con EBV positivo (Massini, 2009). Schmitz y colegas (2009) demostraron que la actividad constitutiva del NF- κ B, en aproximadamente el 50% de los casos de linfoma de Hodgkin clásico EBV positivo, probablemente sea causada por mutaciones inactivadoras en ambos alelos del gen supresor de tumores A20 (TNFAIP3). Las mutaciones inactivadoras de A20 parecen reemplazar el papel transformador y activador de NF- κ B de LMP1 en casos de linfoma de Hodgkin EBV positivos y demuestran el papel esencial del EBV en la patogénesis de estos linfomas (Massini, 2009; Schmitz, 2009). (Ver figura 4).

Investigaciones recientes han demostrado que LMP1 induce en las células B de centro germinal, cambios transcripcionales característicos de las líneas celulares del linfoma de Hodgkin. Por ejemplo aparte de regular a la baja la expresión de genes específicos de células B, como CD79, CD19, CD20, CD22 y BLNK, induce la expresión de ID2, que es un regulador negativo de la diferenciación de células B. Además, la expresión de LMP2A genera regulación negativa global de la transcripción génica necesaria para el desarrollo adecuado de las células B (Portis, 2003). (Ver figura 4).

Las células de Reed-Sternberg y las de Hodgkin emplean varios mecanismos que las hacen capaces de suprimir cualquier microambiente que favorezca la respuesta inmune. Se ha demostrado que las células de Reed-Sternberg producen citocinas inmunosupresoras como IL-10, IL-13 y TGF- β como uno de los elementos de escape inmunológico durante el linfoma de Hodgkin (Grywalska, 2013). (Ver figura 10).

El escape de la apoptosis y la reprogramación transcripcional de las células de Hodgkin y Reed-Sternberg están relacionadas y parecen ser fundamentales para la patogénesis de la enfermedad. Es probable que el EBV desempeñe un papel en la reprogramación y la supervivencia a través de la desregulación de varias redes de señalización y factores de transcripción. Las células de Reed-Sternberg y Hodgkin promueven su propia supervivencia atrayendo un microambiente de apoyo de células inmunes y estromales, y suprimiendo la respuesta inmune local (Farrell, 2011). Por lo tanto, en el linfoma de Hodgkin, las células de Reed-Sternberg probablemente deriven de la célula B pre-apoptótica del centro germinal infectada por el EBV y la expresión de LMP1 y LMP2 podría tener un rol en el rescate de los precursores de las células de Reed-Sternberg de la apoptosis (Beltramino, 2005).

Aunque la morfología, el inmunofenotipo y el perfil de expresión génica de los casos de linfoma de Hodgkin asociados y no asociados al EBV parecen similares, existe evidencia de que la patogénesis molecular de estos dos grupos de casos es distinta. En primer lugar, las mutaciones de genes que codifican para inhibidores de NF- κ B son más comunes en casos de linfoma de Hodgkin EBV negativos, lo que sugiere que estas mutaciones sustituyen la expresión de LMP1. En segundo lugar, las mutaciones de los genes de inmunoglobulina parecen casi exclusivas de los casos asociados con el EBV, lo que indica que el EBV es necesario para rescatar de la apoptosis a las células que albergan estas mutaciones. En tercer lugar, la expresión de múltiples vías de receptores de tirosina quinasa es más frecuente en los casos no asociados al EBV, lo que sugiere que el EBV está reemplazando las señales oncogénicas vitales (Farrell, 2011).

El EBV puede modular la expresión génica celular mediante la inducción de cambios epigenéticos que provocan silenciamiento génico. LMP1 es capaz de inducir la expresión de ADN metiltransferasas DNMT1, 3A y 3B en células infectadas de forma latente (Massini, 2009).

A modo de resumen, se ha sospechado de una etiología infecciosa en el linfoma de Hodgkin y, hasta ahora, el EBV es el único candidato para el agente infeccioso que causa el linfoma.

Hay varias líneas de evidencia que vinculan al EBV con la etiología de algunos linfomas de Hodgkin: la plausibilidad biológica de la transformación de células B mediada por EBV y la presencia de genomas de EBV clonales dentro de las células tumorales de linfoma, lo que implica que la infección ocurrió antes de la transformación maligna; asociaciones epidemiológicas con mononucleosis infecciosa, que representa la infección primaria por EBV sintomática; los perfiles distintivos de títulos de anticuerpos frente al EBV y las cargas virales tanto antes como después del diagnóstico de linfoma de Hodgkin, y las diferentes características demográficas, clínicas y epidemiológicas del linfoma de Hodgkin EBV positivo (Massini, 2009). (Figura 10).

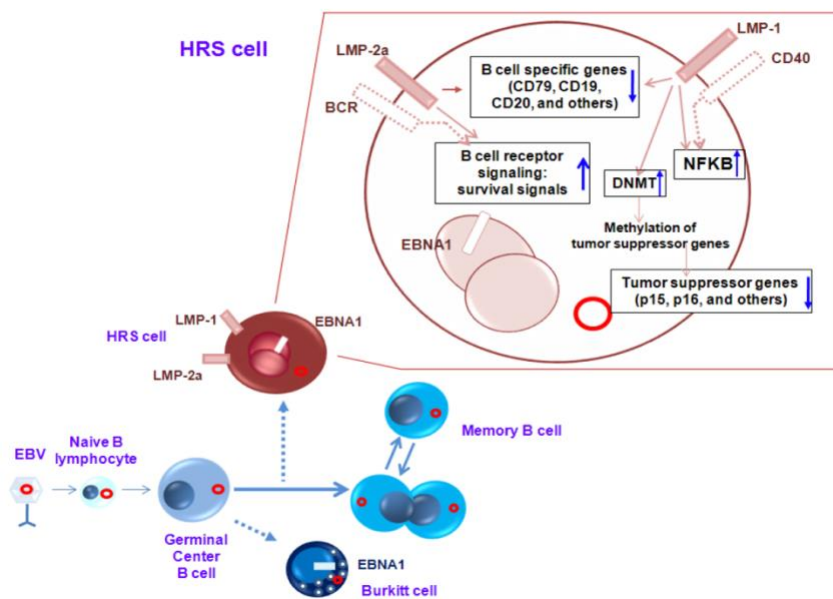


Figura 10. Rol del EBV en la generación del fenotipo anómalo de las células de Reed-Sternberg en el linfoma de Hodgkin. (Tomado de Massini, 2009).

2. Linfoma de Burkitt:

El linfoma de Burkitt ha tenido un papel importante en la comprensión de la tumorigénesis. Fue el primer tumor humano asociado con un virus, uno de los primeros tumores que mostró tener una translocación cromosómica que activa un oncogén y fue el primer linfoma reportado que se asoció con la infección por HIV (Molyneux, 2012).

El linfoma de Burkitt es una neoplasia de células B muy agresiva con una capacidad de duplicación celular de 24 a 48 horas, por lo que es considerado el tumor humano con el crecimiento más rápido (Vindas, 2019). Es el cáncer infantil más común en áreas donde la malaria es holoendémica, es decir, en África ecuatorial, Brasil y Papúa Nueva Guinea. El llamado cinturón de linfoma de Burkitt se extiende a lo largo de África central, donde el clima es cálido y húmedo. Adicionalmente, los mapas epidemiológicos de la malaria y el linfoma de Burkitt se superponen (Molyneux, 2012).

La patogenia de este linfoma se ha relacionado con la infección por EBV desde su aislamiento en líneas celulares derivadas del linfoma de Burkitt. Desde entonces, el EBV ha estado implicado en el 95% de los casos de linfoma de Burkitt en regiones de alto riesgo y menos del 30% en regiones de bajo riesgo (Ayee, 2020).

Según la epidemiología y las observaciones clínicas de la enfermedad, el linfoma de Burkitt se clasifica en tres formas distintas, las cuales son similares tanto en morfología, inmunofenotipo y características genéticas (Molyneux, 2012). El primero es el linfoma de Burkitt endémico, el cual tiene una incidencia anual de 40-50 casos por millón de niños menores de 18 años (Molyneux, 2012) y contribuye con el 50% de todos los cánceres pediátricos en regiones como África Ecuatorial y Papúa Nueva Guinea. Además, en esta misma zona geográfica, el EBV se encuentra en el 95% de todos los casos de linfoma de Burkitt diagnosticados. La edad de presentación de este tipo de linfoma es entre los 5 y los 7 años de edad, los tumores con frecuencia afectan las áreas de la mandíbula (Okano, 2000) y la proporción hombre: mujer es de aproximadamente 2: 1 (Pannone, 2014).

El segundo tipo es el linfoma de Burkitt esporádico, el cual tiene una distribución mundial, pero con una frecuencia mucho menor que el tipo endémico. Se diagnostica principalmente en niños y en adolescentes entre los 3 y los 12 años, y es de 3 a 5 veces más común en hombres que en mujeres. Es el responsable del 30-50% de todas las neoplasias pediátricas y menos del 1% de las neoplasias en adultos que ocurren en Estados Unidos y Europa (Ayee, 2020). Tiene una incidencia estimada de 3 casos por cada millón de personas por año, tanto en niños como en adultos. La incidencia máxima se produce en niños de 11 años. Entre los

adultos, el linfoma de Burkitt esporádico se observa típicamente en pacientes menores de 35 años, con una mediana de edad al momento del diagnóstico de 30 años. La mayoría de los pacientes son hombres con una proporción hombre: mujer de 3 o 4: 1 (Pannone, 2014). La mayoría de estos linfomas se originan en los ganglios linfáticos mesentéricos. El EBV rara vez se asocia con casos de linfoma de Burkitt esporádico en el mundo occidental, abarcando un 15-25% de los casos de linfoma de Burkitt esporádico; sin embargo, en zonas del noreste de Brasil, la frecuencia del EBV en linfoma de Burkitt esporádico supera el 80% de los casos (Okano, 2000).

Por último, el linfoma de Burkitt asociado a inmunodeficiencia se encuentra en portadores del HIV que desarrollan linfoma antes de progresar a fase SIDA. La incidencia de este tipo de linfoma de Burkitt es de 10 a 100 veces mayor que la forma esporádica de la enfermedad y entre el 30% y el 40% de los casos de linfoma de Burkitt asociado a inmunodeficiencia son positivos para el EBV. Se estima que la incidencia en los Estados Unidos es de 22 casos por cada 100 000 personas al año (Molyneux, 2012). El compromiso inmunológico, que se produce como resultado de la infección por HIV, explica la reactivación del EBV a partir de células B infectadas de forma latente y, finalmente, provoca una rápida progresión a linfoma de Burkitt asociado a inmunodeficiencia. Los linfocitos T CD4⁺ preparan a los linfocitos T CD8⁺ contra el EBV circulante en individuos inmunocompetentes y, por lo tanto, ponen al virus bajo vigilancia inmunitaria. Sin embargo, en las personas infectadas por el HIV, el recuento de células T CD4⁺ se reduce drásticamente y se reduce la activación de las células T CD8⁺ en estas personas (Ayee, 2020).

El linfoma de Burkitt es un linfoma particularmente agresivo, cuya marca característica es una translocación cromosómica entre el gen MYC y uno de los loci de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, ya sea el gen de la cadena pesada de inmunoglobulina (IGH) o los genes kappa (IGK) o cadena ligera lambda (IGL). En el 80% de los casos, la translocación t(8; 14) ocurre con el gen IGH. El restante 20% de los casos se divide entre las translocaciones con IGK e IGL (t(2;8) y t(8;22) respectivamente) (Brady, 2007). En los casos endémicos africanos, el punto de ruptura en el cromosoma 14 involucra la región de unión de la cadena pesada y se origina a partir de una hipermutación somática aberrante; mientras que en las

formas esporádicas, la translocación involucra la región de cambio de la cadena pesada (Pannone, 2014). Aunque la translocación de MYC también puede ocurrir en otros cánceres humanos como el linfoma difuso de células B grandes y el mieloma múltiple, no se cree que sea el evento transformador primario en estas enfermedades (Figura 11) (Brady, 2007).

El protooncogén MYC juega un papel crítico en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular de una manera dependiente del contexto o del tipo celular. La expresión de MYC está normalmente bajo estricta regulación durante el ciclo celular, pero una vez que ocurre la translocación, la expresión es constitutiva y desregulada, ya que se pone a c-myc bajo el control de un promotor del gen de inmunoglobulina altamente activo que conduce a la expresión constitutiva de las proteínas c-myc a niveles elevados. La expresión da como resultado un crecimiento celular descontrolado en el linfoma de Burkitt (Allday, 2009). La sobreexpresión de c-myc también conduce a un aumento de la apoptosis y, por lo tanto, los tumores asociados con la desregulación de myc suelen albergar mutaciones adicionales que dan como resultado la inhibición de la apoptosis (Jarrett, 2006).

Un aspecto clave de la función de MYC en las células del linfoma de Burkitt es el fenómeno de la apoptosis inducida por MYC. Si bien MYC impulsa poderosamente la progresión de la fase S en la mayoría de las células somáticas, las células normalmente experimentan apoptosis cuando los niveles de MYC superan un umbral seguro. La sobreexpresión de MYC en las células B provoca la inducción de p53 o ARF, lo que resulta en apoptosis (Brady, 2007).

Otro medio de evadir la apoptosis impulsada por MYC es mediante la mutación de TP53, el gen que codifica p53. Las células que carecen de actividad de p53 y ARF son resistentes a la apoptosis impulsada por MYC. También se ha informado que la quinasa antiapoptótica, PIM-1 es hiperactiva en el linfoma de Burkitt, lo que provoca un aumento de los niveles de MDM2 en estas células, lo que da como resultado la desestabilización de p53. La restauración de la actividad de p53 en líneas celulares del linfoma de Burkitt da como resultado una disminución de la tumorigenicidad. Curiosamente, las células de linfoma de Burkitt con mutaciones inactivadoras de TP53 parecen carecer de mutaciones de MYC, lo que sugiere

que una vez que se han producido mutaciones inactivadoras de TP53, ya no es necesario que se produzcan más lesiones en MYC para bloquear la apoptosis (Hemann, 2005).

En el linfoma de Burkitt endémico, el rol principal del EBV sería favorecer las propiedades proliferativas sobre las propiedades pro-apoptóticas del c-myc, promoviendo la expansión clonal no controlada de las células B y la supervivencia celular. Tanto en el linfoma de Hodgkin como en el linfoma de Burkitt, el evento crítico para la linfomagénesis, podría ser una mutación durante las alteraciones inmunológicas asociadas con la infección aguda por el EBV (Beltramino, 2005).

Varios estudios sugieren un papel causal directo del EBV en el linfoma de Burkitt endémico, debido a varias razones: 1) el EBV está presente de forma constante en estos tumores; 2) la infección de las células B malignas precede a la tumorigénesis; 3) el EBV induce la immortalización de las células B en cultivo; y 4) se registran títulos muy altos de anticuerpos contra el EBV en niños antes del desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, el mecanismo subyacente que vincula la infección por EBV de las células B con la aparición de una neoplasia maligna permanece sin descifrar (Molyneux, 2012).

La expresión de genes del EBV en el linfoma de Burkitt está estrictamente restringida al programa de latencia tipo I, donde solo EBNA1 y EBER se expresan en células positivas para EBV. Aunque el papel del EBV en la patogénesis de este tipo de linfoma aún no está claro, la evidencia ha demostrado que la expresión de EBNA1 promueve la proliferación celular al inhibir la apoptosis, ya que interactúa con proteínas del huésped como la survivina, una proteína anti-apoptótica, y el regulador de p53, USP7 (Frappier, 2012).

Aunque el EBV codifica por varias proteínas latentes esenciales para la immortalización viral de las células B, la proteína EBNA1 es la única proteína latente del EBV expresada de forma constante en los tumores endémicos del linfoma de Burkitt. También se detectan otras transcripciones latentes y líticas de EBV en algunos tumores, pero solo en un subconjunto de células. Se han identificado tumores que contienen una delección del gen EBNA2, lo que conduce a la expresión de los genes EBNA3A, EBNA3B y EBNA3C. Las líneas celulares

derivadas de estos linfomas son resistentes a la apoptosis, lo que sugiere que la pérdida de EBNA2 proporciona una ventaja de supervivencia al tumor. Una función del EBV en el linfoma endémico de Burkitt podría ser bloquear la apoptosis en las células B con una translocación de MYC a través de la proteína EBNA1, la proteína BHRF1, las transcripciones EBER o la modificación epigenética y la posterior represión de la proteína BIM proapoptótica por la transcripción latente LMP1. El EBV también puede promover la inestabilidad genómica, desregular las funciones de los telómeros e inducir daño en el ADN de las células infectadas (Molyneux, 2012).

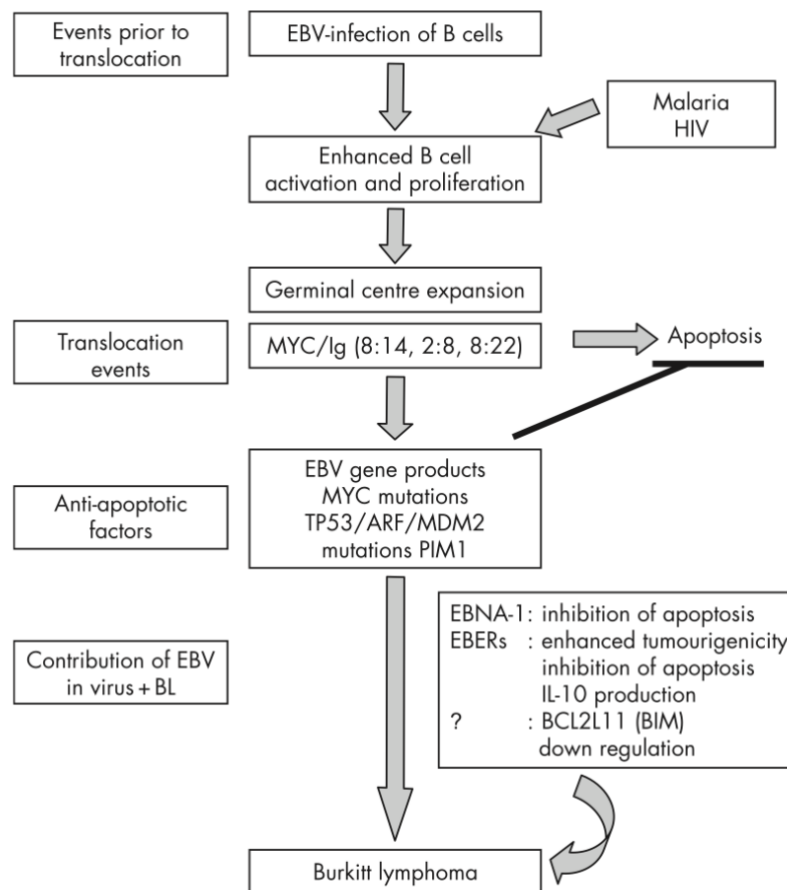


Figura 11. Patogénesis del linfoma de Burkitt. Para que se dé el desarrollo de un linfoma de Burkitt, deben confluir diversos factores, como lo son la infección por EBV, la traslocación en el gen MYC y el gen de las inmunoglobulinas, la inhibición de la apoptosis, mutaciones en TP53 y los efectos anti-apoptóticos de los antígenos nucleares del EBV. (Tomado de Brady, 2007).

Todos los linfomas de Burkitt, independientemente de las variantes o el estado del EBV, son morfológica e inmunofenotípicamente idénticos. El fenotipo de la superficie celular de las células tumorales del linfoma de Burkitt refleja un origen de centro germinal, pero el sitio de crecimiento del tumor es con frecuencia la mandíbula o el ovario, ninguno de los cuales normalmente contiene centro germinal. Sin embargo, las células tumorales han sufrido una hipermutación, una característica de la reacción de centro germinal durante la activación y diferenciación de las células B. Además, el punto de ruptura en el gen de inmunoglobulina al que se transfiere MYC en el linfoma de Burkitt esporádico se produce en la región V(D)J, lo que sugiere que la translocación se produce durante la recombinación V(D)J. Los segmentos J que flanquean los puntos de corte translocados de MYC típicamente exhiben deleciones y/o adiciones de pares de bases característicos del reordenamiento normal del segmento J de Ig V(D). Este es un proceso catalizado por las enzimas activadoras de recombinasa V(D)J específicas de células B RAG-1/2 que se expresan tanto en células pre-B como en células B de centro germinal. Por el contrario, el punto de ruptura cromosómico en linfoma de Burkitt esporádico y linfoma de Burkitt asociado al HIV ocurre con mayor frecuencia en la región de cambio de clase, pero dado que tanto la hipermutación somática como el cambio de clase son eventos que normalmente se limitan a las células B de centro germinal y los marcadores de centroblastos de centro germinal se expresan en las células del linfoma, las células progenitoras de este linfoma muy probablemente surgen de células B sometidas a reordenamientos cromosómicos en el centro germinal (Brady, 2007).

Existe cierta evidencia de que la célula de origen puede ser una célula B de memoria o post-centro germinal que reingresa al centro germinal y puede diferir en tumores EBV positivos y negativos; pero cualquiera que sea la célula de origen, está claro que la participación del centro germinal es fundamental para la patogenia de esta enfermedad tanto en términos de eventos de translocación de MYC como en la contribución de cofactores como el EBV, la malaria o la infección por HIV (Brady, 2007).

El EBV persiste durante toda la vida del huésped sano como una infección latente en las células B de memoria periférica. Si la célula maligna surge de una célula infectada de forma latente y las células B de memoria cíclica expresan solo EBNA1 (similar al linfoma de Burkitt

endémico), la célula B de memoria infectada de forma latente podría ser la fuente de la malignidad (Molyneux, 2012).

El EBV se puede identificar en casi todos los linfomas endémicos de Burkitt, pero se ha reportado con menos frecuencia en los otros tipos, lo que plantea la cuestión de si el EBV es un requisito para la patogenia. La ausencia del EBV en otros tipos de linfoma de Burkitt podría deberse a la pérdida de episomas virales de las células tumorales después de la división celular. El linfoma de Burkitt EBV positivo tiene una frecuencia más alta de mutaciones somáticas en la cadena pesada variable de inmunoglobulina con evidencia de selección de antígeno que la enfermedad EBV negativo. Una posible explicación de este hallazgo es que el linfoma de Burkitt positivo para EBV surge de las células de memoria, mientras que la enfermedad negativa para EBV se origina en una contraparte del centro germinal anterior (Molyneux, 2012).

En África, las pronunciadas variaciones estacionales, temporales y espaciales en la incidencia del linfoma de Burkitt se han relacionado durante mucho tiempo con la prevalencia de la malaria y, en 2008, surgieron pruebas directas de un vínculo entre la malaria, el EBV y el linfoma endémico de Burkitt. Estudios epidemiológicos han demostrado que el riesgo de linfoma de Burkitt es mayor en las personas con títulos altos de anticuerpos tanto contra el EBV como contra *Plasmodium falciparum*. Varios estudios han demostrado que la malaria puede causar una profunda desregulación de la persistencia y la inmunidad del EBV en los niños, por lo que la malaria aumenta el riesgo de linfoma de Burkitt endémico a través de interacciones con células B infectadas con EBV. Por ejemplo, el interdominio rico en cisteína 1 α de la proteína de la membrana de eritrocitos de *P. falciparum* induce la reactivación del EBV (Molyneux, 2012).

Además, *P. falciparum* tiene un ligando para el receptor 9 de tipo toll. Se demostró que la señalización a través del receptor 9 de tipo toll induce la citidina desaminasa por activación enzimática en las células B humanas. La sobreexpresión de esta enzima induce las translocaciones de inmunoglobulina-MYC características del linfoma de Burkitt. Las células B normales sufren apoptosis si MYC se sobre expresa después de una translocación mediada

por citidina desaminasa inducida por activación. Sin embargo, las proteínas latentes del EBV son anti-apoptóticas, lo que podría permitir que las células B toleren la translocación y, en última instancia, den lugar a un clon maligno. En las regiones donde la malaria es endémica, se observó una disminución de las respuestas de las células T citotóxicas específicas del EBV en los niños en la edad de incidencia del linfoma de Burkitt. Los niños con malaria también tienen una pérdida transitoria del control de las células T específicas para el EBV. La malaria probablemente aumenta el riesgo de linfoma de Burkitt endémico al aumentar el número de células B infectadas de forma latente a través de la reactivación viral, provocando la pérdida del control inmunológico de las células B latentemente infectadas; e induciendo la translocación de MYC a través de un mecanismo mediado por la citidina desaminasa inducida por activación (Molyneux, 2012).

El linfoma de Burkitt también ocurre en pacientes infectados por el HIV con un alto número de células T CD4, lo que sugiere que la inmunosupresión no es por sí sola la causa de la malignidad. La estimulación antigénica crónica de las células B, como en la infección por *P. falciparum* o la infección crónica por HIV, podría ser un mecanismo patogénico común del linfoma de Burkitt endémico y del linfoma asociado al HIV. Los pacientes infectados por el HIV con linfoma de Burkitt tienen concentraciones séricas elevadas de CD30 y CD23 solubles (marcadores de activación de células B) antes de la aparición del linfoma. Los pacientes con viremia crónica por HIV, incluso si reciben tratamiento antirretroviral, tienen un mayor riesgo de desarrollar linfomas asociados al HIV que aquellos con cargas virales inconmensurables. El virus puede afectar a las células B a través de la desregulación de la citidina desaminasa inducida por activación y la activación crónica de las células B. La vigilancia inmunitaria deteriorada y la liberación de citocinas desregulada podrían promover la supervivencia de las células B con reordenamientos cromosómicos inducidos por la sobreexpresión de la citidina desaminasa inducida por activación (Molyneux, 2012).

En la figura 12, se representa el modelo del origen del linfoma de Burkitt. En la parte A de la figura 12, se representa que durante la infección por HIV, las células B se estimulan de forma crónica, lo que provoca la activación de la enzima citidina desaminasa inducida por activación (AID). La expresión aberrante de AID puede resultar en una translocación de c-

myc que es el sello distintivo del linfoma de Burkitt. La infección por EBV o las citocinas pueden bloquear la apoptosis y rescatar las células B que sobreexpresan c-myc, lo que lleva a la aparición de un clon maligno. En la parte B de la figura 12, en las regiones donde la transmisión de la malaria es estable, *P. falciparum* puede impulsar la reactivación del EBV a partir de células B infectadas de forma latente, lo que lleva a la liberación de virus y la infección de células B vírgenes. Este proceso finalmente expande el conjunto de células B infectadas de forma latente, lo que aumenta la carga viral periférica y disminuye la inmunidad de las células T. El ADN de *P. falciparum* y la hemozoína funcionan como un ligando del receptor tipo Toll-9 y pueden interactuar directamente con las células B infectadas por el EBV para inducir la enzima AID. La expresión aberrante de AID puede dar como resultado una translocación de c-myc y los genes de latencia del EBV pueden bloquear la apoptosis y rescatar las células B que sobreexpresan c-myc, lo que lleva a la aparición de un clon maligno (Molyneux, 2012).

Es importante tener presente que la función de la enzima AID es promover la hipermutación somática y el cambio de clase durante la activación de las células B en respuesta a la inmunización y la infección. Cuando está en concentraciones altas, promueve mutaciones en el ADN que pueden llevar a la generación de la traslocación entre c-myc y el gen de las inmunoglobulinas. La AID es indispensable en la producción de anticuerpos específicos para agentes infecciosos y facilita la inestabilidad genética que podría llevar al desarrollo de tumores (Vindas, 2019).

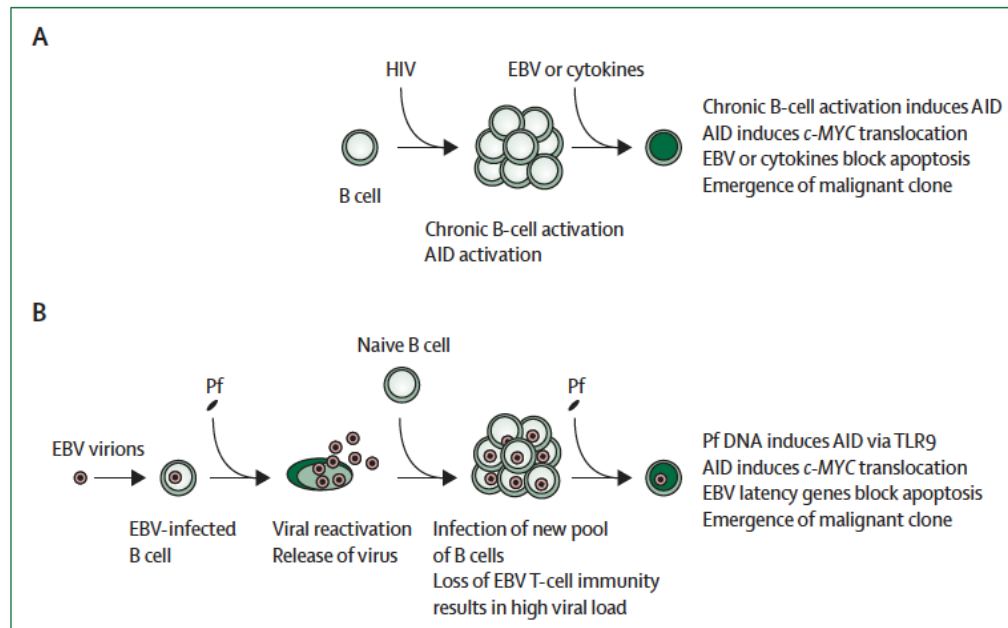


Figura 12. Modelo del origen del linfoma de Burkitt. (Tomado de Molyneux, 2012).

A nivel morfológico, el linfoma de Burkitt es un linfoma no Hodgkin de células B que se caracteriza por células monomórficas de tamaño mediano con una tasa de proliferación muy alta. Las células son de tamaño intermedio y contienen cromatina gruesa y nucléolos basófilos prominentes. Algunas variantes plasmocitoides y atípicas muestran más pleiomorfismo nuclear (Brady, 2007). En las secciones de tejido, por lo general, las células parecen estar moldeadas y el citoplasma es profundamente basófilo con márgenes citoplasmáticos cuadrados. El índice de proliferación es casi del 100%, con un alto recambio mostrado por un aumento de la apoptosis. La apariencia de un "cielo estrellado" se debe a macrófagos cargados de cuerpos dispersos que contienen células tumorales apoptóticas. El inmunofenotipo clásico es CD19, CD22, CD138, CD20, CD38, CD77, CD79a, CD10, Bcl-6 y HGAL positivos, y Bcl-2 negativo. Hay escasez de células T en el fondo (Pannone, 2014). El ARN codificado por el EBV puede identificarse mediante hibridación in situ con fluorescencia (Fujita, 2004).

3. Desórdenes linfoproliferativos postrasplante:

El trastorno linfoproliferativo postrasplante es un tipo de malignidad con complicaciones potencialmente mortales en los receptores de trasplantes de órganos sólidos y de células madre hematopoyéticas. El linfoma se produce como resultado del aumento de la proliferación de células B después del trasplante y es principalmente impulsado por el EBV. El genoma del EBV se ha encontrado en más del 90% de las células B de pacientes con este desorden, ya sea después de la infección primaria o de la reactivación del EBV a partir de células latentes infectadas después del tratamiento con inmunosupresores para evitar el rechazo del aloinjerto (Ayee, 2020).

La enfermedad linfoproliferativa postrasplante es un grupo heterogéneo clínico y patológico de trastornos linfoides que van desde la proliferación policlonal indolente hasta los linfomas agresivos que pueden complicar el trasplante de órganos sólidos o el trasplante de células madre hematopoyéticas (Al-Mansour, 2013). Generalmente ocurren en el contexto de una función de células T inefectiva a causa de la inmunosupresión farmacológica luego del trasplante de órganos (Beltramino, 2005).

Los desórdenes linfoproliferativos postrasplante se pueden clasificar en: a) lesiones no destructivas o tempranas; b) lesiones polimórficas o destructivas; c) lesiones monomórficas o destructivas; y 4) lesiones tipo linfoma de Hodgkin (Marques-Piubelli, 2020) (Ver cuadro 2). Los desórdenes linfoproliferativos postrasplante de inicio temprano se consideran principalmente como linfoproliferaciones inducidas por el EBV que con frecuencia, aunque no siempre, son policlonales u oligoclonales; mientras que la mayoría de los desórdenes linfoproliferativos postrasplante de inicio tardío son neoplasias linfoides monoclonales verdaderas que no están necesariamente asociadas con la infección por EBV (Carbone, 2008).

Cuadro 2. Clasificación de la OMS de los desórdenes linfoproliferativos postrasplante y su porcentaje de asociación con el EBV. (Elaboración propia, tomado de Crombie et al, 2019).

Categoría	Tipo	Status del EBV
Lesiones tempranas o no destructivas	Hiperplasia plasmacítica	Casi 100%
	Desorden linfoproliferativo postrasplante similar a Mononucleosis infecciosa	
	Hiperplasia florida	
Lesiones polimórficas o destructivas	Proliferaciones monoclonales o policlonales	>90%
Lesiones monomórficas o destructivas	Linfomas no Hodgkin monoclonales como: linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Burkitt, mieloma, linfoma de células T.	Pueden ser EBV positivos o negativos.
Linfoma de Hodgkin (destrutivo)	Monoclonal	>90%

Las líneas celulares involucradas son diversas. La mayoría de los desórdenes linfoproliferativos postrasplante (cerca del 90%) son de origen de células B, pero también pueden ser de origen de células T o de células nulas (incluidas las células asesinas naturales, las células citotóxicas dependientes de antígenos y las células asesinas activadas por linfocinas) en una cantidad considerablemente menor (Dharnidharka, 2016).

La incidencia del trastorno linfoproliferativo postrasplante en el trasplante de células madre sin depleción de linfocitos T es de 0,5-1%, mientras que el riesgo aumenta de 50-120% en los receptores de órganos sólidos en comparación con la población general. La incidencia varía ampliamente dependiendo del órgano trasplantado, el estatus serológico para el EBV en el donante y el receptor y los tratamientos utilizados para lograr la inmunosupresión (Beltramino, 2005).

El riesgo más alto de desarrollar un desorden linfoproliferativo postrasplante relacionado con órganos sólidos ocurre entre las personas con trasplante de corazón, pulmón, intestino y múltiples órganos, alcanzando un riesgo absoluto del 25% en algunas ocasiones, mientras que el riesgo es menor (1-5%) en los receptores de trasplante renal y hepático. Para los receptores de trasplantes de células madre hematopoyéticas, un factor de riesgo importante es el agotamiento de las células T de la médula ósea del donante. Otros factores de riesgo importantes incluyen la serología por EBV, el grado de enfermedad de injerto contra huésped y la edad mayor de 50 años. Los factores genéticos incluyen polimorfismos en genes de citocinas como los de la IL-10, la IL-6 e interferón-gamma, así como los haplotipos de HLA del donante y del receptor (Marques-Piubelli, 2020).

Dada la importancia de los linfocitos T citotóxicos en el control de la infección por EBV, no es sorprendente que los linfomas asociados a EBV surjan en individuos con respuestas de células T comprometidas. Las enfermedades linfoproliferativas asociadas con el EBV ocurren en individuos con inmunosupresión primaria, adquirida o iatrogénica (Jarrett, 2006).

El mecanismo por el cual se cree que el EBV contribuye a la patogénesis de los desórdenes linfoproliferativos postrasplante es similar a su presunta función en el linfoma de Hodgkin. Debido a que aproximadamente el 50% de los casos de este trastorno se derivan de células B de centro germinal que carecen de un BCR funcional debido a mutaciones incapacitantes, y debido a que estas células logran escapar de la apoptosis a pesar de carecer de afinidad antigénica, se cree que el EBV ayuda a rescatar a estas células de un inminente programa de muerte celular. Como en los casos de linfoma de Hodgkin, LMP1 y LMP2A pueden reemplazar las señales de supervivencia inducidas por los receptores CD40 y BCR activados y también activar la vía de señalización NF- κ B, induciendo la proliferación de células neoplásicas. También se cree que la disminución de la vigilancia de células T citotóxicas debido a la inmunosupresión de estos pacientes facilita las acciones del EBV (Rezk, 2007).

La identificación de los pacientes con riesgo de desarrollar un desorden linfoproliferativo postrasplante es importante, ya que existe un beneficio claro del diagnóstico y el tratamiento

tempranos, y varias estrategias pueden ser útiles como intervenciones preventivas. Con este fin, la monitorización cuantitativa de la carga viral dirigida a las personas en riesgo ha sido una estrategia razonable para identificar una enfermedad positiva para el EBV inminente (Stojanova, 2011).

Los receptores seronegativos al EBV que reciben un órgano de un donante seropositivo al EBV tienen el mayor riesgo de desarrollar un desorden linfoproliferativo postrasplante. El período de mayor riesgo es el postrasplante temprano (generalmente el primer año), probablemente coincidiendo con la infección primaria. Esto concuerda con el hallazgo de que el EBV se detecta en la mayoría de los desórdenes linfoproliferativos postrasplante de células B tempranas, mientras que más del 50% de los desórdenes linfoproliferativos postrasplante tardíos pueden ser negativos para el EBV. La alta incidencia de estos desórdenes en los receptores pediátricos se debe en gran medida a la mayor proporción de receptores seronegativos al EBV (Stojanova, 2011).

La mayoría de los desórdenes linfoproliferativos postrasplante positivos para EBV exhiben una expresión génica compatible con la latencia de tipo III, aunque se ha descrito una imagen mixta que incluye los otros estados de latencia y, en ocasiones, la expresión génica lítica. Estas células pueden estar en varias etapas de su desarrollo, pero con mayor frecuencia son de origen en centro germinal y post centro germinal. La expresión de LMP1 influye en el crecimiento y la supervivencia de las células infectadas mediante varios mecanismos distintos. Uno es la participación de procesos intracelulares que finalmente dan como resultado la expresión de citocinas que pueden servir como factores de crecimiento o inhibidores del reconocimiento inmunológico o funciones efectoras. Además, tiene un papel en la regulación positiva de proteínas anti-apoptóticas intracelulares como BCL-2 y A20. Finalmente, LMP1 y otras proteínas de latencia pueden interferir con estímulos de apoptosis extracelulares específicos activando la señalización de supervivencia interna. Esto es de particular importancia en el rescate de células B infectadas post-centro germinal que carecen de un receptor de células B funcional (aproximadamente el 50% de los casos) que de otra manera están comprometidas a morir (Stojanova, 2011).

Los desórdenes linfoproliferativos postrasplante son heterogéneos en cuanto a su derivación celular. Algunos casos muestran hipermutación somática continua durante la expansión clonal, mientras que otros casos tienen mutaciones en los genes de la región variable de las cadenas de inmunoglobulinas. Lo anterior indica que ocurren pasos importantes de transformación maligna en las células B del centro germinal (Beltramino, 2005).

Los desórdenes linfoproliferativos postrasplante pueden iniciarse cuando una célula B, distinta de la célula B virgen del anillo linfático de Waldeyer, se infecta y expresa el programa de crecimiento. Estas células no pueden salir del programa de crecimiento y continúan proliferando debido a la ausencia de una inmunidad T efectiva. Este mecanismo podría explicar la heterogeneidad de la enfermedad (Thorley, 2004). Su desarrollo es probablemente un proceso con múltiples pasos. A la inmunosupresión iatrogénica que facilita la infección primaria por el EBV o la reactivación de una infección por el EBV latente, le sigue una expansión policlonal de células B con una ventaja proliferativa selectiva (Beltramino, 2005).

El origen del EBV en pacientes con desórdenes linfoproliferativos postrasplante es variado. En los receptores de órganos sólidos, las células del desorden linfoproliferativo se originan típicamente en el receptor, sugiriendo que la infección por el EBV representa la reactivación de un virus previamente quiescente. Frecuentemente en receptores de órganos sólidos, el linfoma se presenta en el órgano donado y cuando este no es el caso, comúnmente la presentación es extranodal (Beltramino, 2005).

Por su parte, en la mayoría de casos de desórdenes linfoproliferativos postrasplante asociado a trasplante de células madre hematopoyéticas, se cree que la linfoproliferación deriva del donante, debido a que el sistema linfoide del huésped ha sido erradicado por el régimen condicionante, el cual a menudo incluye irradiación corporal total. La infección primaria por el EBV también puede originar un desorden linfoproliferativo postrasplante, aunque esto es más común en niños debido a la prevalencia de la infección previa con el EBV en adultos (Beltramino, 2005).

Varias investigaciones han demostrado que la magnitud del riesgo de desarrollar un desorden linfoproliferativo postrasplante asociado al EBV depende del método de depleción

linfocitaria utilizado. Los métodos de depleción tanto de linfocitos B como de T generalmente presentan menor incidencia de linfoma que las técnicas que deplecionan selectivamente células T (Jutta, 2001).

Históricamente, las tasas de mortalidad en trasplante de órganos sólidos es del 50 al 70% y hasta del 70 al 90% en el trasplante de células madre, aunque datos recientes sugieren que los resultados han mejorado significativamente (Al-Mansour, 2013). Los pacientes con desórdenes linfoproliferativos postrasplante pueden tener una presentación clínica variada, según el órgano y el grado de afectación. Los síntomas B y los sitios extraganglionares son comunes, incluyendo varias localizaciones: tracto gastrointestinal, sistema nervioso central, piel, pulmones, riñón y médula ósea. La aparición precoz está relacionada con el estado EBV positivo y es más frecuente en los receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas, con una mediana de tiempo de 2 a 6 meses después del trasplante. El inicio tardío es más frecuente con el estado EBV negativo (Marques-Piubelli, 2020).

El tratamiento está guiado por la naturaleza patológica de las lesiones, así como por las manifestaciones clínico-patológicas de los desórdenes linfoproliferativos postrasplante. El tratamiento generalmente incluye un enfoque de tres pasos: reducción de la inmunosupresión, rituximab como agente único y rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (R-CHOP). El pronóstico es variable, generalmente es excelente en las lesiones tempranas, es variable en los desórdenes linfoproliferativos postrasplante polimórficos y pobre en la mayoría de los desórdenes linfoproliferativos postrasplante monomórficos (Marques-Piubelli, 2020).

Una característica notable es la participación frecuente del EBV. La reducción de la inmunosupresión es a menudo el primer enfoque de tratamiento, con el objetivo de restaurar la funcionalidad en los linfocitos T citotóxicos específicos del EBV. Sin embargo, para la mayoría de los casos son necesarias modalidades de tratamiento adicionales y típicamente incluyen antivirales, radioterapia, quimioterapia, cirugía y el Rituximab para tumores CD20 positivos (Stojanova, 2011).

El uso de fármacos inmunosupresores después del trasplante de órganos reduce el número y la función de las células T para influir en el éxito del trasplante. El uso del inmunosupresor conduce al agotamiento de las células T específicas de EBV y la interrupción del equilibrio entre el sistema inmunológico y el virus latente y, como consecuencia, hay una reactivación del EBV. El deterioro de la vigilancia inmunitaria mediada por células T específicas del EBV da como resultado un blastocito linfoproliferativo no controlado, que finalmente causa el desorden linfoproliferativo postrasplante en los receptores de trasplantes (Stojanova, 2011).

Debido a que la gran mayoría de los desórdenes linfoproliferativos postrasplante que ocurren en pacientes que reciben un trasplante son el resultado de una infección o reactivación del EBV que sigue al deterioro del sistema inmunológico, se recomienda la modulación del tratamiento inmunosupresor como primera línea de tratamiento. Este enfoque induce a la regresión del tumor en el 25-50% de los pacientes. Actualmente, muchos médicos aplican la modulación de la inmunosupresión en pacientes con una carga viral elevada de EBV para prevenir la aparición de este desorden linfoproliferativo (Carbone, 2008).

El tratamiento de los pacientes que no logran reducir la inmunosupresión es complejo y controversial. La quimioterapia y los anticuerpos monoclonales son las opciones terapéuticas que se ofrecen con mayor frecuencia. El uso de rituximab ha cambiado significativamente el enfoque terapéutico de los desórdenes linfoproliferativos postrasplante, ya que la administración del anticuerpo es bien tolerada e induce rápidamente el agotamiento de los linfocitos B maduros en la sangre periférica, reduciendo así el compartimento de las células infectadas por el EBV, con una normalización de la carga viral plasmática (Carbone, 2008).

La quimioterapia sigue siendo la única opción para muchos pacientes con un desorden linfoproliferativo postrasplante agresivo. Aún se desconoce cuál es el mejor momento y el mejor programa de quimioterapia para estos pacientes. La quimioterapia de dosis baja se ha utilizado de forma prospectiva para reducir la morbilidad y la mortalidad asociadas con los protocolos estándar. Aunque este enfoque reduce significativamente las toxicidades, también se asocia con una alta tasa de recaída, lo que sugiere que los regímenes de quimioterapia más

convencionales están indicados en pacientes con un desorden linfoproliferativo postrasplante agresivo (Carbone, 2008).

También se ha estudiado la posibilidad de utilizar la inmunoterapia celular en pacientes con un desorden linfoproliferativo postrasplante asociado al EBV. La transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicos específicos de EBV derivados de donantes ha tenido éxito cuando se utiliza como profilaxis y tratamiento de estos desórdenes relacionados con EBV en el contexto del trasplante alogénico de células madre. De manera análoga, la transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicos específicos del EBV puede ayudar a restablecer el equilibrio del compartimento inmunológico en pacientes que reciben un trasplante de órganos sólido, evitando al mismo tiempo el riesgo de rechazo del injerto que se asocia frecuentemente con la retirada de la inmunosupresión. Las principales limitaciones para la aplicación extensiva de terapias de linfocitos T citotóxicos en estos pacientes son el costo y el tiempo requerido para la generación de la línea celular. Los desórdenes linfoproliferativos postrasplante pueden ser muy agresivos y rápidamente fatales, mientras que la generación de líneas autólogas de linfocitos T citotóxicos EBV específicos requiere varias semanas (Carbone, 2008).

Los desórdenes linfoproliferativos postrasplante se han asociado tradicionalmente con malos resultados en la supervivencia del paciente, aunque las tasas de supervivencia han mejorado con la incorporación de la terapia temprana basada en rituximab. Si bien es cierto la presentación de la enfermedad es heterogénea, con frecuencia se diagnostica a los pacientes en estadio avanzado con afectación extraganglionar. Por ejemplo, en un estudio realizado, el 72% de los pacientes fueron diagnosticados con enfermedad de Ann Arbor en estadio III/IV y el 78% de los pacientes presentaban uno o más sitios extraganglionares de la enfermedad. También se ha demostrado que la afectación del Sistema Nervioso Central y de la médula ósea, así como la hipoalbuminemia, tienen valor pronóstico. Además, la edad avanzada, creatinina elevada, DHL elevada, el linfoma diseminado, la invasión de las membranas serosas, el desorden linfoproliferativo monomórfico y el desorden linfoproliferativo de células T son indicadores pronósticos independientes de mala respuesta (Crombie, 2019).

El EBV tiene una capacidad única para evadir la respuesta inmune del huésped y existe de forma latente dentro de los linfocitos B del huésped. Las deficiencias en la inmunidad celular, que ocurren en el contexto de infecciones concurrentes, la vejez, el trasplante de órganos sólidos y de células madre hematopoyéticas, y las terapias inmunosupresoras, dan como resultado un riesgo particularmente alto de reactivación del EBV y transformación de células B. Los trastornos linfoproliferativos asociados al EBV tienen presentaciones heterogéneas con respuestas variables al tratamiento. Se requieren más investigaciones en tratamientos novedosos como las terapias inmunitarias y en seguir estudiando la biología del EBV para mejorar la sobrevida y el pronóstico de los pacientes con enfermedades linfoproliferativas asociadas al EBV (Crombie, 2019).

Capítulo 4. Efecto de la infección por el virus del Epstein-Barr en el pronóstico del linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt y de los desórdenes linfoproliferativos postrasplante

En huéspedes sanos, el sistema inmunológico obliga al EBV a entrar en el destino de “latencia verdadera” (latencia 0) donde el virus se esconde dentro del núcleo de linfocitos sin manifestar ningún síntoma. El virus en "latencia verdadera" no es patógeno ni visible para el sistema inmunológico del huésped debido a la falta de producción de proteína viral. Pero antes del establecimiento de la "latencia verdadera" final, el virus pasa por varios programas de latencia diferentes, denominados latencia III, II y I, que expresan selectivamente varias de las nueve proteínas latentes virales, así como ARN no codificantes (EBER, BARF0 y miARN) y se asocian con la oncogénesis del EBV. La infección latente persistente también se caracteriza por un número estable de células B infectadas en la sangre y por la propagación constante del virus en la saliva. El sistema inmunológico del huésped vigila continuamente el virus en caso de infección persistente. Sin embargo, en estado de latencia es invisible para el sistema inmunológico del huésped, ya que estas células B de larga vida están inactivas y expresan menos proteínas, y no expresan ninguna proteína viral antes de su división ocasional, durante la cual solo EBNA1, que no es reconocida por los linfocitos T citotóxicos, se expresa (Ning, 2011).

Además de infectar de forma latente a los linfocitos e infectar de forma productiva las células epiteliales, el EBV también infecta las células dendríticas foliculares, las células mononucleares, las células plasmáticas y las células del músculo liso. Sin embargo, en los portadores sanos, el EBV parece albergarse exclusivamente en los linfocitos B. La infección in vitro de células B conduce a la activación y proliferación celular, así como al crecimiento de líneas celulares linfoblastoides transformadas (Ning, 2011).

La reactivación de la latencia en respuesta a una señal específica requiere la replicación del ADN genómico viral y la síntesis de proteínas virales específicas para empaquetar el ADN recién replicado en viriones infecciosos. Dos factores de transcripción inmediatos, BZLF1 y BRLF1, son responsables de la expresión de estas proteínas de empaque. El EBV expresa un repertorio completo de más de 80 proteínas líticas durante el período de replicación. En hospedadores sanos, el programa de replicación debe ser transitorio, rápido y relativamente

raro para minimizar las posibilidades de que el sistema inmunológico del hospedador lo apague. Por otro lado, el virus ha desarrollado estrategias para eludir la respuesta inmune para la generación exitosa de progenie viral (Ning, 2011). El sistema inmunológico del huésped juega un papel fundamental en las infecciones tanto líticas como latentes. Actualmente se considera que una delicada modulación entre el sistema inmunológico del huésped, la expresión génica estrictamente controlada durante distintos programas de latencia viral y la replicación limitada permiten que el EBV persista en los huéspedes inmunocompetentes sin causar mucho daño (Ning, 2011).

Las características clínicas y patológicas del linfoma de Hodgkin clásico reflejan una respuesta inmune anormal que se cree que se debe a la elaboración de una variedad de citocinas por las células malignas de Reed-Sternberg o los tejidos circundantes. La mayoría de los casos de linfoma de Hodgkin clásico se caracterizan por la expresión de miembros de la familia del receptor del Factor de Necrosis Tumoral y sus ligandos, así como por una producción desequilibrada de citocinas y quimiocinas tipo Th2 (Massini, 2009).

La producción de citocinas juega un papel fundamental en la inmunopatogénesis del linfoma de Hodgkin, ya que estos factores pueden actuar como factores de crecimiento autocrino o como factores que inician y mantienen el infiltrado reactivo. Además, las citocinas producidas por las células circundantes del microambiente pueden contribuir a estimular la supervivencia y la proliferación de las células de Reed-Sternberg (Massini, 2009).

La presencia del EBV puede alterar la expresión de citocinas y quimiocinas. De hecho, el EBV favorece una reacción Th1 en el microambiente del linfoma de Hodgkin. La expresión de IL-2, que es responsable de la diferenciación de células Th1, y las quimiocinas que apoyan una respuesta Th1 se expresan en niveles más altos en los casos de linfoma de Hodgkin EBV positivos que en los casos de linfoma de Hodgkin EBV negativos. Como consecuencia, las células T CD8⁺ son más numerosas en el infiltrado reactivo de los casos EBV positivos. Sin embargo, este intento de una respuesta inmune mediada por células en los casos de linfoma de Hodgkin EBV positivos parece ser ineficaz, porque existe una supresión local de las células T citotóxicas que se dirigen específicamente contra los antígenos del EBV. Esta

supresión puede deberse a la presencia de la IL-10, una citocina anti-inflamatoria producida con frecuencia por las células de Reed-Sternberg en los casos de linfoma de Hodgkin clásico asociados al EBV. LMP1 puede inducir la expresión de IL-10 en las células EBV+ (Massini, 2009). Algunos estudios han demostrado un aumento tanto de la IL-6 como del CCL20, una quimioquina capaz de atraer células Treg, en el microambiente de los linfomas de Hodgkin EBV positivos. Otra citocina cuya expresión aumenta en los tumores EBV positivos es la autotaxina, la cual es un factor de motilidad autocrina con actividad lisofosfolipasa-D que genera ácido lisofosfatídico que mejora el crecimiento y la supervivencia de las células del linfoma de Hodgkin (Massini, 2009).

El impacto del estado del EBV de las células tumorales en el pronóstico de los pacientes con linfoma de Hodgkin sigue siendo controversial. Algunas de las variaciones entre estudios pueden atribuirse a las diferentes características epidemiológicas de la enfermedad en diferentes entornos geográficos (Massini, 2009). La determinación del EBV como marcador pronóstico para el linfoma de Hodgkin podría informar sobre la biología y la progresión de la enfermedad, y podría influir en las decisiones de tratamiento (Keegan, 2005).

En los adultos jóvenes, parece haber una ventaja pronóstica marginal cuando los pacientes portan el genoma del EBV en su tumor. Sin embargo, entre los pacientes de más de 50 años, la positividad del EBV se asoció con un resultado significativamente peor. En niños menores de 15 años, algunos estudios sugirieron que la presencia de EBV se asoció con una supervivencia favorable, mientras que otros sugirieron un impacto negativo de la positividad al EBV en el resultado. Por tanto, la influencia del EBV sobre la supervivencia en el linfoma de Hodgkin podría reflejar diferencias en la capacidad oncogénica del virus o en la respuesta inmune. La presencia de EBV puede reflejar un estado inmunológico deficiente, lo que a su vez significa que los pacientes podrían no tolerar la enfermedad y el tratamiento (Massini, 2009).

El EBV activa a las células B con infección latente e induce su transformación a blastos proliferantes para convertirlas en células B de memoria de larga sobrevivencia. Este mecanismo tiene importancia en la patogénesis de las enfermedades asociadas al EBV. Por un lado, la

activación de células recientemente infectadas es peligrosa tanto para el huésped como para el virus, por el riesgo de desarrollar una enfermedad neoplásica potencialmente fatal que limitará el tiempo en que el virus pueda diseminarse a otros huéspedes; pero, por otro lado, el virus se asegura que los linfoblastos proliferantes tengan corta sobrevida. El riesgo para el huésped surge si el EBV infecta a una célula B bajo condiciones en las cuales la célula infectada no puede salir del ciclo celular, quedando bloqueada su maduración en el estadio de centro germinal, determinando la expresión constitutiva de los genes del programa de latencia tipo II, o si las células de memoria accidentalmente expresan los genes del programa de crecimiento. Ambas situaciones podrían llevar al crecimiento desregulado y al desarrollo de tumores. Lo anterior se evita porque el EBV tiene la propiedad de conservar los blancos virales que las células T citotóxicas reconocen en los linfoblastos infectados. Por lo tanto el EBV en los linfoblastos proliferantes es un blanco seguro de la respuesta inmune, lo que garantiza que los linfoblastos que expresan el programa de crecimiento pero que no pueden diferenciarse y salir del ciclo celular serán destruidos (Beltramino, 2005).

Diversos estudios han investigado el impacto de la infección por EBV en los resultados de los pacientes con linfoma de Hodgkin pero han brindado resultados contradictorios. Algunos estudios han informado que la infección por EBV tiene un pronóstico favorable, otros han reportado que la infección viral es un factor de mal pronóstico y otros no han mostrado diferencias estadísticamente significativas. Estos datos contradictorios se han atribuido generalmente a la naturaleza heterogénea de la enfermedad, a las diferencias en los métodos de selección de pacientes para el estudio, método de detección del EBV, edad de los participantes, regímenes de tratamiento, pero también pueden reflejar diferencias raciales o étnicas dado que la presencia del EBV varía mucho entre la población (Myriam, 2017).

En un estudio realizado en Colombia en el 2004, se analizaron 67 ganglios linfáticos de pacientes con diagnóstico confirmado de linfoma de Hodgkin con el objetivo de buscar la presencia del EBV por medio de la hibridación in situ para la detección de transcritos de ARN viral e inmunohistoquímica para la detección de la proteína oncogénica LMP1. En el 67% de los casos se detectaron transcritos del EBV y la proteína LMP1 se detectó en el 56,7% de los casos en la célula de Reed-Sternberg. Se determinó que los pacientes positivos para el

EBV mostraron mejor respuesta al tratamiento, reflejada en una menor tendencia a presentar recaídas. Es decir, determinaron que existe una asociación significativa entre la detección del EBV en el tumor y la supervivencia libre de enfermedad. A 60 meses, la supervivencia libre de enfermedad fue del 93,5% para los pacientes positivos para EBER y del 91,8% para los pacientes positivos para LMP1, mientras que para los pacientes negativos para EBER fue del 56% y para los negativos para LMP1 fue del 50%. Esta asociación fue independiente del tipo de tratamiento que recibieron los pacientes. Como conclusión, los resultados que obtuvieron sugieren un valor pronóstico favorable de la presencia del EBV en las células tumorales del linfoma de Hodgkin (Quijano, 2004).

Quijano et al (2004) mencionan que los resultados obtenidos podrían sugerir que las células tumorales positivas para el EBV son más sensibles a sufrir apoptosis inducida por la quimioterapia o que las células residuales LMP1 positivas podrían ser blancos adecuados de la respuesta de linfocitos T citotóxicos específicos del EBV y de células presentadores de antígenos como las células dendríticas y macrófagos; lo cual conduciría a su vez, a la estimulación de linfocitos T para activación, diferenciación, proliferación y vigilancia epidemiológica contra células remanentes positivas para el EBV, lo que conlleva menor probabilidad de que los pacientes presenten recaídas después del tratamiento.

En otro estudio realizado en el 2000 en niños de Sudáfrica con linfoma de Hodgkin, se determinó que los pacientes EBV positivos presentaron síntomas menos agresivos al momento del diagnóstico y tuvieron una mediana de supervivencia significativamente más larga que los pacientes EBV negativos. Incluso, mencionan que el EBV parece estar asociado con un curso más favorable del linfoma de Hodgkin, con un número significativamente menor de pacientes positivos al EBV que tienen síntomas B o mueren a causa de la enfermedad; por lo tanto, concluyen que la presencia del EBV y la oncoproteína LMP1 son indicadores de pronóstico favorable en pacientes con linfoma de Hodgkin (Engel, 2000).

Se sabe que el estado del EBV es un biomarcador de pronóstico para el curso clínico del linfoma, pero la mejor detección del estado del EBV aún es incierta. En un estudio realizado por Wang et al (2016), se investigó el estado del EBV entre diferentes tipos de linfoma y se

evaluó el valor pronóstico de diferentes técnicas de detección del EBV. En dicho estudio, se demostró que la tasa de supervivencia general de los pacientes con linfoma de Hodgkin está estrechamente relacionada con expresión de EBER o LMP1 o carga viral del EBV en plasma. Para el linfoma de Hodgkin, entre los 34 casos positivos de linfoma de Hodgkin, a 8 se les realizó hibridación in situ para detección de EBER y 7 de ellos fueron positivos y a 16 casos se les realizó inmunohistoquímica para la detección de LMP1 y 11 dieron positivo. Por último, la tasa de positividad para la carga viral del EBV en sangre periférica fue del 35% del total de casos de linfoma de Hodgkin.

En este mismo estudio se determinó que el grupo con carga viral de EBV positiva en sangre periférica tuvo peores índices de pronóstico internacional y peores resultados con el tratamiento inicial. Además, el grupo con carga viral positiva mostró un curso clínico de deterioro evidente. Por último, mencionan que se ha aceptado la hipótesis de que el ADN del EBV en plasma se debe a la liberación tumoral de fragmentos del EBV y su carga viral está influenciada por la carga tumoral (Wang, 2016).

En un estudio realizado por Myriam et al (2017) en Túnez, se analizaron 131 muestras de linfoma de Hodgkin clásico en búsqueda de evidencia de infección por EBV. El análisis de hibridación in situ dio señales positivas en los núcleos de las células de Reed-Sternberg en 62 de los 131 casos de linfoma de Hodgkin, es decir, en el 47, 3% de las muestras analizadas. Con respecto a los resultados epidemiológicos, la infección por EBV se asoció con pacientes menores de 15 años y mayores de 45 años y con predominio en el género masculino. Con respecto a los resultados obtenidos por este grupo de investigación, muestran que los casos de linfoma de Hodgkin EBV positivos tuvieron una supervivencia general ligeramente inferior en comparación con los casos EBV negativos, pero la diferencia no alcanzó el nivel de significancia estadística. Las tasas de supervivencia general a los 5 años fueron de 77% y 88% en los grupos de linfoma de Hodgkin EBV positivos y EBV negativos, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en la supervivencia libre de eventos de los pacientes según el estado del EBV. Las tasas de supervivencia sin complicaciones a 5 años fueron del 56% y del 61% en los grupos EBV positivo y EBV negativo, respectivamente.

En este estudio, se determinó que algunos factores pronósticos desfavorables, como por ejemplo edad mayor a 45 años, un estadio clínico avanzado y el subtipo histológico de linfoma de Hodgkin clásico celularidad mixta, se observaron con mayor frecuencia en el linfoma de Hodgkin EBV positivo, mientras que otros factores pronósticos como leucocitosis y presencia de masa mediastínica voluminosa fueron encontrados con más frecuencia en casos EBV negativos (Myriam, 2017).

Además, en este estudio, la estratificación del linfoma de Hodgkin según el sexo y los subgrupos de edad no mostró una diferencia significativa en términos de supervivencia general y libre de eventos, entre los casos de linfoma de Hodgkin EBV positivos y negativos (Myriam, 2017). A diferencia de lo reportado por Jarrett et al (2005), quienes informaron que en los pacientes con linfoma de Hodgkin cuyas edades oscilan los 16 y 34 años, la positividad al EBV permitió cierta ventaja de supervivencia en comparación con los resultados de los pacientes negativos al EBV, pero no se observó una correlación significativa. También, Glavina-Durdov et al (2001), reportaron que la presencia del EBV mejoraba la supervivencia libre de enfermedad entre los pacientes con linfoma de Hodgkin menores a 35 años. Otros estudios que han analizado el impacto de la infección por EBV en la supervivencia de pacientes ancianos con linfoma de Hodgkin han descrito peores resultados de supervivencia en pacientes EBV positivos en comparación con pacientes EBV negativos (Myriam, 2017).

En otro estudio realizado por Kwon et al (2006), determinaron el efecto de la presencia del EBV en la evolución clínica de los pacientes con linfoma de Hodgkin. Para el estudio, analizaron biopsias de 56 pacientes con diagnóstico de linfoma de Hodgkin y a todos les realizaron hibridación in situ para la detección de EBER e inmunohistoquímica para la detección de LMP1. La infección por EBV fue identificada en el 41,1% de los casos por hibridación in situ, el 26,8% de los casos dieron positivo para LMP1 y el 26,8% dio positivo tanto para LMP1 como para EBER. La positividad para EBER se observó con mayor frecuencia para el subtipo de linfoma de Hodgkin celularidad mixta y en etapas avanzadas de la enfermedad, y en todos los pacientes, parecía haber una tendencia hacia una peor supervivencia cuando EBER estaba positivo, pero sin significación estadística. La escasa supervivencia de los pacientes EBER positivo podría deberse a una mayor frecuencia de

factores de mal pronóstico, como el sexo masculino, la vejez, el estadio avanzado y la presencia de síntomas B. A su vez, los pacientes positivos para LMP1 tenían características clínicas similares a los pacientes EBER positivo, pero la presencia de LMP1 no tuvo impacto significativo en la supervivencia de los pacientes analizados en este estudio. Adicionalmente, se detectó que los pacientes jóvenes de menos de 25 años con infección latente por EBV tenían una supervivencia libre de progresión prolongada, mientras que los pacientes mayores de 25 años con infección por EBV tenían una supervivencia libre de progresión más pobre.

En otro estudio realizado por Keegan et al (2005), los autores confirmaron que la presencia del EBV en las células tumorales del linfoma de Hodgkin es un marcador molecular significativo de la evolución del linfoma de Hodgkin tanto en hombres como en mujeres, independientemente de otros factores, pero que su influencia varía según la edad del paciente al momento del diagnóstico y el subtipo histológico de linfoma de Hodgkin. En niños, los linfomas de Hodgkin EBV positivos se asociaron de manera sugestiva con una supervivencia más favorable que el estado de EBV negativo. Por otro lado, en adultos jóvenes, el EBV no afectó significativamente la evolución del linfoma de Hodgkin, aunque los datos obtenidos sugirieron un posible efecto protector en pacientes de 30 a 44 años al momento del diagnóstico. Por el contrario, en adultos mayores, la presencia del EBV casi duplicó el riesgo de mortalidad en este tipo de linfoma. Por lo tanto, los autores concluyeron que los hallazgos que obtuvieron sugieren que el EBV desempeña un papel complejo en la progresión del linfoma de Hodgkin, pero podría servir como un indicador útil del pronóstico (Keegan, 2005).

En un estudio realizado por Westmoreland et al (2018) en niños de Malawi, África, determinaron las cargas virales en plasma de niños con diagnóstico de linfoma de Burkitt y linfoma de Hodgkin. De 137 niños incluidos en el estudio, en el 88% de ellos se detectó ADN del EBV en plasma, siendo positivos 86% de los niños con linfoma de Burkitt y el 94% de los niños con linfoma de Hodgkin clásico. Entre los resultados que obtuvieron, observaron que la carga viral de EBV en plasma estaba elevada en los niños con linfoma de Burkitt al inicio del estudio y fue disminuyendo durante la quimioterapia, pero se volvía a elevar antes de las recaídas. Además, reportan que los niños con mayor viremia al diagnóstico y con EBV

plasmático persistente en el punto medio del tratamiento, tuvieron peor supervivencia que aquellos niños cuyas cargas virales por EBV eran negativas. Además, determinaron que cada aumento en el logaritmo de la carga viral, se asoció con un 35% más de riesgo de muerte a los 12 meses. Por lo tanto, concluyen que la determinación de la carga viral del EBV es un potencial marcador de utilidad para el diagnóstico, el pronóstico, la evaluación de la respuesta al tratamiento y estratificación de riesgo en pacientes con linfoma de Burkitt y linfoma de Hodgkin.

A modo de resumen, los factores que se deben tomar en cuenta a la hora de evaluar el pronóstico de un paciente con un linfoma EBV positivo, son: la edad, el tipo de linfoma, la capacidad oncogénica del virus y el estado del sistema inmune del hospedero, ya que la presencia del EBV podría reflejar una respuesta inmune disminuida, lo que podría relacionarse con una baja tolerancia al tratamiento y a la enfermedad (Massini, 2009).

Conclusiones

1. El EBV es un virus oncogénico exitoso por dos motivos principales. El primero es que ha logrado seropositivizar a más del 90% de la población mundial, y la segunda razón es que ha logrado establecer varios programas de latencia y estrategias para poder permanecer en el hospedero minimizando o eliminando su potencial patogénico en un intento de mantener la infección persistente, y con gran capacidad para pasar de un hospedero a otro.
2. A pesar de que actualmente se conocen algunas estrategias utilizadas por el virus durante la infección en un hospedero y el rol que el EBV juega en la tumorigénesis, aún queda mucho por descubrir para lograr comprender en su totalidad cómo el EBV induce la transformación de células B, siendo necesario para el diseño de posibles terapias dirigidas contra el EBV. No obstante, se sabe que confluyen factores ambientales y propias del hospedero en la patogénesis de tumores asociados al EBV, por lo que son factores que pueden dificultar la total comprensión de los mecanismos asociados al desarrollo de tumores EBV positivos.
3. Se sabe que existe una fuerte evidencia que demuestra que el EBV tiene un rol importante en la tumorigénesis de diversos linfomas; sin embargo, se sabe que la expresión y función de los genes de latencia difieren en cada entorno tumoral y del efecto del EBV en cada etapa de la diferenciación de los linfocitos B.
4. Se vuelve estrictamente necesario seguir investigando el rol que juega el EBV en el pronóstico y sobrevida de los pacientes con linfomas EBV positivos, ya que es un potencial biomarcador que puede ser utilizado para seguimiento y control en el desarrollo de la enfermedad hematológica maligna.

Referencias bibliográficas

Allday, M. (2009). How does Epstein–Barr virus (EBV) complement the activation of Myc in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma? *Semin cancer biol*, 19(6): 366-376.

Al-Mansour, Z; Nelson, B; Evens, A. (2013). Post-Transplant Lymphoproliferative Disease (PTLD): Risk factor, Diagnosis, and Current Treatment Strategies. *Curr Hematol Malig Rep*. 8 (3): 173-183.

Ayee, R; Ofori, M; Wright, E; Quaye, O. (2020). Epstein Barr Virus Associated Lymphomas and Epithelial Cancers in Humans. *J. Cancer*. 11 (7): 1731-1750.

Beltramino, M; Calmet, R; Valdes, M. (2005). Virus de Epstein-Barr y su relación con el desarrollo de enfermedades linfoproliferativas. *Hematología*, 9 (2): 39-54.

Bergbauer, M; Kalla, M; Schmeink, A; Gobel, C; Rothbauer, U; Eck, S; Benet-Pagès, A; Hammerschmidt, W. (2020). CpG-Methylation Regulates a Class of Epstein-Barr Virus Promoters. *PLoS Pathog*. 6(9): 1-16.

Brady, G; MacArthur, G; Farrell, P. (2007). Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J. Clin. Pathol*. 60 (12): 1397-1402.

Buschle, A; Hammerschmidt, W. (2020). Epigenetic lifestyle of Epstein-Barr virus. *Semin Immunopathol*, 42: 131-142.

Cader, F; Kearns, P; Young, L; Murray, P; Vockerodt, M. (2010). The contribution of the Epstein-Barr virus to the pathogenesis of childhood lymphomas. *Cancer Treat Rev*. 36 (4): 348-353.

Caporaso, N; Goldin, L; Anderson, W; Langrem, O. (2009). Current insight on trends, causes, and mechanisms of Hodgkin's lymphoma. *Cancer J*. 15 (2): 117-123.

Cappello, D; Rasi, S; Oreste, P; Veronese, S; Cerri, M; Ravelli, E; Rossi, D; Minola, E; Colossino, A; Gambacorta, M; Muti, G; Morra, E; Gaidano, G. (2009). Molecular characterization of post-transplant lymphoproliferative disorders of donor origin occurring in liver transplant recipients. *J Pathol.* 218: 478-486.

Carbone, A; Gloghini, A; Dotti, G. (2008). EBV-Associated Lymphoproliferative Disorders: Classification and Treatment. *The Oncologist.* 13 (5): 577-585.

Crombie, J; LaCasce, A. (2019). Epstein Barr Virus Associated B-cell Lymphomas and Iatrogenic Lymphoproliferative Disorders. *Front Oncol.* 9(109): 1-9.

Dharnidharka, V; Webster, A; Martínez, O; Preiksaitia, J; Leblond, V; Choquet, S. (2016). Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Nature Reviews.* 2 (15088): 1-20.

Dolcetti, R; Masucci, M (2003). Epstein-Barr virus: induction and control of cell transformation. *J Cell Physiol.* 196 (2): 217-218.

Engel, M; Esoop, M; Close, P; Hartley, P; Pallesen, G; Sinclair-Smith, C. (2000). Improved prognosis of Epstein-Barr virus associated childhood Hodgkin's lymphoma: study of 47 South African cases. *J Clin Pathol,* 53 (1): 182-186.

Farrell, K; Jarrett, R. (2011). The molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *Histopathology.* 58 (1): 15-25.

Frappier, L. (2012). Contributions of Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) to cell immortalization and survival. *Viruses,* 4 (9): 1537-1547.

Fujita, S; Buziba, N; Kumatori, A; Senba, M; Yamaguchi, A; Toriyama, K. (2004). Early stage of Epstein-Barr virus lytic infection leading to the starry sky pattern formation in endemic Burkitt lymphoma. *Arch Pathol Lab Med.* 128 (5): 549-552.

Glavina-Durdov, M; Jakic-Razumovic, J; Capkun, V; Murray, P. (2001). Assessment of the prognostic impact of the Epstein-Barr virus-encodes latent membrane protein-1 expression in Hodgkin`s disease. *Br J Cancer*. 84 (9): 1227-1234.

Gómez, A. (2009). Mononucleosis infecciosa. Revisión y actualización. *Farmacia Pediátrica*. 23 (1): 48-51.

Góngora, R. (2003). Enfermedades virales en Hematología. *Gaceta Médica de México*. 139 (2): 102-105.

Grywalska, E; Markowicz, J; Grabarczyk, P; Pasiarski, M; Rolinski, J. (2013). Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Postepy Hig Med Dosw*. 67: 481-490.

Grywalska, E; Jacek, R. (2015). Epstein-Barr Virus-Associated Lymphomas. *Semin Oncol*. 42 (2): 291-303.

Grove, J; Marsh, M. (2011). The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J Cell Biol*. 195 (7): 1071-1082.

Grossman, L; Chang, C; Dai, J; Nikitin, P; Jima, D; Dave, S; Luftig, M. (2017). Epstein-Barr Virus Induces Adhesion Receptor CD226 (DNAM-1) Expression during Primary B-cell Transformation into Lymphoblastoid Cell Lines. *mSphere*, 2(6): 1-11.

Hatton, O; Harris, A; Schaffert, S; Krams, S; Martínez, O. (2014). The interplay between Epstein-Barr virus and B lymphocytes: implications for infection, immunity, and disease. *Immunol Res*. 58 (0): 268-276.

Hemann, M; Bric, A; Teruya-Feldstein, J. (2005). Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour derived MYC mutants. *Nature*. 436 (7052): 807-811.

Hislop, A; Taylor, S; Sauce, D; Rickinson, A. (2007). Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol*. 25: 587-617.

Hjalgrim, H; Askling, J; Rostgaard, K; Hamilton, S; Path, F; Frisch, M; Zhang, J; Madsen, M; Rosdahl, N; Bossen, H; Storm, H; Melbye, M. (2003). Characteristics of Hodgkin's Lymphoma after Infectious Mononucleosis. *NEJM*. 349 (14): 1324-1332.

Hong, G; Gulley, M; Feng, W; Delecluse, H; Holley, E; Kenney, S. (2005). Epstein-Barr Virus Lytic Infection Contributes to Lymphoproliferative Disease in a SCID Mouse Model. *J Virol*. 79 (22): 13993-14003.

Jarret, R; Stark, G; White, J; Angus, B; Alexander, F; Krajewski, A; Freeland, J; Malcom, G; Taylor, P. (2005). Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study. *Blood*. 106 (7): 2444-2451.

Jarret, R. (2006). Viruses and lymphoma/Leukaemia. *J.Pathol*. 208:176-186.

Jutta, K; Keay, P; Keay, S. (2001). Diagnosis and Management of Posttransplant Lymphoproliferative Disorder in Solid-Organ Transplant Recipients. *Clin Infect Dis*. 33 (1): 38-46.

Kang, M; Kieff, E. (2015). Epstein-Barr virus latent genes. *Exp Mol Med*. 47 (131): 1-16.

Keegan, T; Glaser, S; Clarke, C; Gulley, M; Craig, F; DiGiuseppe, J; Dorfman, R; Mann, R; Ambinder, R. (2005). Epstein-Barr Virus as a Marker of Survival After Hodgkin's Lymphoma: A Population-Based Study. *J. Clin. Oncol*. 23 (30): 7604-7613.

Kim, H; Ko, Y; Kim, J; Lee, S; Lee, H; Park, G; Paik, J; Cha, H; Choi, Y; Han, J; Huh, J. (2017). Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders: Review and Update on 2016 WHO Classification. *J Pathol Transl Med*. 51: 352-358.

Kuppers, R. (2003). B cells under influence: Transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol.* 3: 801-810.

Kwon, J; Park, Y; Kang, J; Kim, K; Ko, Y; Ryoo, B; Lee, S; Lee, Hñ Koo, H; Kim, W. (2006). The effect of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol.* 85 (7): 463-468.

Linke-Serinsoz, E; Fend, F; Quintanilla, L. (2017). Human immunodeficiency virus (HIV) and Epstein-Barr (EBV) related lymphomas, pathology viewpoint. *Sem Diag Pathol.* 34: 352-363.

Lu, F; Chen, H; Kossenkov, A; DeWispeleare, K; Won, K; Lieberman, P. (2016). EBNA2 Drives Formation of New Chromosome Binding Sites and Target Genes for B-Cell Master Regulatory Transcription Factors RBP-jk and EBF1. *PLoS Pathog.* 12 (1): e1005339.

Marques-Piubelli, M; Salas, Y; Pachas, C; Becker-Hecker, R; Vega, F; Miranda, R. (2020). Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders and lymphomas: a review. *Human Pathology.* 52 (1): 40-52.

Massini, G; Siemer, D; Hohaus, S. (2009). EBV in Hodgkin Lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 1 (2): e2009013

Mate, J; Navarro, J; Hernández, A; Ausina, V. (2016). Síndromes linfoproliferativos asociados al virus del Epstein-Barr. *Control de Calidad SEIMC,* 1 (1): 1-5.

Melnick, J; Butel, J. Tevethia, S; Biswal, N; Benyesh-Melnick, M. (1971). Cell transformation by viruses. *In Vitro.* 6(5): 335-348.

Middeldorp, J; Brink, A; van den Brule, A; Meijer, C. (2003). Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol.* 45 (1): 1-36.

Molyneux, E; Rochford, R; Griffin, B; Newton, R; Jackson, G; Menon, G; Harrison, C; Israels, T; Bailey, S. (2012). Burkitt's lymphoma. *Lancet*. 379 (9822): 1234-1244.

Montes, I; Youn, W; Fend, F; Quintanilla, L. (2020). Epstein-Barr virus positive T and NK-cell lymphoproliferations: Morphological features and differential diagnosis. *Sem Diag Pathol*. 37: 32-46.

Moore, P; Chang, Y. (2010). Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer*. 10: 878-889.

Mozahab, Z. (2013). Epidemiology of Hodgkin's Lymphoma. *Health*, 5(5): 17-22.

Mundo, L, Del Porro, L; Granai, M; Siciliano, M; Mancini, V; Santi, R; Marcar, L; Vrzalikova, K; Vergoni, F; Di Stefano, G; Schiavoni, G; Segreto, G; Onyango, N; Nyagol, J; Amato, T; Bellan, C; Anagnostopoulos, I; Falini, B; Leoncini, L; Tiacci, E. (2020). Frequent traces of EBV infection in Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas classified as EBV-negative by routine methods: expanding the landscape of EBV-related lymphomas. *Mod. Pathol*. 33: 2407-2421.

Myriam, B; Sonia, Z; Hanene, S; Teheni, L; Mounir, T. (2017). Prognostic significance of Epstein-Barr (EBV) infection in Hodgkin lymphoma patients. *J Infect Chemother*. 23 (3): 121-130.

Ning, S. (2011). Innate immune modulation in EBV infection. *Herpesviridae*. 2(1): 2011.

Okano, M. (2000). Haematological associations of Epstein-Barr virus infection. *Bailliere's Clin Haematology*, 13 (2): 199-214.

Okuno, Y; Murata, T; Sato, Y; Muramatsu, H; Ito, Y; Watanabe, T; Okuno, T; Murakami, N; Yoshida, K; Sawada, A; Inoue, M; Kawa, K; Seto, M; Ohshima, K; Shiraishi, Y; Chiba,

K; Tanaka, H; Miyano, S; Narita, Y; Yoshida, M; Goshima, F; Kawada, J; Nishida, T; Kiyoi, H; Kato, S; Nakamura, S; Morishima, S; Yoshikawa, T; Fujiwara, S; Shimizu, N; Isobe, Y; Noguchi, M; Kikuta, A; Iwatsuki, K; Takahashi, Y; Kojima, S; Ogawa, S; Kimura, H. (2019). Defective Epstein-Barr virus in chronic active infection and haematological malignancy. *Nat Microbiol.* 4 (3): 404-413.

Pannone, G; Zamparese, R; Pace, M; Pedicillo, M; Cagiano, S; Somma, P; Errico, M; Donofrio, V; Franco, R; De Chiara, A; Aquino, G; Bucci, P; Bucci, E; Santoro, A; Bufo, P. (2014). The role of EBV in the pathogenesis of Burkitt's Lymphoma: an Italian hospital-based survey. *Infect. Agents Cancer.* 9:34.

Pei, Y; Wong, J; Robertson, E. (2020). Targeted Therapies for Epstein-Barr Virus-Associated Lymphomas. *Cancers.* 12 (2565): 2-21.

Pérez, J; Aguilar, C; Álvarez, J; Pacheco, M; Báez, P; Bates, R; Cervantes, I; Espitia, M; Estrada, P; Jiménez, R; Fermín, D; García, A; Gómez, P; Grimaldo, F; Guzmán, P; Herrera, W; Martínez, M; Medina, C; Mena, V; Montova, L; Morales, J; Morales, A; Mujica, A; Palma, O; Reyes, G; Reynoso, A; Salazar, O; Hernández, E; Paredes, E; Alvarado, M. (2019). Linfoma de Hodgkin. *Revista de Hematología.* 20 (2): 124-130.

Portis, T; Dyck, P; Longnecker, R. (2003). Epstein-Barr (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 1 (102): 4166-4178.

Quijano, S; Saavedra, C; Fiorentino, S; Orozco, O; Bravo, M. (2004). Presencia del virus del Epstein-Barr en casos colombianos de linfoma de Hodgkin y su relación con la respuesta al tratamiento. *Biomédica,* 24 (1): 163-173.

Raab-Traub, N. (2007). EBV-induced oncogenesis. En: Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis, eds: Arvin, A; Campadelli-Fiume, G; Mocarski, E;

Moore, P; Roizamn, B; Whitley, R; Yamanishi, K, Cambrigde University Press, Cambrigde, 986-1000.

Rezk, S; Weiss, L. (2007). Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Human Pathology*. 38 (9): 1293-1304.

Rickinson, A. (2014). Co-infections, inflammation, and oncogenesis: Future directions for EBV research. *Semin Cancer Biol*. 26: 99-115.

Saha, A; Robertson, E. (2011). Epstein-Barr Virus-Associated B-cell Lymphomas: Pathogenesis and Clinical Outcomes. *Clin Cancer Res*. 17 (10): 3056-3063.

Saha, A; Jha, H; Upadhyay, S; Robertson, E. (2015). Epigenetic silencing of tumor suppressor genes during in vitro Epstein-Barr infection. *Proc Natl Acad. Sci*. 112: 1-9.

Saha, A; Robertson, E. (2019). Mechanisms of B-Cell Oncogenesis Induced by Virus. *J. Virol*. 93 (13): 1-13.

Samanta, M; Iwakiri, D; Kanda, T; Imaizumi, T; Takada, K. (2006). EB virus encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I INF. *EMBO J*. 25: 4207-4214.

Satoh, T; Wada, R; Yajima, N; Imaizumi, T; Yagihashi, S. (2014). Tumor Microenvironment and RIG-1 Signaling Molecules in Epstein-Barr Virus-Positive and -Negative Classical Hodgkin Lymphoma of the Elderly. *J Clin Exp Hematol*, 54 (1): 75-84.

Schmit, R; Hansmann, M; Bohle, V; Martin, J; Hartmann, S; Mechttersheimer, G; Klapper, W; Vater, I; Giefing, M; Gesk, S; Stanelle, J; Siebert, R; Kuppers, R. (2009). TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J. Exp. Med*. 11 (206): 981-989.

Schwering, I; Brauninger, A; Klein, U, Jungnickel, B; Tinguely, M; Diehl, V; Hansmann, M; Dalla-Favera, R; Raiewsky, K; Kuppers, R. (2003). Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 101:1505-1512.

Sixbey, J; Nedrud, J; Raab-Traub, N; Hanes, R; Pagano, J. (1984). Epstein-Barr replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med*. 310: 1225-1230.

Stojanova, J; Caillard, S; Rousseau, A, Marquet, R. (2011). Post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD): Pharmacological, virological and other determinants. *Pharmacol res*; 63 (1):1-7.

Tinoco, I; Caro, N; Rodríguez, C; López, E. (2014). Infecciones por el virus de Epstein-Barr y Citomegalovirus. *Medicine*. 11 (50): 2954-2964.

Thompson, M; Kurzrock, R. (2004). Epstein-Barr and cancer. *Clin Cancer Res*. 10 (3): 803-821.

Thorley, D. (2001). Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat. Rev. Immunol*. 1 (1): 75-82.

Thorley, D; Gross, A. (2004). Persistence of the Epstein-Barr Virus and the Origins of Associated Lymphomas. *N. Engl. J. Med*. 350 (13): 1328-1335.

Vindas, L. (2019). Virus Epstein-Barr: primer oncovirus humano descubierto y su relación con el desarrollo de enfermedades hematoológicas como el Linfoma de Burkitt. *Rev. Colegio de Microb Quim Clin. de Costa Rica*, 25 (2): 108-116.

Vockerodt, M. (2015). The Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Lymphoma. *J. Pathol*. 235:312-322.

Wang, B; Cen, X; Ren, H; Liu, W; Liang, Z; Qiu, Z; Ou, J; Wang, W; Li, Y; Dong, Y; Wang, M; Wang, L; Wang, Q. (2016). Epstein-Barr Virus Status and Its Prognostic Value in Lymphoma. *J. Hematol. Oncol.* 3 (5): 1-6.

Westmoreland, K; Montgomery, N; Stanley, C; El-Mallawany, N; Wasswa, P; van der Gronde, T; Mtete, I; Butia, M; Itimu, S; Chasela, M; Mtunda, M; Kampani, C; Liomba, N; Tomoka, T; Dhungel, B; Sanders, M; Krysiak, R; Kazembe, P; Dittmer, D; Fedoriw, Y; Gopal S. (2017). Plasma Epstein-Barr virus DNA for pediatric Burkitt lymphoma diagnosis, prognosis and response assessment in Malawi. *Int J Cancer.* 140 (11): 2509-2516.

Woellmer, A; Hammerschmidt, W. (2013). Epstein-Barr virus and host cell methylation: regulation of latency, replication, and virus reactivation. *Curr Opin Virol.* 3 (3): 260-265.

Young, L; Yap, L; Murray, P. (2016). Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nature Reviews, Cancer*, 16: 789-802.