Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Caracterización de variantes del virus de Epstein Barr en la infección aguda en pacientes pediátricos y su comparación con linfomas pediátricos EBV +

Lorenzetti, Mario Alejandro

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Lorenzetti, Mario Alejandro. (2012). Caracterización de variantes del virus de Epstein Barr en la infección aguda en pacientes pediátricos y su comparación con linfomas pediátricos EBV +. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Lorenzetti, Mario Alejandro. "Caracterización de variantes del virus de Epstein Barr en la infección aguda en pacientes pediátricos y su comparación con linfomas pediátricos EBV +". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

“Caracterización de variantes del virus de Epstein Barr en la infección aguda en pacientes pediátricos y su comparación con linfomas pediátricos EBV +.”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Mario Alejandro Lorenzetti

Director de tesis: Dra. María Victoria Preciado

Director Asistente: Dra. Paola Andrea Chabay

Consejero de estudios: Dra. Elsa Beatriz Damonte

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Molecular, División Anatomía Patológica, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

Buenos Aires, 2012

“Caracterización de variantes del virus de Epstein Barr en la infección aguda en pacientes pediátricos y su comparación con linfomas pediátricos EBV+.”

RESUMEN

El virus de Epstein Barr (EBV) posee dos ciclos de infección, lítica y latente, en linfocitos B, el segundo está asociado a procesos neoplásicos. Se han descripto polimorfismos en los genes BZLF1, BKRF1 (EBNA1) y BNLF1 (LMP1), algunos asociados a linfomas EBV+, a los compartimentos del hospedador o al origen geográfico del virus.

Con el objetivo de identificar polimorfismos en estas regiones génicas y su dinámica de distribución en el tiempo y entre los compartimentos del hospedador, se estudió una serie de 35 pacientes pediátricos, 15 con mononucleosis infecciosa (MNI) y 20 con linfoma EBV+, todos de nuestra región geográfica.

Mediante amplificación por PCR y posterior secuenciación, se caracterizaron las variantes virales de dichos genes en distintos compartimentos de pacientes i) con MNI al momento del diagnóstico (D0), al mes (D30) y a los tres meses (D90) durante la convalecencia y ii) en muestras de biopsias ganglionares de linfomas EBV+.

Se identificaron variantes de BZLF1 estadísticamente asociadas a tumores EBV+, variantes de EBNA1 de circulación exclusiva en nuestra región geográfica y variantes de LMP1 preferentemente asociadas a patologías EBV+, tanto malignas como benignas.

Palabras claves: virus de Epstein Barr, mononucleosis infecciosa, linfomas EBV+, pacientes pediátricos, variantes de BZLF1, variantes de EBNA1, variantes de LMP1.

“Characterization of Epstein Barr virus variants in pediatric patients with acute infection and its comparison with pediatric EBV+ lymphomas”

ABSTRACT

Epstein Barr virus (EBV) displays two infective cycles, lytic cycle and latency within B cells, and it is the latter which is associated with neoplasic processes.

Polymorphisms within BZLF1, BKRF1 (EBNA1) and BNLF1 (LMP1) genes were described, and some seemed to associate with malignancy, distribution between compartments or the geographical origin of the virus.

With the aim to characterize polymorphisms within these genetic regions and their distribution over time and/or anatomical compartments, we studied a series of 35 pediatric patients from our geographic region: 15 with infectious mononucleosis (IM) and 20 with EBV-related lymphomas.

Viral variants from these genes were characterized after direct sequencing of PCR products obtained from different anatomical compartments from patients with IM at diagnosis (D0), at a month time (D30) and after three months (D90), during the convalescence and also from EBV+ tumor biopsies.

We identified BZLF1 variants statistically associated with EBV-related lymphomas, EBNA1 variants exclusively circulating in our region and LMP1 variants preferentially occurring in EBV-related pathologies, both malignant and benign.

Key words: Epstein Barr virus, infectious mononucleosis, EBV-related lymphoma, pediatric patients, BZLF1 variants, EBNA1 variants, LMP1 variants.

Del presente trabajo de tesis se originaron las siguientes publicaciones.

1. *"Distinctive EBV variants associated to pediatric benign and malignant pathologies: LMP1 sequence characterization and linkage with other viral gene polymorphisms"*. **Lorenzetti MA**, Gantuz M, Altcheh J, De Matteo E, Chabay, Preciado MV. Journal of Clinical Microbiology. 2012 **(En prensa)**.

2. *"EBNA1 sequences in Argentinean pediatric acute and latent Epstein Barr virus infection reflect circulation of novel South American variants"*. **Lorenzetti MA**, Altcheh J, Moroni S, Moscatelli G, Chabay P, Preciado MV. Journal of Medical Virology, Oct;82(10):1730-1738, 2010.

3. *"Epstein Barr virus BZLF1 gene promoter variants in pediatric patients with acute infectious mononucleosis. Its comparison with pediatric lymphomas"*. **Lorenzetti MA**, Gutiérrez M, Altcheh J, Moscatelli G, Moroni S, Chabay P, Preciado MV. Journal of Medical Virology, Nov;81(11):1912-1917, 2009.

AGRADECIMIENTOS

A María Victoria y a Paola, por guiar mis primeros pasos en el laboratorio, los del medio y estos últimos también. Gracias por la libertad que me brindaron para manejarme durante la realización de este trabajo de tesis y por estar ahí cada vez que lo necesité así como por la enorme paciencia que me tuvieron todo este tiempo, fundamentalmente desde aquel complejo primer día.

Muchas gracias a la División Anatomía Patología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, a todo el cuerpo de médicos patólogos y técnicos por realizar la clasificación histológica de los tumores incluidos en este trabajo y por brindarnos el espacio en donde podemos trabajar y crecer todos juntos. Un agradecimiento especial a la Dra. Elena De Matteo, por su gran predisposición para el análisis de las biopsias y por la continua colaboración un todos los proyectos.

A la División de Onco-Hematología del HNRG por brindarnos la información referente a los pacientes con linfomas contenida en las historias clínicas.

Al CONICET por la confianza depositada en mí durante estos años.

A Jimmy, Guillermo, Samanta y Griselda, médicos y bioquímicos del Servicio de Parasitología y Chagas del HNRG, por su activa participación en la pesquiza y seguimiento de los pacientes con MNI incluidos en este trabajo y por la buena onda y alegría que aportan al trabajo diario.

A todos mis compañeros del Lab. de Biología Molecular, Pame, Meli, Magui, Marce, Marie, Romi, Patri, Gusy, Sandra y Juan. Gracias por todas las manos brindadas cada vez que hizo falta y por conformar un grupo tan unido que me permitió venir cada día a trabajar con más ganas.

Un agradecimiento muy especial a la Dra Rocío Hassan por su ayuda con el análisis de recombinación realizado en este trabajo.

Muchas gracias a la banda de biólogos y al geólogo, Trini, Vir, Nico, Nuria, Javi (el geólogo), Marian, Jime, Juaju, Diego, Martín, Gon, Anita, Fer, Luis y Analía. Gracias por las miles de charlas enriquecedoras y reconfortantes, tantas salidas y asados compartidos, no sólo durante la realización de este trabajo sino desde aquellas largas horas de estudio desde los primeros años de la carrera. Está muy bueno compartir las experiencias propias con gente tan linda y que además está atravesando por una situación similar. Nada de esto hubiese sido posible sin el apoyo de todos ustedes!!!

Muchas gracias a mis padres y a Claudia por todo el apoyo brindado a través de todos estos años y por el interés que siempre demostraron durante cada etapa de realización de este trabajo de tesis

A Trini, muchisimo más que mi compañera en el camino de la vida. Gracias por demostrarme que cualquier dificultad se puede superar con ganas y con esfuerzo, por el apoyo, crítica y motivación constante que me brindas cada día y también por tu infinita paciencia.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1
1.1. Virus de Epstein Barr 1
1.1.1. Conceptos generales 1
1.1.2. Estructura y nomenclatura genómica 2
1.1.2.1. Genes del ciclo lítico 4
Genes inmediatamente tempranos 4
Genes tempranos 5
Genes tardíos 5
1.1.2.2. Genes del ciclo latente 5
Antígenos nucleares EBNAs 5
EBNA1 5
EBNA2 6
Familia EBNA3 7
EBNALP 7
Antígenos latentes de membrana LMPs 7
LMP1 7
LMP2 8
Transcriptos no traducibles 9
EBERs 9
BARTs 10
1.1.3. Epidemiología y replicación 10
1.1.4. Patologías asociadas al ciclo lítico de EBV 13
1.1.5. Patologías tumorales asociadas al ciclo latente de EBV 16
1.1.5.1. Linfomas asociados a EBV 18
Linfoma de Hodgkin 18
Linfoma no Hodgkin 20
Linfoma no Hodgkin B 21
Linfoma no Hodgkin T 21
Enfermedad linfoproliferativa asociada a inmunosupresión 22
1.1.5.2. Carcinomas asociados a EBV 22
Carcinoma nasofaríngeo 22
Carcinoma gástrico 23
1.1.6. Variación genética del EBV 23

1.1.6.1. Variantes de la región promotora del gen BZLF1 24
1.1.6.2. Variantes de EBNA1 26
1.1.6.3. Variantes de LMP1 27

2. HIPÓTESIS 30

3. OBJETIVOS 31

4. METODOLOGÍA 32
4.1. Población en estudio 32
4.2. Muestras 33
4.3. Preparación de las muestras 33
4.4. Inmunofluorescencia indirecta 34
4.5. Enzimo inmunoensayo para *Toxoplasma gondii* 35
4.6. Hibridación *in situ* para EBERs 35
4.7. Extracción de ADN 36
4.8. Reacción en cadena de la polimerasa 36
4.8.1. Verificación de la integridad del ADN purificado 36
4.8.2. Tipificación de EBV 37
4.8.3. Amplificación de la región promotora del gen BZLF1 38
4.8.4. Amplificación de la región 3´ codificante del gen BKRF1 39
4.8.5. Amplificación de la región 3´ codificante del gen BNLF1 40
4.9. Purificación de los productos de amplificación 40
4.10. Secuenciación directa de los productos de amplificación 41
4.11. Análisis de secuencias 41
4.12. Reconstrucción de las relaciones filogenéticas 42
4.13. Clonado de los productos de amplificación 43
4.14. Preparación de bacterias competentes 43
4.15. Transformación de bacterias competentes 44
4.16. Análisis de colonias recombinantes 44
4.17. Purificación de ADN plasmídico para su secuenciación 45
4.18. Secuenciación de los clones 46
4.19. PCR cuantitativa en tiempo real 46
4.20. Análisis estadístico 47

5. RESULTADOS 48
5.1 Descripción de la población en estudio 48
5.2. Tipificación viral 51
5.3. Caracterización de variantes de EBV 52
5.3.1. Caracterización de variantes de la región promotora del gen BZLF1 53
5.3.2. Caracterización de variantes de la región C-ter de EBNA1 58
5.3.3. Caracterización de variantes de la región C-ter de LMP1 65
5.4. Análisis integral de asociación de todos los polimorfismos 78
5.5. Análisis de la carga viral 79

6. DISCUSIÓN 82

7. CONCLUSIONES 102

8. REFERENCIAS 104

9. APÉNDICES 117
Apéndice A 117
Apéndice B 118
Apéndice C 119
Apéndice D 121
Apéndice E 122
Apéndice F 124
Apéndice G 126
Apéndice H 128

ABREVIATURAS

μl: microlitros
μM: micromolar
aa: aminoácido/aminoácidos
ADN: ácido desoxirribonucleico
AP-1: proteína activadora 1 (del inglés *activator protein 1*)
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
C-jun: factor de transcripción C-jun
C-ter: carboxilo terminal
CG: carcinoma gástrico
CMSP: células mononucleares de sangre periférica
CMV: citomegalovirus humano
CNF: carcinoma nasofaríngeo
CTAR1: Región de Activación C-Ter 1 (del inglés *C-Terminal Activation Region 1*)
CTAR2: Región de Activación C-Ter 2 (del inglés *C-Terminal Activation Region 2*)
del30: deleción de30 pb
EBERs: pequeños RNAs codificados por EBV (del inglés *Epstein Barr Encoded RNAs)*
EBNA1: Antígeno Nuclear de Epstein Barr 1 (del inglés *Epstein Barr nuclear antigen 1*)
EBNAs: Antígenos Nucleares de Epstein Barr (del inglés *Epstein Barr nuclear antigens*)
EBV: virus de Epstein Barr
FITC: Isotiocianato de Fluoresceína
HHV-4: herpes virus humano 4
HIV: virus de inmunodeficiencia humana
HLA-I: complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (del inglés *human leucocitary antigen I*)
HLA-II: complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (del inglés *human leucocitary antigen II*)
IFI: inmunofluorescencia indirecta
IgG: inmunoglobulina G
IgM: inmunoglobulina M
ins15: inserción de 15 pb
JAK: quinasa Janus (del inglés *Janus kinase*)
KDa: kilo dalton
Kpb: kilo pares de bases
LB: linfoma de Burkitt
LH: linfoma de Hodgkin
LMP1: Proteína Latente de Membrana 1 (del inglés *latent membrane protein 1*)
LMPs: Proteínas Latentes de Membrana (del inglés *latent membrane proteins*)
LNH: linfomas no Hodgkin
MAP: proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés *mitogen activated protein kinase*)
MEF-2D factor potenciador específico de miocitos 2D (del inglés *myocyte-specific enhancer factor 2D*)
min: minutos

ml: mililitros
mM: milimolar
MNI: mononucleosis infecciosa
N-ter: amino terminal
NF-1: factor nuclear 1 (del inglés *nuclear factor 1*)
NFκB: factor nuclear κB (del inglés *nuclear factor κB*)
ng: nanogramos
OMS: Organización Mundial de la Salud
ORF/ORFs: marco de lectura abierto (del inglés *open reading frame*)
pb: pares de bases
PBS: solución tamponada de fosfatos
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasas (del inglés *phosphatidylinositol 3-kinases*)
PTLD: Desorden Linfoproliferativo Post Transplante
RBPJκ: proteína de unión a la señal de recombinación J-Kappa (del inglés *recombination signal-binding protein for J-Kappa*
rep33: región repetitiva de 33 pb
RI: región de repeticiones internas
rpm: revoluciones por minuto
RS: célula de Reed-Sternberg
RT: región repetitiva terminal
seg: segundos
SF: secreciones faríngeas
STAT: traductor de señales y activador de la transcripción (del inglés *signal transducer and activator of transcription*)
TAE: solución Tris-Acético-EDTA
TNF: factor de necrosis tumoral (del inglés *tumor necrosis factor*)
TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral (del inglés *tumor necrosis factor receptor*)
TRAD: dominios de muerte asociados a TNFR (del inglés *TNFR associated death domain*)
TRAFs: factores asociados a TNFR (del inglés *TNFR associated factors*)
UC: región única corta
UL: región única larga
UV: ultravioleta
VCA: antígeno de cápside viral (del inglés *viral capsid antigen*)
wt: salvaje (del inglés *wild type*)

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Virus de Epstein Barr

1.1.1. Conceptos generales

El virus de Epstein Barr (EBV), cuya clasificación taxonómica es herpes virus humano 4 (HHV-4), es un virus oncogénico y linfotrópico que pertenece al género *Lymphocryptovirus*, subfamilia *Gammaherpesvirinae* dentro de la familia *Herpesviridae* [Young y col., 2004].

El EBV fue originalmente descripto en el año 1964 por Anthony Epstein, Ivone Barr y Bert Achong cuando observaban mediante un microscopio electrónico células en cultivo obtenidas a partir de una biopsia de linfoma de Burkitt (LB) [Epstein y col., 1964].

Como otros miembros de la familia *Herpesviridae*, posee un genoma a ADN doble cadena rodeado por una cápside proteica icosaédrica compuesta por 162 capsómeros que conforman la nucleocápside viral. A su vez, ésta se encuentra rodeada de una matriz proteica, dispuesta asimétricamente, denominada tegumento. El virus adquiere la envoltura viral de la membrana nuclear interna de la célula infectada, la cual fue modificada mediante la inserción de las glucoproteínas virales. Éstas son las responsables de la interacción con receptores celulares específicos y en consecuencia determinan el tropismo celular de la partícula viral infecciosa. La más abundante de la glucoproteínas presentes en la envoltura viral, la gp350, interactúa en forma específica con el marcador celular CD21, receptor del componente C3d del complemento, presente en la superficie de los linfocitos B [Rickinson y col., 2007]. Sumado a esto, las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (HLA-II) actúan como coreceptor mediante la interacción con la glucoproteína viral gp42 [Li y col., 1997].

El EBV es uno de los ocho herpesvirus humanos conocidos que han evolucionado conjuntamente con el hombre, desarrollando estrategias de persistencia a largo plazo beneficiosas para la supervivencia viral. La infección latente y de por vida en más del 90% de las personas adultas lleva a que este virus se halle ampliamente distribuido en la población mundial [Henle y col., 1969; Klein y col., 2007]. El contagio ocurre principalmente a través de la saliva. Durante la infección primaria, en los linfocitos B adyacentes a la mucosa faríngea, ocurre un primer ciclo replicativo con producción de partículas virales infectivas, el cual es eficientemente controlado por el sistema inmunitario del hospedador. Luego, se establece la infección latente en linfocitos B

circulantes de memoria. Ocasionalmente, en algunas de estas células latentemente infectadas, entre 1 y 50 células infectadas por cada millón de linfocitos B de sangre periférica, el virus puede reactivarse, lo que resulta en la producción de nuevas partículas infecciosas en la orofaringe y en la posibilidad de que el virus se disemine entre los individuos [Cohen, 2000].

1.1.2. Estructura y nomenclatura genómica

El genoma de EBV es una molécula de ADN doble cadena de 172 Kpb que contiene aproximadamente 85 marcos de lectura abiertos (ORFs por sus siglas en idioma inglés). La gran mayoría de estos ORFs se expresan únicamente durante el ciclo lítico y solamente 11 de ellos se transcriben durante la latencia, de los cuales sólo 9 se traducen [Rickinson y col., 2007]. En su forma lineal este genoma se organiza en cuatro regiones; una región única corta (UC), una región de repeticiones internas (RI), una región única larga (UL) y una región repetitiva terminal (RT) (Figura 1). En el núcleo de la célula infectada, el genoma de EBV se circulariza por fusión de la RT y permanece en forma de episoma extracromosómico durante la latencia viral.

La nomenclatura de las diferentes regiones génicas se estableció a partir de la digestión del genoma viral contenido en la línea linfoblástica B95.8 con la endonucleasa de restricción *Bam*HI. Luego de la digestión le fue asignada una letra a cada fragmento de restricción producido, donde la letra “A” corresponde al fragmento de mayor tamaño y la “Z al de menor”. De esta forma, los ORFs son nombrados de acuerdo al criterio siguiente: La letra “B” correspondiente a la enzima *Bam*HI seguida de la letra correspondiente al fragmento de restricción al que pertenece el ORF (Figura 1), luego se indica la dirección de lectura del ORF mediante las letras “L” (izquierda, del inglés *Left*) y “R” (derecha, del inglés *Right*). Finalmente, se indica el número del ORF dentro del fragmento de restricción, por ejemplo: los genes BKRF1 y BNLF1 que codifican para EBNA1 y LMP1, respectivamente [Farrell, 2001]. El genoma viral presente en la línea celular B95.8 fue el primer genoma de un herpesvirus que se secuenció completo [Baer y col., 1984] y se considera la secuencia patrón de referencia de EBV (número de acceso de *GenBank* V01555.2).

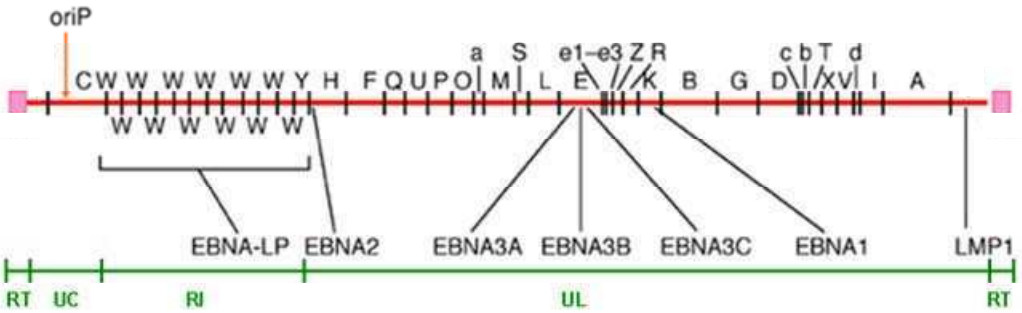


Figura 1: Esquema del genoma de EBV en forma lineal donde se observan las cuatro regiones principales (esquema en verde) y los fragmentos resultantes luego de la digestión con *Bam*HI (esquema en rojo). Se describen además siete de los antígenos expresados en el ciclo latente. Adaptado de [Young y col., 2004]

Los distintos ORFs del genoma de EBV se expresan en forma diferencial al establecer distintos tipos de infecciones en el humano. Como todos los otros miembros de la familia, el EBV presenta dos ciclos de infección; el ciclo lítico y ciclo latente [Rickinson y col., 2007]. Si bien se han descripto aproximadamente 85 ORFs en el genoma de EBV, para la gran mayoría de ellos aún no se ha descripto su función en el ciclo de la infección viral. Durante la fase replicativa o lítica del virus, se expresan todos los ORFs; que se clasifican en inmediatamente tempranos, tempranos y tardíos. Por su parte, durante el ciclo latente, el virus regula en forma negativa la expresión de sus genes y sólo expresa un subgrupo de ellos, los denominados genes de latencia, y de esta forma puede establecer una infección latente de por vida sin ser detectado por la inmunovigilancia del hospedador. Estos antígenos de latencia son: los cinco antígenos nucleares de Epstein Barr (*Epstein Barr Nuclear Antigens, EBNAs*), la proteína líder (*Epstein Barr Nuclear Antigen Leader Protein, EBNALP*), tres proteínas latentes de membrana (*Latent Membrana Proteins, LMPs*), los transcriptos de ARN no traducibles, (*Epstein Barr Encoded RNAs, EBERs*) y los transcriptos de ARN no traducibles expresados a partir del fragmento A de restricción por la enzima *Bam*HI (*Bam*HI *"A" Rightward Transcripts, BARTs*) [Rickinson y col., 2007]. Actualmente se han descripto cuatro programas de latencia asociados a la infección por EBV que dependen del tipo celular infectado (linfocito B virgen, de centro germinal o de memoria) y/o de la etapa del ciclo infectivo y de la patología asociada (Tabla 1) [Rickinson y col., 2007; Young y col., 2003].

Tabla 1: Programas de latencia de EBV

Programa de latencia	*Antígenos expresados*						*Condición asociada*
	EBERs/ BARTs	***EBNA1***	***LMP1***	***LMP2A***	***EBNA2***	***EBNA3s/ EBNALP***	
0	+	+/-	-	+/-	-	-	portador sano
I	+	+	-	-	-	-	LB CG
II	+	+	+	+	-	-	LH CNF
III	+	+	+	+	+	+	MNI, PTLD

Abreviaturas: LB: linfoma de Burkitt; CG: carcinoma gástrico; LH: linfoma de Hodgkin; CNF: carcinoma nasofaríngeo; MNI: mononucleosis infecciosa; PTLD: desorden linfoproliferativo post transplante.

1.1.2.1. Genes y antígenos del ciclo lítico

Estos antígenos se expresan ante una primoinfección o bien en el caso de una reactivación de la infección *in vivo* o una inducción *in vitro* de células infectadas latentemente. Si bien en los portadores sanos la mayoría de las células infectadas por EBV normalmente no expresan los antígenos de latencia, un pequeño porcentaje de ellas puede expresar el patrón de ciclo lítico, principalmente en orofaríngе, y dicho porcentaje puede aumentar en el caso de una reactivación.

Genes inmediatamente tempranos

Son los genes BZLF1 y BRLF1 que codifican para los antígenos Zta y Rta, respectivamente. Estos genes se transcriben inmediatamente luego de la infección, sin necesidad de síntesis *de novo* de proteínas virales y su expresión no se altera si se inhibe la síntesis de ADN viral. Estos antígenos poseen la capacidad de unirse a la región promotora de los genes virales tempranos y activar su transcripción, por lo cual actúan como factores de transcripción viral. Son los antígenos responsables del cambio desde la latencia al ciclo lítico, momento en el cual su activación desencadena una cascada de eventos que conllevan a la expresión secuencial de proteínas virales tempranas y tardías del ciclo lítico [Rickinson y col., 2007].

Genes tempranos

Entre estos se describieron a los genes BGLF5 (ADNsa alcalina), BARF1 y BORF2 (ribonucleótido reductasa), BXLF1 (timidina quinasa), BALF5 (ADN polimerasa), BALF2 (proteína putativa de unión al ADN), BMRF1 (pp47/54), BHRF1 (p17), BLRF2 (p23). Su expresión requiere la existencia de las proteínas inmediatamente tempranas y no se altera si se inhibe la síntesis de ADN viral. Codifican principalmente para enzimas involucradas en la replicación viral o proteínas transactivadoras de los genes tardíos [Rickinson y col., 2007].

Genes tardíos

Los genes virales BNRF1 (proteína de tegumento, p143), BCLF1 (antígeno de cápside viral, VCA, p150), BALF4 (gp 85) y BLLF1 (glucoproteína gp 350/220, ambas glucoproteínas, gp350 y gp220, se traducen desde el ARNm sin y con *splicing*, respectivamente). Se expresan, en general, luego de la síntesis de ADN viral. Codifican predominantemente para proteínas estructurales de las partículas virales y conforman el antireceptor de la molécula CD21 [Rickinson y col., 2007].

1.1.2.2. Genes y antígenos del ciclo latente

Antígenos nucleares EBNAs

EBNA1

El antígeno nuclear EBNA1 esta codificado por el gen BKRF1 y consiste en una proteína de 641 aminoácidos (aa) con capacidad de unirse al origen de replicación del episoma viral (OriP) a través de su dominio *core* de unión al ADN (aa 461-504) [Ambinder y col., 1991]. EBNA1 también posee la capacidad de interactuar con su propio promotor Qp y regular en forma negativa su propia expresión, así como regular en forma positiva la expresión del antígeno transformante LMP1 [Nonkwelo y col., 1996; Young y col., 2003]. Debido a que este antígeno es el que facilita la apertura del origen de replicación del episoma viral y en consecuencia posibilita su replicación durante la división del linfocito B, sumado a que garantiza la distribución equitativa del episoma las células hijas, EBNA1 es la única proteína viral consistentemente expresada en todos los tipos de latencia descriptos [Young y col., 2004]. EBNA1 es un antígeno pobremente reconocido por el sistema inmunitario del hospedador, lo que le permite al

virus mantener de forma exitosa la infección persistente. Se ha propuesto que una región repetitiva de Gly-Gly-Ala, de tamaño variable entre los distintos aislamientos y rodeada de dos dominios básicos, en la región aminoterminal de EBNA1 es la responsable de la baja inmunogenicidad de este antígeno. Inicialmente se postuló la capacidad de la zona repetitiva de interferir con la presentación antigénica vía HLA-I mediante la inhibición de la vía de degradación ubiquitina-proteosoma [Levitskaya y col., 1995]. Años más tarde, se describió la capacidad de esta zona de interferir con la elongación de la traducción de su propio ARNm y por ende disminuir la cantidad de antígeno a ser presentado por la vía HLA-I [Apcher y col., 2010]. Paralelamente se investigó sobre la posible participación de EBNA1 en el desarrollo de los procesos tumorales, ya que se describió la capacidad de inhibición de la apoptosis mediada por p53 en células tumorales y la capacidad de promover el desarrollo de linfomas de células B en ratones transgénicos para EBNA1 [Rowe y col., 2009; Wilson y col., 1996]. Sin embargo, hasta la fecha la participación de EBNA1 en los procesos neoplásicos no esta completamente dilucidada.

EBNA2

El antígeno EBNA2, codificado por el gen BYRF1, es esencial para la transformación celular dado que los aislamientos virales con deleciones en este gen son incapaces de inmortalizar linfocitos B *in vitro* [Cohen y col., 1989]. EBNA2 es una fosfoproteína ácida capaz de interactuar y modular la actividad de los factores de transcripción celular como RBPJκ, a través de la activación de las vías de señalización celular y el aumento de la expresión de moléculas marcadoras del linfocito B como CD23 y CD21. Además, posee actividad transactivadora sobre la transcripción de genes virales, entre ellos los genes que codifican para las LMPs. En este caso, la capacidad transactivadora no se ejerce a través de la unión al ADN del gen diana si no a través de la modulación de factores de transcripción celular. El oncogen celular *c-myc* también fue descripto como blanco de la transactivación por parte de EBNA2 y esto podría explicar, al menos en parte, su importancia en la transformación del linfocito B [Young y col., 2004].

Familia EBNA3

Los tres miembros de la familia EBNA3, EBNA3A, B y C, se caracterizan por tener un origen común y ser proteínas nucleares hidrofílicas con hepta repeticiones de leucina, isoleucina o valina que pueden actuar como dominios de dimerización. Estos antígenos están codificados por fusiones de los genes BLRF3, BERF1, BERF2a, BERF2b, BERF3 y BERF4, los cuales se disponen en tándem en el genoma viral. Los estudios realizados con EBV recombinantes carentes de cada uno de estos antígenos han demostrado que tanto EBNA3A como EBNA3C son fundamentales para el proceso de transformación de los linfocitos B. Por su parte, hasta el momento, no se demostró que EBNA3B resulte indispensable para los procesos de transformación celular u oncogénesis. De forma similar a EBNA2, todos los miembros de la familia EBNA3 interactúan y modulan a RBPJκ, pero estos últimos inhiben su capacidad de transactivar genes y por ende revierten la capacidad transactivadora de EBNA2. Una muy precisa regulación en la modulación del factor de transcripción RBPJκ por parte de EBNA2 y la familia de proteínas EBNA3 posibilita el control de la expresión de genes virales y celulares con promotores inducibles por RBPJκ [Young y col., 2003].

EBNALP

El antígeno EBNALP, también denominado como EBNA5, está codificado por la porción líder del ARNm de cada uno de los antígenos nucleares (EBNAs) y su tamaño varía dependiendo del número de repeticiones en la zona repetitiva *Bam*HI W (Figura 1) de cada aislamiento. Diversos ensayos *in vitro* han demostrado que posee la capacidad de interactuar con pRb y p53 [Jiang y col., 1991; Szekely y col., 1993]. Al mismo tiempo otro estudio demostró que este antígeno resultaría fundamental para el proceso de transformación de linfocitos B [Allan y col., 1992]; sin embargo, hasta la fecha el rol de este antígeno en la transformación de estas células no ha sido completamente esclarecido.

Antígenos latentes de membrana LMPs

LMP1

La proteína LMP1, codificada por el gen BNLF1, es considerada el oncogen de EBV debido a su capacidad de transformar fibroblastos de ratón *in vitro* [Wang y col., 1985] y promover el desarrollo de linfomas *in vivo* en ratones transgénicos para LMP1

[Kulwichit y col., 1998]. LMP1 es una proteína integral de membrana de 63 KDa que consta de tres dominios principales. El primero, el extremo amino terminal (N-ter) de 23 aa que orienta a la proteína hacia su localización en membrana plasmática, el segundo dominio (aa 24-186) esta compuesto por aa hidrófobos que posibilitan el anclaje a la membrana mediante seis pasajes sucesivos a través de ésta y finalmente un dominio carboxilo terminal (C-ter) citoplasmático (aa 187-386) que posee la capacidad de interactuar con proteínas celulares y activar diversas vías de señalización [Young y col., 2004]. A su vez dentro del C-ter se localizan dos dominios capaces de modular la vía de señalización mediada por NFκB [Huen y col., 1995]. Estos dominios se denominan CTAR1 y CTAR2 (*C-Terminal Activation Regions 1 y 2*, según sus siglas en idioma inglés). Los estudios previos demostraron la capacidad de LMP1 de actuar como un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) que se encuentra constitutivamente activado y estimular consecuentemente una serie de vías de señalización en forma independiente de ligando [Gires y col., 1997; Kilger y col., 1998]. Funcionalmente, LMP1 mimetiza al receptor celular CD40, lo cual le proporciona al linfocito B las señales anti apoptóticas necesarias para su crecimiento y diferenciación [Uchida y col., 1999] (analizado en extenso en [Vaysberg y col., 2008]). LMP1 también posee la capacidad de activar la vía de las MAP quinasas y la vía JAK/STAT. Dicha estimulación resulta en la interacción de los factores asociados a TNFR (TRAFs) directamente con CTAR1 o indirectamente por la unión los dominios de muerte de TNFR (TRADD) a CTAR2 [Shair y col., 2007; Young y col., 2004]. Se demostró que LMP1 puede activar también la vía de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) [Dawson y col., 2003]. Paralelamente, algunos estudios sugirieron que la región entre CTAR1 y CTAR2, denominada CTAR3, poseía la capacidad de interactuar con la proteína celular *Janus Kinase 3* (JAK3) [Gires y col., 1999]. Si bien en un principio se cuestionó la importancia de esta región para el proceso de transformación [Higuchi y col., 2002; Izumi y col., 1999], finalmente se demostró su capacidad de interactuar con factores celulares y promover la migración celular [Bentz y col., 2011].

LMP2

El ORF que codifica para las proteínas LMP2 contiene exones que están localizados en ambos extremos del genoma viral lineal de modo que sólo se puede expresar cuando el genoma se encuentra en su forma episomal fusionado por las terminaciones repetitivas. Las proteínas LMP2A y LMP2B, de 54 y 40 KDa respectivamente, son

codificadas por dos ARN mensajeros diferentes, pero transcriptos a partir del mismo gen. Cada uno de estos ARNm posee un promotor y un primer exón individual pero comparten los exones 2 a 9. Consecuentemente, las estructuras de ambas proteínas son similares; ambas poseen 12 dominios transmembrana y un residuo C-ter citoplasmático de 27 aa. Además, LMP2A posee un dominio citoplasmático N-ter de 119 aa con 8 residuos tirosina, producto del primer exón. En especial, dos de estas tirosinas (Y74 e Y85) poseen la capacidad de formar una estructura similar al motivo ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) presente en el receptor celular del linfocito B. Cuando este motivo ITAM se fosforila en presencia de un antígeno, se desencadena una cascada de señalización que estimula el crecimiento y diferenciación del linfocito B. La habilidad de LMP2A de interactuar con proteínas mediadoras de esta cascada como *src* y *syk*, a través de su motivo ITAM, conlleva al bloqueo de la señalización del receptor y en consecuencia a la inhibición del linfocito para crecer y diferenciarse, lo cual favorece la infección latente a largo plazo [Young y col., 2003; Young y col., 2004]. De manera simultanea, se describió la capacidad de LMP2A de modular otras vías de señalización como la vía Akt/PI3-K, NFκB y la vía de β-cateninas [Fukuda y col., 2007; Morrison y col., 2003; Stewart y col., 2004]. Por su parte la proteína LMP2B estaría involucrada en la regulación de LMP2A [Longnecker, 2000].

Ambas proteínas se expresan en linfocitos B transformados y en patologías tumorales como el carcinoma nasofaríngeo (CNF), el linfoma de Hodgkin (LH) y los desórdenes linfoproliferativos postransplante (PTLD).

Transcriptos no traducibles

EBERs

Dos pequeños ARN virales no poliadenilados, EBER1 y EBER2, se transcriben en todas las formas de latencia. Sin embargo, los EBERs no resultan fundamentales para el proceso de transformación de linfocitos B vírgenes. Estos dos transcriptos de ARN viral están codificados por secuencias adyacentes de considerable homología y existen en la célula infectada como complejos de ribonucleoproteínas. Son los transcriptos virales más abundantes, en el orden de $1x10^5$ a $1x10^6$ copias de EBERs por cada episoma viral presente. Los EBERs poseen la capacidad de interactuar con la proteína quinasa celular PKR, que media la respuesta celular por interferón y se ha sugerido que podrían rescatar a la célula infectada de la apoptosis inducida por esta vía [Nanbo y col., 2002]. Otros estudios han descripto que la transfección de EBERs en células EBV- aumenta los

niveles de expresión de IL10 [Kitagawa y col., 2000] y la capacidad de éstas para crecer en agar blando [Komano y col., 1999]. Si bien la participación de los EBERs en el proceso neoplásicos no está todavía completamente definida, estos estudios sugieren que podrían tener una participación más importante a la previamente considerada [Young y col., 2004].

BARTs

Los transcriptos BARTs se transcriben a partir del fragmento "A" de restricción por *BamHI* y fueron originalmente descriptos en muestras de CNF. Luego se los describió en otros procesos neoplásicos como el LB, LH, e incluso en las células mononucleares de pacientes sanos. Si bien no se conoce su función, su detección tanto en patologías tumorales como en portadores sanos sugiere su participación en la persistencia de la infección [Young y col., 2004].

1.1.3. Epidemiología y Replicación

El EBV es uno de los virus humanos más ampliamente distribuidos entre la población a nivel mundial donde más del 90% de los individuos adultos presenta indicios de infección pasada.

La forma más común de infección es a través de la saliva y, aunque se ha detectado ADN viral en la leche materna y las secreciones genitales [Enbom y col., 2001; Israele y col., 1991; Junker y col., 1991; Kapranos y col., 2003; Naher y col., 1992], la evidencia sobre la transmisión sexual es muy limitada [Perera y col., 2010].

En países en vías de desarrollo, como la Argentina, el primer contacto con el virus ocurre a temprana edad, generalmente luego de la desaparición de los anticuerpos protectores de origen materno y es casi universal hacia los 6 años de edad [Chan y col., 2001]. Un estudio serológico realizado por nuestro grupo de trabajo demostró que en Argentina la presencia de anticuerpos de tipo IgG anti antígenos de cápside viral (VCA) de EBV era detectable en aproximadamente el 80% de los niños menores de tres años [Chabay y col., 1999]. En estos casos la primo infección suele cursar de manera subclínica o con síntomas leves e inespecíficos y sólo, ocasionalmente, con la sintomatología típica del síndrome mononucleósico. Por el contrario, cuando la primoinfección por EBV se produce en la adolescencia o adultez temprana, como ocurre en los países desarrollados, suelen presentarse los síntomas típicos de la mononucleosis infecciosa en una gran proporción de los casos [Luzuriaga y col., 2010; Vetsika y col.,

2004; Vouloumanou y col., 2012]. Los factores socio económicos como el hacinamiento en la vivienda, la edad de escolarización y las condiciones de higiene, en general, serían los responsables de esta diferencia epidemiológica [Crawford, 2001].

En general no se han descripto diferencias consistentes en la distribución de EBV por sexos. Sin embargo, un estudio en niños en China describió que los varones son más susceptibles a la primoinfección durante el primer año de vida y esta tendencia se revierte significativamente hacia los dos años de edad [Chan y col., 2001]. Por otro lado se observó una distribución preferencial de la infección en los varones adultos en países desarrollados; sin embargo, se describió que las mujeres presentan títulos de anticuerpos ligeramente mayores y a menor edad que los varones [Higgins y col., 2007].

La entrada del virus al organismo del hospedador se da a través del epitelio orofaríngeo en donde el virus infecta a los linfocitos B vírgenes que expresan el receptor celular CD21 (Figura 2). Estos linfocitos B sufren un primer ciclo de replicación con producción de partículas virales infectivas, lísis celular e infección de nuevos linfocitos.

La infección primaria por EBV en general es eficientemente controlada, pero no eliminada por el sistema inmunitario, y resulta en el desarrollo tanto de inmunidad humoral como celular. Si bien se generan anticuerpos contra proteínas estructurales (VCA y gp350) y ciertos antígenos nucleares (EBNAs), la respuesta celular es la más importante en el control de la infección. Las células *natural killer* (NK), linfocitos T CD4+ y CD8+ son los responsables de controlar la población de linfocitos B infectados que se encuentran en proliferación [Cohen, 2000; Luzuriaga y col., 2010].

Luego de la infección primaria, al igual que otros herpesvirus, el EBV establece una infección latente y de por vida en los linfocitos B. Esta infección latente se caracteriza por la expresión limitada o nula de un grupo reducido de genes de latencia, lo cual le permite al virus escapar de la vigilancia del sistema inmunitario [Young y col., 2003]. El modelo actual de persistencia viral indica que el virus altera el patrón de expresión de sus antígenos de latencia de modo tal de impulsar la transformación del linfocito B virgen a un linfoblasto en proliferación para finalmente diferenciarse en linfocito B de memoria, imitando la proliferación y diferenciación estimulada por antígeno (Figura 2). Esta reacción de proliferación en la que el linfocito B virgen se diferencia en un linfocito B de memoria, de mayor vida media, ocurre en el centro germinal del ganglio linfático [Liu y col., 1997]. Durante la infección primaria, el virus expresa todos sus genes de latencia, latencia 3 (Tabla 1), y esto desencadena la activación del linfocito. Este programa de latencia es luego modificado por un programa en el que se regulan en

forma negativa la expresión de algunas de las proteínas de latencia y sólo se expresan los antígenos EBNA1, LMP1 y LMP2A (latencia 2). Estos dos últimos poseen la capacidad de imitar la estimulación por antígeno producida en el centro germinal y dirigir la diferenciación del linfocito hacia el estadio de diferenciación de memoria. Finalmente, la expresión de todos los antígenos virales es completamente silenciada (latencia 0) y sólo, ocasionalmente, durante la división del linfocito B de memoria el virus expresa el antígeno EBNA1, que es fundamental para la duplicación del genoma viral. De manera eventual, estos linfocitos de memoria se diferencian en células plasmáticas y es durante esta diferenciación cuando se activa la replicación viral con ensamblaje de partículas infectivas. De esta forma el virus puede propagarse hacia un nuevo hospedador, pero también infectar nuevos linfocitos vírgenes dentro del mismo individuo y así manera logra mantener la infección persistente [Thorley-Lawson y col., 2004].

Es esta infección latente la cual se relaciona con el desarrollo de patologías tumorales tanto de origen linfoide como epitelial. Entre las patologías linfoides asociadas a EBV mejor descriptas se encuentran el LH, el LB y los procesos linfoproliferativos asociados a eventos de inmunosupresión como los PTLD, los linfomas asociados a HIV o a inmunodeficiencias primarias. Entre las patologías epiteliales, se encuentran el CNF y cierta proporción de carcinomas gástricos (CG) y más recientemente se lo ha vinculado al carcinoma de mama [Delecluse y col., 2007; Hippocrate y col., 2011; Joshi y col., 2009; Lorenzetti y col., 2010b].

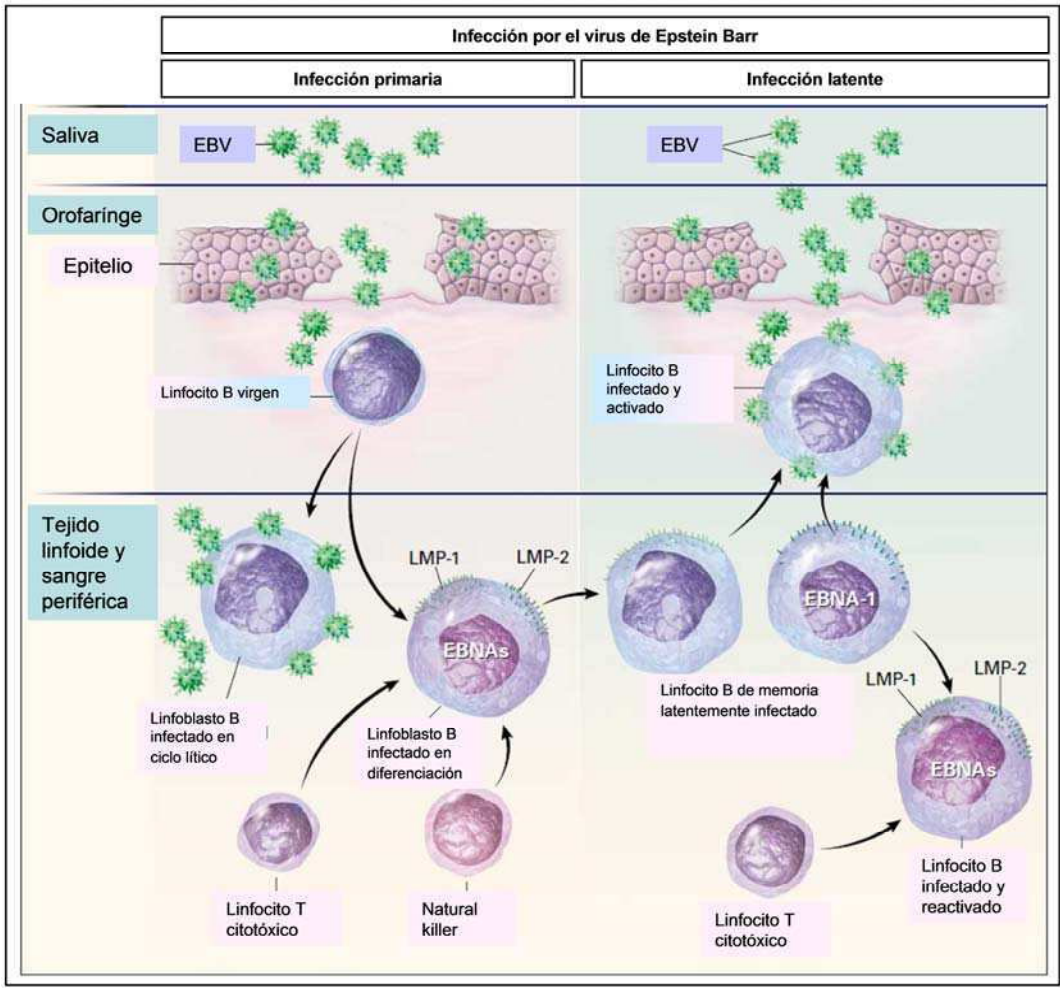


Figura 2: Modelo de infección por EBV en humanos. En orofaringe el EBV infecta linfocitos B vírgenes en el tejido linfoide. Durante la infección primaria el linfocito B sufre replicación lítica con expresión de todos los antígenos virales. La infección es controlada por el sistema inmunitario (CD8+ y NK) y el virus regula la expresión de sus antígenos y estimula la diferenciación del linfocito. En la convalecencia, el EBV infecta en forma latente los linfocitos B de memoria. Eventualmente, el virus se reactiva en uno de los linfocitos y entra en ciclo lítico, lo cual resulta en la liberación de virus infeccioso en la saliva. Adaptado de [Cohen, 2000].

1.1.4. Patologías asociadas al ciclo lítico de EBV

La mononucleosis infecciosa (MNI), también conocida como enfermedad del beso, es un síndrome clínico que está usualmente asociado a la infección primaria por EBV. El contagio ocurre predominantemente por la exposición a la saliva infectada [Higgins y col., 2007; Thorley-Lawson, 2001]. El período de incubación, desde la exposición al virus hasta el momento de aparición de los síntomas, se estima de 30 a 50 días y la replicación lítica en los linfocitos B asociados a la mucosa orofaríngea resulta en la liberación de partículas virales infectivas en la saliva [Luzuriaga y col., 2010]. El

proceso de liberación de virus infeccioso es muy dinámico y se ha descripto que dicho proceso continúa activo, aunque disminuido, hasta un año después de la primo infección [Hadinoto y col., 2009; Perera y col., 2010]. Luego, los linfocitos B de memoria latentemente infectados circulan de forma sistémica, pero sólo expresan un patrón muy restringido o nulo de genes de latencia y en consecuencia escapan a la vigilancia del sistema inmunitario. Se ha observado una respuesta inmunitaria exacerbada por parte de linfocitos T CD4+ y en especial de los linfocitos T CD8+ en pacientes con MNI la cual contribuye al control de la infección, pero también a los síntomas de la enfermedad [Hadinoto y col., 2009; Precopio y col., 2003]. A su vez, como consecuencia del control de la infección por parte de la respuesta inmunitaria, en general se observan valores variables de carga viral en el plasma en los pacientes con MNI. Esto indicaría que para el momento de aparición de los síntomas, la etapa de viremia ya fue controlada por el hospedador [Hadinoto y col., 2008]. En concordancia con esto, se describió que el pico de carga viral en el plasma de los pacientes con MNI decrece considerablemente luego del séptimo día del desarrollo de los síntomas, aunque parece haber una elevada variación entre pacientes en el tiempo de declinación del pico de viremia [Berger y col., 2001].

En países en vías de desarrollo la infección primaria por EBV suele ocurrir a temprana edad, luego de la desaparición de los anticuerpos protectores maternos. En estos casos la infección puede cursar de forma subclínica y sólo ocasionalmente se manifiesta como MNI. Por el contrario, en países desarrollados la infección primaria suele ser demorada hasta la adolescencia cuando el desarrollo de MNI es más frecuentemente [Luzuriaga y col., 2010; Vetsika y col., 2004].

Entre los criterios clínicos más frecuentes para establecer el diagnóstico presuntivo de MNI se encuentra la presencia de fiebre, faringitis y adenopatías cervicales anteriores y posteriores. Este cuadro clínico, de varios días de duración (2-3 semanas), suele estar acompañado por anorexia, decaimiento y cefalea. Los síntomas alcanzan la máxima intensidad al final de la primera semana y decaen progresivamente a lo largo de las siguientes semanas. La frecuencia de esplenomegalia descripta en el examen físico es variable, pero observable en el 100% de los casos mediante estudios por imágenes [Chan y col., 2001; Luzuriaga y col., 2010]. Otras manifestaciones tales como la obstrucción de las vías aéreas, ictericia, exantema palpebral y otras complicaciones hematológicas como anemia hemolítica, trombocitopenia o el síndrome urémico-hemolítico son poco frecuentes [Luzuriaga y col., 2010]. El exantema máculopapular es

frecuente en pacientes que han sido tratados con ampicilina o amoxicilina [Luzuriaga y col., 2010; Vetsika y col., 2004].

Dado que los síntomas clínicos característicos del síndrome mononucleósico pueden ser provocados por otros agentes patógenos, como el citomegalovirus (CMV) o el parásito *Toxoplasma gondii* (Tabla 2), es mandatario confirmar el diagnóstico clínico presuntivo mediante pruebas de laboratorio.

Tabla 2: Patógenos asociados al síndrome mononucleósico

Patógeno	***Proporción de casos***
virus de Epstein Barr	90%
citomegalovirus	7%
Toxoplasma gondii	1%
Primoinfección con HIV	Infrecuente
virus herpes humano 6	Infrecuente

Dentro de los exámenes de laboratorio, en el hemograma es común observar una marcada linfocitosis (≥60%) la cual es mayoritariamente debida a la expansión clonal de los linfocitos T CD8+ específicos para EBV. En el frotis de sangre periférica se observa un recuento elevado de linfocitos reactivos o atípicos (>10%) que acompaña a la linfocitosis. En el hepatograma, es frecuente apreciar alteraciones en los niveles de las enzimas alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa. Los parámetros hematológicos y hepáticos suelen normalizarse un mes después de la aparición de los síntomas [Luzuriaga y col., 2010; Vetsika y col., 2004].

La infección aguda por EBV se establece en los linfocitos B, que a su vez gatilla la estimulación y producción de una diversidad de anticuerpos dirigidos contra antígenos del propio virus y otros antígenos no relacionados, tales como eritrocitos de otras especies de mamíferos, sin exposición previa. Los anticuerpos dirigidos contra antígenos de otras especies se denominan anticuerpos heterófilos y pueden ser detectados mediante pruebas de aglutinación utilizando eritrocitos de cordero (reacción de Paul-Bunnell). Sin embargo, los falsos negativos son muy frecuentes en niños menores de 4 años [Luzuriaga y col., 2010; Vetsika y col., 2004; Vouloumanou y col., 2012].

Los anticuerpos de tipo IgM contra el antígeno de cápside viral (IgM-VCA) se desarrollan durante el período de incubación, están presentes al inicio de la enfermedad y persisten por 4-8 semanas. Estas IgM anti VCA en general, no se producen durante la reactivación por lo que su detección es indicativa de la infección primaria. Para confirmar un cuadro agudo de MNI por EBV, se debe estudiar la presencia de IgM VCA asociada a la ausencia IgM anti CMV y *Toxoplasma gondii*. La infección pasada por EBV se establece mediante la detección de anticuerpos IgG anti VCA [Luzuriaga y col., 2010; Vetsika y col., 2004].

Entre las complicaciones muy poco frecuentes que pueden suceder a la MNI se encuentra la infección activa crónica. Esta es un patología que se caracteriza por presentar los síntomas severos de la MNI por un período superior a los seis meses luego del diagnóstico inicial y por la presencia de títulos de anticuerpos anormalmente elevados [Cohen, 2000].

Otra patología infrecuente que sugiere un grave riesgo de vida para los pacientes con MNI es el síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X. Esta es una enfermedad hereditaria que afecta a varones con mutaciones en el gen *sh2d1a* (*SH2 domain-containing 1A*) presente en el cromosoma X [Palendira y col., 2011; Sayos y col., 1998; Tangye y col., 1999]. Las mutaciones en este gen interrumpen las señales normales de apoptosis en los linfocitos T CD8+ luego de la respuesta inmunitaria frente a EBV lo cual resulta en una proliferación desmedida de los linfocitos T CD8+ [Nagy y col., 2010].

1.1.5. Patologías tumorales asociadas al ciclo latente de EBV

Si bien más del 90% de la población mundial se encuentra infectada por EBV, la mayor parte de ella presenta una infección latente sin consecuencias clínicas relevantes. Más aún, muchas de las patologías tumorales asociadas a EBV se desarrollan en el contexto de la inmunosupresión, como los PTLD y los linfomas asociados a HIV, o poseen patrones de incidencia endémicos como el LB endémico y el CNF. Las causas que contribuyen al desarrollo de estos tumores no están del todo esclarecidas, pero es probable que factores tanto genéticos como ambientales puedan determinar la susceptibilidad a la infección de distintos tipos celulares y activar vías de señalización complementarias con el EBV que a su vez afecten el crecimiento celular. Por este motivo el EBV sigue siendo una variable a analizar en el desarrollo de muchos cánceres

en humanos y esto es lo que impulsa el estudio y la búsqueda de factores virales que sean exclusivamente inherentes a aquellos virus asociados a tumores.

Debido a su capacidad para transformar *in vitro* linfocitos B en reposo en líneas celulares linfoblastoideas [Nilsson y col., 1971] sumada a la capacidad de transformar fibroblastos de ratón y volverlos tumorales en un modelo *in vivo* [Wang y col., 1985], el EBV fue clasificado como agente carcinogénico tipo I en humanos en el año 1997 por la Organización Mundial de la Salud [IARC, 1997].

Una característica notable acerca de las patologías asociadas a EBV es la variación tanto en la incidencia de la patología como en la proporción de tumores EBV positivos en diferentes regiones geográficas (Figura 3).

El CNF posee una alta incidencia en el Sudeste Asiático, mientras que la misma en África del Norte es menor y es una entidad poco frecuente en América del Sur. Sin embargo, su estrecha relación con el EBV (100% de asociación) se observa en todas las regiones geográficas [Bray y col., 2008; IARC, 1997]. Por su parte, el LB es endémico en África ecuatorial donde la asociación con EBV es casi del 100%, mientras que su incidencia en otras regiones del mundo (LB esporádico) es menor y la asociación con EBV oscila desde el 20-30% en sociedades desarrolladas hasta un 90% observado en ciertas poblaciones, particularmente en el Noroeste de Brasil [Brady y col., 2008; Mbulaiteye y col., 2009]. Para el LH, la incidencia es elevada en Europa y América del Norte, pero menor en América del Sur y es poco frecuente en África y en el Sudeste Asiático. La asociación del LH con EBV parece variar según las condiciones socioeconómicas de la región estudiada ya que presenta un mayor porcentaje de asociación en países en vías de desarrollo con respecto a los desarrollados. Sin embargo, en la Argentina se observa un porcentaje de asociación similar al de los países desarrollados [Chabay y col., 2008; De Matteo y col., 2003; Dinand y col., 2006; Weiss, 2000].

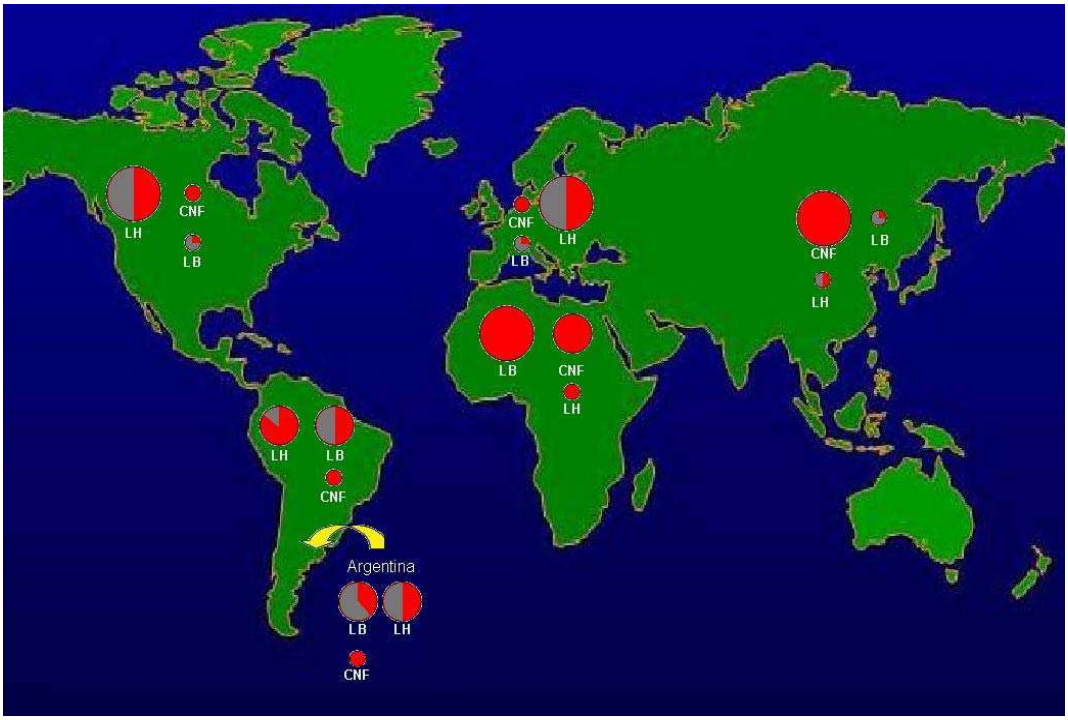


Figura 3: Incidencia de patologías neoplásicas asociadas al EBV y asociación entre dichas patologías y el virus. El tamaño del círculo representa la incidencia de cada patología en cada región geográfica. El color rojo representa el porcentaje de casos asociados a EBV en cada región.

1.1.5.1. Linfomas asociados a EBV

Los linfomas constituyen un grupo de patologías con características morfológicas, clínicas y epidemiológicas heterogéneas, pero que comparten la característica de ser derivados de un precursor linfoide. Las dos grandes categorías de linfomas comprenden el LH y los linfomas no Hodgkin (LNH). Dentro de los LNH se incluyen distintas entidades que son diferenciadas en base a características morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas y clínicas [IARC, 2008a]. En nuestro país, en pediatría, los linfomas constituyen el 15,8% de todos los tumores diagnosticados en pediatría [ROHA, 2011].

Linfoma de Hodgkin

El LH es el linfoma más frecuente en niños en nuestra región y se caracteriza por la pérdida focal o difusa de la arquitectura del ganglio linfático debido a la infiltración de comienzo interfolicular, polimorfa, compuesta por gran número de células inflamatorias y escasas células neoplásicas. Según datos del Registro Oncopediátrico Hospitalario

Argentino, Fundación Kaleidos (ROHA), el 42,5% de todos los linfomas pediátricos diagnosticados en Argentina entre los años 2000 y 2008 fueron LH [ROHA, 2011]. En la gran mayoría de los casos el LH se origina a partir de linfocitos B del centro germinal del ganglio. La célula maligna patognomónica del LH es la célula de Reed-Sternberg (RS) la cual se caracteriza por su gran tamaño y por ser bi o multinucleada. Estas células malignas constituyen alrededor del 2% de la masa tumoral y se encuentran rodeadas de linfocitos T y otras células inflamatorias (plasmocitos, eosinófilos, neutrófilos e histiocitos) [IARC, 2008a]. Dependiendo de la relación entre las RS y las células del infiltrado, el tipo de infiltrado y su distribución, el LH se clasifica en dos grandes categorías: predominio nodular linfocitario (5%) y linfoma de Hodgkin clásico (95%). A su vez este último se subclasifica en 4 subtipos histológicos: rico en linfocitos (30%), esclerosis nodular (<40%), celularidad mixta (25%) o depleción linfocitaria (5%) [Hjalgrim y col., 2007a; IARC, 2008a].

El LH constituye entre 10%-15% de todos los linfomas diagnosticados en la población general y si bien se presenta a nivel mundial, su incidencia es mayor en los países occidentales desarrollados y en grupos socioeconómicos altos (2-4/100.000 varones y 1,5-3/100.000 mujeres), mientras que sólo afecta a <1/100.000 habitantes en Asia sin presentar variación por sexo [IARC, 2002]. Se han descripto también variaciones geográficas relacionadas con la edad de presentación del LH. Mientras que en países desarrollados se observa una curva de edad de presentación bimodal con un pico a los 25-30 años y otro pico por encima de los 50 años, en países en vías de desarrollo se observa una alta incidencia a edades pediátricas (5-15 años) y luego nuevamente a edades cercanas a los 60 años [Chabay y col., 2008; De Matteo y col., 2003].

Asociación con EBV

El criterio fundamental para establecer la asociación del EBV con el LH es la presencia de transcriptos y antígenos virales en las células RS. Los estudios epidemiológicos, serológicos y moleculares sugieren que el EBV estaría involucrado en el desarrollo de al menos una proporción de los LH [IARC, 1997]. Los análisis poblacionales han descripto que el riesgo de desarrollar LH es entre dos y tres veces superior dentro de los dos años posteriores a sufrir MNI, la patología benigna asociada al EBV [Hjalgrim y col., 2008; Hjalgrim y col., 2007b]. El análisis retrospectivo de muestras de suero de pacientes con LH demostró que el título elevado de anticuerpos anti EBV precedía el desarrollo del LH [Mueller y col., 1989]. Finalmente, otros

estudios detectaron la expresión de EBERs, EBNA1, LMP1 y LMP2A, patrón de latencia II, en las células de RS [Deacon y col., 1993; Young y col., 2004]. Paralelamente, se describió la capacidad de los antígenos LMP1 y LMP2A de inducir la proliferación celular a través de la modulación de ciertas vías de señalización tales como la vía NFκB y AKT/PI3K [Fukuda y col., 2007; Hinz y col., 2002; Stewart y col., 2004]. Sin embargo, el papel del EBV en el desarrollo de esta patología no está del todo esclarecido dado que no todos los casos de LH están asociados a EBV. El porcentaje de asociación del LH con virus varía de acuerdo al desarrollo socioeconómico de la población; mientras que en países en vías de desarrollo este porcentaje es cercano al 90% [Kuppers, 2003], en países desarrollados es del 40% [Brauninger y col., 2006]. Tanto en pacientes pediátricos como adultos de Argentina, nuestro grupo describió un porcentaje de asociación cercano al 54% [Chabay y col., 2008; De Matteo y col., 2003].

Linfomas no Hodgkin

Los LNH incluyen a todos los tipos de linfomas a excepción del LH y en consecuencia constituyen un grupo de entidades diversas que varían significativamente en su presentación, morfología, origen histológico e inmunofenotipo, evolución clínica y tratamiento. En los países occidentales los LNH son la cuarta patología tumoral más frecuente en pacientes pediátricos representando el 10% del total de tumores pediátricos diagnosticados [Oschlies y col., 2006]. Según datos del ROHA el 57,5% de los linfomas pediátricos diagnosticados entre el 2000 y el 2008 en nuestro país fueron LNH [ROHA, 2011]. Estos linfomas a su vez se subclasifican según su ontogenia y maduración. De esta forma se definen los linfomas de ontogenia B y los de ontogenia T y a su vez de acuerdo a su origen en células precursoras o células periféricas (maduras). Según la última clasificación de la OMS los LNH fueron reclasificados y actualmente se han definido aproximadamente 70 nuevas entidades. Entre estas, las de mayor prevalencia en pacientes pediátricos son: i) linfoma difuso a grandes células B, ii) linfoma linfoblástico B y iii) LB; entre los de ontogenia B y iv) linfoma anaplásico a grandes células T, v) linfoma linfoblástico T y vi) linfoma T periférico; entre los de ontogenia T [IARC, 2008a].

Linfomas no Hodgkin B

Contrariamente a lo que ocurre en adultos, en niños, estos linfomas son casi exclusivamente patologías agresivas, de alto grado de proliferación y preferentemente con presentación extra ganglionar.

La incidencia del LNH B aumenta con la edad y los menores de 16 años sólo representan el 3% del total de pacientes en países desarrollados. Por otro lado, la incidencia en dichas poblaciones es mayor en varones que en mujeres, con una relación varón: mujer de 2:1 [ROHA, 2011]. Existen; sin embargo, grupos específicos con mayor riesgo de desarrollar dicha neoplasia como aquellos pacientes con inmudeficiencias primaria o adquirida en los cuales se estima que la función deficiente de linfocitos T es, al menos en parte, responsable de dicho aumento de incidencia [Sandlund y col., 1996].

Asociación con EBV

En lo que se refiere a su distribución geográfica, se observan diferencias según el origen geográfico de población en estudio. En África ecuatorial, por ejemplo, la mayoría de los linfomas que se presentan en niños son LB, por lo que se lo denomina Burkitt endémico, para diferenciarlo del Burkitt de otras regiones geográficas (Burkitt esporádico). Mientras que el LB endémico presenta prácticamente un 100% de asociación con EBV, el esporádico se encuentra asociado al virus hasta en el 90% de los casos en países en vías de desarrollo y sólo en el 20-30% en países desarrollados [Brady y col., 2008; Mbulaiteye y col., 2009]. En Argentina nuestro grupo describió una asociación de LNH pediátrico con EBV del 30% en el caso de pacientes inmunocompetentes y del 100% en pacientes inmunosuprimidos [Chabay y col., 2002]. En un estudio posterior, realizado en forma específica en LNH B y en el cual la serie de pacientes pediátricos fue mayor y se lo relacionó con la sobrevida del paciente, este porcentaje de asociación resultó del 40% [Chabay y col., 2011].

Linfomas no Hodgkin T

En niños los linfomas no Hodgkin T suelen presentarse en mediastino donde el timo puede encontrarse comprometido. Usualmente, en las biopsias presentan niveles muy variables de necrosis y/o apoptosis lo cual hace que el proceso de diagnóstico y clasificación sea complejo [Rizvi y col., 2006].

Presentan gran variación en cuanto a su distribución geográfica y etaria. Mientras que representan hasta el 18% de los linfomas diagnosticados en Asia, sólo representan

el 1,5% de los linfomas diagnosticado en países occidentales. Por otro lado, conforman el 10% de los LNH diagnosticados en adultos y el 50% en niños de países occidentales. Paralelamente, en países asiáticos representan hasta el 70% de los LNH de adultos y sólo el 30% de los pediátricos [IARC, 2002; Rizvi y col., 2006].

Asociación con EBV

La asociación con el EBV también es variable según la localización geográfica. Un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo en una serie de LNH T pediátricos reveló un porcentaje de asociación con EBV (8%) [Chabay y col., 2009], menor a lo previamente descripto en países asiáticos y de Medio Oriente (45-75%) [Huh y col., 1999; Jung y col., 2001; Noorali y col., 2003].

Enfermedad linfoproliferativa asociada a inmunosupresión

Los procesos linfoproliferativos devenidos en forma posterior a la administración de fármacos inmunosupresores luego de un transplante se conocen como desórdenes linfoproliferativos postransplante. También se observan desórdenes similares en pacientes con otras formas de inmunodeficiencia. Estas inmunodeficiencias pueden ser producto de trastornos genéticos (inmunodeficiencias primarias) o adquiridas (inmunodeficiencias secundarias), por ejemplo por infección con el virus de HIV [Thorley-Lawson y col., 2004]. La mayoría de estos procesos linfoproliferativos son de ontogenia B, y alrededor del 90% de estos desórdenes son EBV positivos. Se ha descripto que algunas de las células infectadas por EBV en este tipo de patología pueden manifestar la replicación lítica del virus, presumiblemente debido a la falta de control por parte del sistema inmunitario (Crawford, 2001).

1.1.5.2. Carcinomas asociados a EBV

Carcinoma nasofaríngeo

El hallazgo de un 100% de asociación entre el EBV y el CNF es una evidencia del posible rol etiológico del virus en dicha neoplasia [Young y col., 2003; Young y col., 2004]. Esta patología presenta muy alta incidencia en China y el sudeste asiático y esta marcada variación geográfica hace suponer la existencia de predisposición genética y de factores ambientales, como los componentes de la dieta, que serían factores etiológicos agregados al desarrollo de esta neoplasia [Thorley-Lawson y col., 2004; Young y col., 2003]. En nuestro país, el CNF es una patología de muy baja incidencia tanto en pacientes adultos como en pediátricos. Según los datos del ROHA, sólo se

diagnosticaron 24 casos de CNF pediátrico entre los años 2000 y 2008 en nuestro país [ROHA, 2011]. De manera similar con lo descripto para la región del sudeste de Asia, un estudio realizado por nuestro grupo de investigación describió una asociación del 100% entre el CNF indiferenciado pediátrico y el EBV en Argentina [Preciado y col., 2002].

Carcinoma gástrico

Los reportes de asociación entre el EBV y el CG varían del 4% al 18% según las localizaciones geográficas. Esta asociación varía además según los subtipos histológicos de CG. El EBV se asocia al 80% de los CG tipo linfoepitelioma mientras que sólo al 5-15% de los CG clásicos [BenAyed-Guerfali y col., 2011; Fukayama y col., 2011; Thorley-Lawson y col., 2004; Uozaki y col., 2008].

1.1.6. Variación genética del EBV

El EBV es detectado en todas las poblaciones en todas las regiones del planeta, pero con notables variaciones geográficas en cuanto a la distribución de genotipos virales y asociación con patologías.

Existen 2 tipos virales, EBV1 y EBV2, los cuales presentan gran homología a lo largo de la mayor parte del genoma, pero presentan polimorfismos en algunos de los genes de latencia, principalmente EBNALP, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B y EBNA3C [Dambaugh y col., 1984; Dolan y col., 2006; Sample y col., 1990]. Ambos tipos virales son detectados en todas las latitudes; sin embargo, mientras que EBV1 es el tipo predominante en América, Europa y Asia, el EBV2 lo es en África ecuatorial y la Polinesia [Rickinson y col., 2007]. Cuando los estudios poblacionales se combinan entre sí, los resultados demuestran que el 74% de la población caucásica está infectada con EBV1, el 19% con EBV2 y sólo el 7% está coinfectado con ambos tipos virales [Chang y col., 2009].

Si bien inicialmente se postuló que el EBV1 poseía mayor potencial oncogénico debido a que resultaba un mejor agente transformante de linfocitos B, *in vitro*, y a que se detectaba con frecuencia en patologías tumorales; hoy se asume que la asociación de ambos tipos virales con las diferentes patologías simplemente refleja la prevalencia viral en cada región geográfica [Chang y col., 2009].

Además de esta primera y amplia clasificación, la cual no puede reflejar la totalidad de la variación natural del EBV, se han descripto variantes y subvariantes basadas en

polimorfismos detectados en diferentes genes virales, entre los cuales se destacan los genes que codifican para EBNA1, LMP1 y la región promotora del gen BZLF1 [Chang y col., 2009].

1.1.6.1. Variantes de la región del promotor del gen BZLF1

El gen BZLF1 codifica para la proteína reguladora ZEBRA (*Bam*HI *fragment* Z EBV *Replication Activator*), también denominada Z, Zta o EB1 (Figura 4A). Esta proteína es la responsable de la fina regulación entre el ciclo lítico y el latente, y su sola inducción alcanzaría para desencadenar la cascada de señales que conllevan al desarrollo del ciclo lítico [Rickinson y col., 2007]. El estudio de diferentes polimorfismos de este gen se ha utilizado para definir variantes virales; sin embargo los diferentes enfoques han abordado el análisis de diversas regiones del gen, lo cual dificulta la comparación de variantes entre los trabajos. Por ejemplo, Packham y col., describieron variaciones en el número de repeticiones de un fragmento de 29 pb en el intrón 1 del gen [Packham y col., 1993] y Ji y col., describieron polimorfismos puntuales en la región codificante (Figura 4A) [Ji y col., 2008]. Otros autores han analizado los polimorfismos puntuales en la región del promotor de este gen (Zp), en el fragmento que abarca desde el -221 hasta el +1 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (Figura 4A), dado que en esta región se ha descripto una gran variedad de dominios reguladores capaces de interactuar con proteínas celulares y con la propia ZEBRA en respuesta a múltiples señales (Figura 4B) [Shimizu y col., 1993; Yu y col., 2007].

La estructura de esta región del promotor se organiza en una primera porción que consta de cuatro dominios ricos en AT denominados ZIA-D los cuales poseen la capacidad de unión a los factores de transcripción celular Sp1, Sp3 y al factor potenciador específico de miocitos 2D (MEF-2D, del inglés *myocyte-specific enhancer factor 2D*). Luego, una segunda porción, denominada ZII, posee homología de secuencia con la región de unión de los factores celulares ATFs, CRE/AP-1 y C-Jun y finalmente una tercera porción que consta de dos dominios de unión de alta afinidad, ZIIIA y ZIIIB, por ZEBRA [Feng y col., 2007; Yu y col., 2007].

En base a los polimorfismos de esta región se han descripto hasta el momento 6 variantes, algunas de las cuales estarían asociadas en forma preferencial a patologías tumorales y otras presentes en la población normal. Inicialmente, Gutiérrez y col. describieron tres de estas variantes y las nombraron de acuerdo a la región analizada

(Zp) seguida de una "P" en el caso de la variante "Prototipo" (Zp-P); o una "V" por "Variante" y luego un "3" por contener 3 variaciones puntuales (Zp-V3). De igual forma describió la variante Zp-V4 [Gutiérrez y col., 2002]. La variante Zp-P es considerada la variante prototipo por ser la que corresponde al genoma viral de la línea celular de referencia, B95.8 [Gutiérrez y col., 2002]. A su vez, la variante Zp-V3 difiere de la secuencia patrón en las posiciones -141 (A→G), -106 (A→G) y -100 (T→G). La variante Zp-V4 posee estas mismas mutaciones más una adicional en -196 (T→C) [Gutiérrez y col., 2002]. Posteriormente se describieron otras variantes adicionales, la variante Zp-PV, Zp-V3+118, Zp-V1 [Jin y col., 2010; Martini y col., 2007; Tong y col., 2003]. Estas variantes de Zp también demuestran variación en cuanto su relación con patologías asociadas a EBV y su distribución geográfica. Mientras que la variante Zp-P parece predominar en América, Europa y Asia, la variante Zp-V3 estaría preferentemente asociada a tumores y la variante Zp-V4 a portadores sanos, más allá del origen geográfico de los aislamientos en los que se las detectó [Gutiérrez y col., 2002; Martini y col., 2007; Tong y col., 2003].

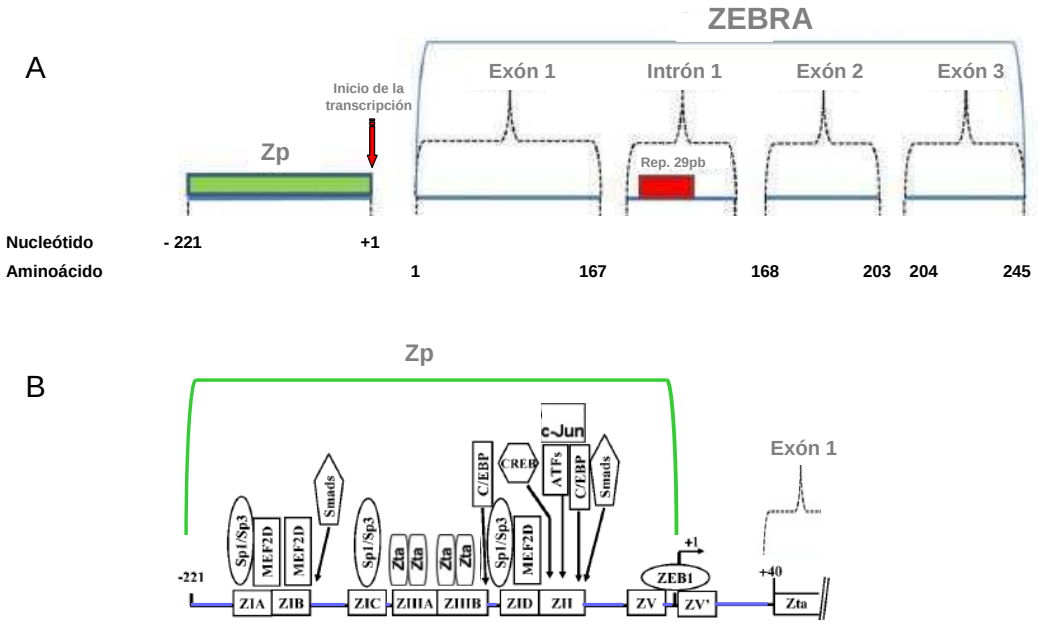


Figura 4: A) Esquema de la proteína ZEBRA y su región promotora Zp (verde). Se observa la zona de repeticiones de 29 pb en el intrón 1 (rojo), y el sitio de inicio de la trascripción (flecha roja). Las variantes de Zta han sido principalmente caracterizadas según polimorfismos puntuales en su región promotora y número de repeticiones en el intrón 1. Adaptado de [Chang y col., 2009]. **B)** Región reguladora de Zp donde se muestran los dominios reguladores y sus factores asociados. Adaptado de [Yu y col., 2007].

1.1.6.2. Variantes de EBNA1

EBNA1 es una proteína de 641 aa que incluye una región repetitiva de Gly-Gly-Ala que sería responsable de la baja inmunogenicidad de la proteína. Posee además en su extremo carboxiterminal un dominio *core* con capacidad de unión al ADN y es indispensable para asegurar la distribución equitativa del episoma viral entre las células hijas durante la división del linfocito y minimizar así la pérdida de células infectadas (Figura 5) [Ambinder y col., 1991]. Actualmente se han descripto mutaciones puntuales en la región amino terminal; sin embargo, la gran mayoría de los estudios se han centrado en la región carboxilo terminal dada la presencia de la región *core*. Las variantes de la región carboxiterminal de EBNA1 fueron originalmente descriptas en base a mutaciones puntuales en el codón 487, al cual se definió como un punto caliente por presentar un elevado número de sustituciones (Figura 5) [Bhatia y col., 1996]. Las variantes de EBNA1 comenzaron a definirse en base al aa codificado por a este codón y hasta la fecha se han descripto seis de ellas. La variante denominada P-ala, donde "P" significa prototipo y "ala" corresponde al aa alanina codificado por el codón 487, es considerada la variante prototipo por ser la que corresponde al genoma viral de la línea celular de referencia, B95.8 [Bhatia y col., 1996]. Asimismo se describió la variante P-thr, considerada también prototípica por ser similar a P-ala, excepto por poseer un residuo treonina en el codón 487. Adicionalmente se describieron otras cuatro variantes de EBNA1 denominadas con la letra "V", por variante, y a continuación el aa codificado por el codón 487: V-leu, V-val, V-pro y V-ala [Bhatia y col., 1996; MacKenzie y col., 1999]. Es importante mencionar que si bien la variante V-ala posee un residuo alanina en la posición 487, acumula además una cantidad de mutaciones suficientes como para ser considerada como una variante de P-ala [MacKenzie y col., 1999]. Desde el inicio de la clasificación de variantes de EBNA1, numerosos estudios han descripto nuevas mutaciones puntuales a partir de distintos tipos de aislamientos de pacientes, lo cual ha dado origen a una gran cantidad de nuevas subvariantes dentro de las seis variantes principales [Bhatia y col., 1999; Chen y col., 1999; Do y col., 2008; Fassone y col., 2000; Gutiérrez y col., 1997; Gutiérrez y col., 1998; Habeshaw y col., 1999; MacKenzie y col., 1999; Mai y col., 2007; Sandvej y col., 2000; Wang y col., 2003; Zhang y col., 2004]. Como consecuencia de estos estudios se postuló, inicialmente, la asociación en forma exclusiva de ciertas variantes, como V-leu, a tumores [Bhatia y col., 1999; Bhatia y col., 1996; Gutiérrez y col., 1997; Gutiérrez y col., 1998]. Sin embargo, luego esta misma variante fue descripta también en células

mononucleares de sangre periférica (CMSP) y secreciones faríngeas (SF) de pacientes sanos en África y América del Norte, por lo que entonces se postuló la circulación preferencial de la variante en estas regiones geográficas más allá de la patología estudiada [Chen y col., 1998; Habeshaw y col., 1999; MacKenzie y col., 1999]. Esta teoría fue reconfirmada cuando se describió la variante V-val en muestras patológicas y normales de Asia, pero no se encontró en América del Norte, Europa ni África [Ai y col., 2012; Chen y col., 1998; Do y col., 2008; Sandvej y col., 2000; Wang y col., 2003; Wang y col., 2002; Wang y col., 2010; Zhang y col., 2004]. Además, los datos sobre dichas variantes en América del Sur son muy escasos lo cual imposibilita el arribo a una conclusión certera acerca de la distribución geográfica y/o la asociación de estas variantes con patologías tumorales [Chang y col., 2009; Chang y col., 1999; Greiner y col., 2000; MacKenzie y col., 1999].

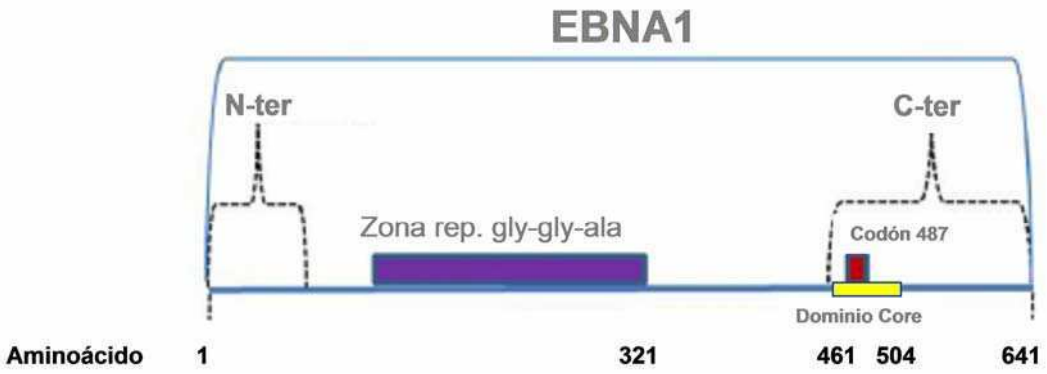


Figura 5: Esquema de la proteína EBNA1 donde se observan las regiones N-ter y C-ter, la zona repetitiva (violeta), el dominio *core* (amarillo) y el codón 487 (rojo). Las variantes de EBNA1 han sido caracterizadas en base al amino ácido codificado por el codón 487. Adaptado de [Chang y col., 2009].

1.1.6.3. Variantes de LMP1

La proteína LMP1 es considerada el primer oncogén viral y es probablemente la proteína más ampliamente estudiada [Kulwichit y col., 1998; Rickinson y col., 2007; Wang y col., 1985]. Mediante diferentes enfoques metodológicos se han definido variantes tanto en el extremo N-ter como en el C-ter, pero la falta de consenso en la nomenclatura de estas variantes hace imposible la integración de los resultados publicados. La pérdida del sitio de restricción de la enzima *Xho*I en el N-ter, evaluada mediante RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*, por su sigla en idioma inglés) es uno de los polimorfismos utilizados para definir variantes (Figura 6). Por su

parte, mediante secuenciación de ADN se han estudiado polimorfismos puntuales, la pérdida de 30 pb (del30) y el número de unidades repetitivas de 33 pb (rep33) en el extremo C-ter (Figura 6) [Chang y col., 2009]. La región rep33 puede contener además una inserción de 15 pb (ins15) en la tercera repetición. Frecuentemente, las variantes definidas en el extremo N-ter no se correlacionan con las variantes definidas en el extremo C-ter lo cual indica una alta tasa de recombinación entre ambos extremos. Más aún, se ha postulado que la región repetitiva de 33 pb provee un marco genético apropiado para que esto ocurra [Guiretti y col., 2007].

Aún cuando la mayoría de los estudios se centran en la región C-ter de LMP1, la comparación entre las variantes publicadas resulta dificultosa debido a que se han utilizado principalmente dos nomenclaturas para designarlas. Uno de los sistemas de clasificación se basa en la presencia de aa específicos en posiciones clave para definir 8 variantes principales: B95.8 (genoma patrón de EBV), Med+ (aislamiento Mediterráneo con deleción de 30 pb), Med- (aislamiento Mediterráneo sin deleción de 30 pb), China1 (1^{er} aislamiento de la China), China2 (2^{da} aislamiento de la China), China3 (3^{er} aislamiento de la China), NC (aislamiento de Carolina del Norte) y Alaskan (aislamiento de Alaska) [Edwards y col., 1999]. Luego se describieron variantes relacionadas, las cuales fueron denominadas SAE1 (aislamiento *South East Asia 1*) y SAE2 (aislamiento *South East Asia 2*) [Nguyen-Van y col., 2008; Saechan y col., 2006]. En el otro esquema de clasificación se describieron 4 variantes de LMP1 en base a la presencia de mutaciones y de la deleción de 30 pb en el C-ter: A, B, C y D [Sandvej y col., 1997]. Es importante destacar que mientras que el primer sistema de clasificación mencionado contempla mutaciones en todo el fragmento C-ter, el segundo se basa en fragmentos cortos a ambos lados de la zona repetitiva y fragmentos en el extremo N-ter y en la región del promotor. Con respecto a la distribución geográfica de estas variantes y su asociación a patologías tumorales, los resultados son diversos. En la gran mayoría de los estudios se pone especial énfasis en la deleción de 30 pb. En los tumores asociados a EBV, la variante delecionada de LMP1 se halló en 10-30% de LH europeos y en 80% de LH mexicanos; además se encontró en un 100% de linfomas T periféricos de Malasia, 60% de los de Dinamarca, y 86% de los de China. En lo que respecta a los LNH, fue hallada en un 20% de LB y en un 71% de LNH agresivos. No obstante, esta variante del30 se describió también en hiperplasias reactivas en porcentajes similares a los hallados en neoplasias de la misma región geográfica, mientras que otros indicaron que la variante delecionada se encuentra en bajo porcentaje en tejido no neoplásico

[Zhou y col., 2001]. Nuestro grupo de trabajo ha publicado una asociación estadísticamente significativa entre la del30 y neoplasias como el LH, LNH y CNF [Chabay y col., 2004; Guiretti y col., 2007]. Estos resultados conflictivos entre los diferentes autores indican que aún no está esclarecido si la prevalencia de la variante delecionada de 30 pb en algunas patologías refleja simplemente la circulación de estas variantes en ciertas regiones geográficas, o si se debe a interacciones particulares entre el virus y su hospedador, que llevan a la producción aumentada de las mutantes delecionadas las que podrían desencadenar *a posteriori* el desarrollo una neoplasia.

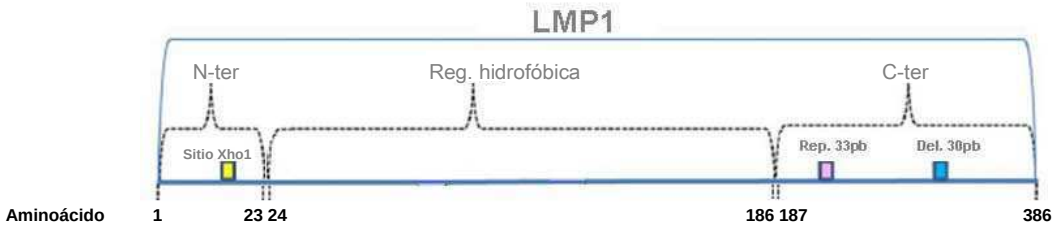


Figura 6: Esquema de la proteína LMP1 donde se observan las regiones N-ter, la región hidrófoba transmembrana, la región C-ter, el sitio de clivaje de *Xho*I (amarillo), la zona de repeticiones de 33 pb (rosa) y la zona de la deleción de 30 pb (celeste). Las variantes de LMP1 han sido caracterizadas principalmente en base a pérdida del sitio de restricción *Xho*I, la deleción de 30 pb y la zona repetitiva de 33 pb. Adaptado de [Chang y col., 2009].

Resulta muy importante destacar que la gran mayoría de los estudios de variantes virales de EBV realizados hasta la fecha, a nivel mundial, incluyeron pacientes adultos, ya sea con patologías malignas asociadas a EBV o portadores sanos. Este tipo de diseño no permite estudiar la variante viral infecciosa original, dado que el adulto a menudo presenta coinfección con múltiples variantes virales quizás como consecuencia de sucesivas reinfecciones. Por otra parte, en países en vías de desarrollo se observa un perfil característico de la infección primaria por EBV; sin embargo, son escasos los estudios de variantes virales en estos grupos poblacionales. Finalmente, sólo un trabajo reciente de la región geográfica de China [Ai y col., 2012] muestra el análisis integrado de las variantes de dos genes de EBV en el contexto de la patología benigna (infección lítica) y maligna (infección latente).

2. HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

Construcción de la hipótesis

Dado que

a) la infección primaria por EBV en países en vías de desarrollo presenta características epidemiológicas propias

b) se demostró que en pacientes adultos la distribución de las variantes virales muestra diferencias entre los distintos compartimentos anatómicos del hospedador

c) se observó la presencia de variantes del antígeno LMP1 y promotor de BZLF1 más frecuentemente asociadas a tumores

d) se describieron, en pacientes adultos, variantes del gen BKRF1 estrechamente relacionadas con el origen geográfico del virus

Hipótesis de trabajo:

Entre las variantes de los diferentes genes virales existen algunas que presentan un tropismo diferencial por los distintos compartimentos, otras que circulan preferentemente por ciertas regiones geográficas y ciertas variantes que tienen mayor potencial oncogénico y se vinculan al desarrollo de las neoplasias.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

General:

Caracterizar la presencia y distribución de las variantes de los genes virales BNLF1, BZLF1 y BKRF1 en la infección primaria por el EBV en pacientes pediátricos y compararlos con la presencia de las variantes de dichos genes virales en linfomas pediátricos asociados a EBV.

Específicos:

I) Caracterizar el tipo viral y las regiones polimórficas presentes en los genes virales BNLF1 (codifica LMP1), BKRF1 (codifica EBNA1) y en la región promotora del gen BZLF1 en: **i)** muestras de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y secreciones faríngeas (SF) de pacientes con infección aguda (lítica) por EBV al momento del diagnóstico (D0), al mes (D30) y a los 3 meses durante la convalecencia (D90), **ii)** muestras de biopsia ganglionares de linfomas EBV+ (infección latente).

II) Identificar y comparar las variantes virales detectadas en la infección primaria y en linfomas, con el fin de establecer si existen variantes relacionadas con el desarrollo de tumores EBV+.

III) Analizar la dinámica de distribución de las variantes moleculares de dichos genes en diferentes compartimentos en un mismo paciente durante el curso natural de la infección: D0, D30 y D90.

IV) Profundizar el análisis mediante el clonado de aquellas muestras que presenten indicios de coinfección por secuenciación directa.

V) Determinar la carga viral por PCR en tiempo real durante el curso de la infección, con el fin de establecer si la presencia de alguna variante particular se relaciona con el nivel de viremia.

VI) Definir si se observa un patrón característico de variantes de EBV propio de nuestra región geográfica por comparación con aquellas descriptas para otras regiones del mundo.

VII) Integrar para cada aislamiento la información molecular referente a la caracterización de las variantes de cada gen a fin de describir más ampliamente los arreglos genómicos presentes en la infección lítica y latente, y establecer posibles asociaciones de polimorfismos entre estos genes.

4. METODOLOGÍA

4. METODOLOGÍA

4.1. Población en estudio

Durante el período 2007-2011, se enroló un total de 29 pacientes pediátricos con sintomatología clínica compatible con el síndrome mononucleósico que concurrieron al Servicio de Consultorio Externo del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. El diagnóstico presuntivo de MNI fue realizado por los médicos de dicho servicio sobre la base de los criterios clínicos de acuerdo a la sintomatología presentada por los pacientes al momento de la consulta. Finalmente, en este proyecto se incluyeron 15 pacientes pediátricos con diagnóstico confirmado de MNI, los cuales fueron incorporados al estudio durante el mencionado período. Ninguno de estos pacientes presentó coinfección con HIV, CMV ni *Toxoplasma gondii.* El período promedio transcurrido entre la aparición de los síntomas y la toma de muestras para el diagnóstico fue de aproximadamente 9 días con un rango de 7 a 15 días. El rango de edades fue de 2 a 17 años con una mediana de 4 años y la distribución por sexos fue de 8 mujeres y 7 varones.

Se utilizó como criterio de inclusión la presencia de anticuerpos de tipo IgM anti VCA y la ausencia de anticuerpos IgM anti CMV y *Toxoplasma gondii* en el suero de los pacientes estudiados.

Paralelamente, en el mismo período, se diagnosticaron en el Servicio de Anatomía Patológica 62 nuevos casos de linfomas pediátricos, 29 (46,77%) LH y 33 (53,23%) LNH. Veinte de estos linfomas, 14 LH y 6 LNH, de los que se contaba con muestra en fresco y además resultaron asociados a EBV fueron incluidos en este trabajo. Ninguno de estos pacientes presentó coinfección con HIV y 2/20 tenían diagnóstico de inmunodeficiencia primaria (T1 y T3)

Las muestras de biopsias ganglionares tomadas al momento de realizarse el diagnóstico inicial de la enfermedad fueron revisadas por al menos dos patólogos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, y la tipificación del linfoma se realizó de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [IARC, 2008b]. Dentro de los LNH se incluyeron, 4 linfomas difusos a grandes células B, 1 linfoma de Burkitt y 1 linfoma anaplásico a grandes células T. El rango de edades para estos pacientes fue de 3 a 18 años con una mediana de 7 años y la distribución por sexos fue 9 mujeres y 11 varones.

Como criterio de inclusión se estableció la presencia de EBERs por hibridación *in situ* en las células tumorales.

Este proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Bioética y del Comité de Docencia e Investigación del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (Apéndices A y B). Sólo se incluyeron en este estudio aquellas muestras de los pacientes cuyo madre/padre o tutor haya firmado un consentimiento informado escrito (Apéndice C). Adicionalmente se solicitó a los niños mayores de 7 años la firma de un asentimiento escrito (Apéndice D).

4.2. Muestras

De los pacientes con diagnóstico presuntivo de MNI se tomaron, al momento del diagnóstico (D0) una muestra de 6 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA y una muestra de sangre periférica en tubo seco, obtenidas por venopunción, y una muestra de SF obtenida mediante hisopado de fauces. Sólo en aquellos casos en los que el diagnóstico presuntivo de MNI fue confirmado, se obtuvieron nuevas muestras de sangre periférica y secreciones faríngeas al mes (D30) y a los 3 meses (D90) del diagnóstico con el fin de estudiar la dinámica de distribución de las variantes de EBV en los distintos compartimentos del hospedador tanto en la infección aguda como en su convalecencia. Las muestras de seguimiento (D30 y D90) de 3 pacientes no estuvieron disponibles debido a que no se presentaron a las consultas pautadas por el equipo médico. Otro paciente no concurrió a la última consulta.

En el caso de los pacientes con linfoma, las biopsias ganglionares se tomaron al momento del diagnóstico previo a la administración del tratamiento correspondiente. El diagnóstico y la clasificación histológica de los linfomas fueron realizados por los patólogos de la División de Anatomía Patológica de nuestro hospital.

4.3. Preparación de las muestras

Las muestras de sangre periférica anticoagulada se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 min. y se tomaron luego 0,5 ml de plasma. Las alícuotas de plasma se conservaron a -80 C hasta su procesamiento.

Con el objetivo de aislar las CMSP, la muestra de sangre restante se homogeneizó y diluyó al medio con solución salina tamponada de fosfatos (PBS) estéril y en condiciones de esterilidad. La muestra diluida se sembró sobre un colchón de *Ficoll-*

Paque plus (GE Healthcare, Suecia) y centrifugó a 1.400 rpm durante 30 min. Se recuperó el halo correspondiente a las CMSP y estas se lavaron dos veces con PBS estéril. Luego del último lavado, las células se conservaron a -80°C en 200 µl de PBS.

Las muestras para obtención de suero se centrifugaron a 2.000 rpm por 10 min. y de ellas se separó una alícuota de 0,5 ml de suero que se conservó a -80°C hasta su procesamiento.

El material de la biopsia ganglionar se seccionó y una parte se fijó en una solución de formol 4%, se deshidrató mediante pasajes sucesivos en concentraciones crecientes de etanol (70%, 95% y 100%), xilol y finalmente se incluyó en parafina. Otra porción del material se conservó a -80°C para su posterior tratamiento.

4.4. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se utilizó la alícuota de suero conservada a -80°C para determinar la presencia de anticuerpos de tipo IgM e IgG anti VCA de EBV. Brevemente, para la determinación de anticuerpos de tipo IgM se incubaron 10 µl de suero durante 30 min. a temperatura ambiente con 10 µl de reactivo de unión a IgG con el fin de precipitar los anticuerpos de tipo IgG específicos contra VCA y también los posibles anticuerpos de tipo IgM del factor reumatoideo. Luego la muestra se centrifugó a 5.000 rpm durante cinco min. y 10 µl del sobrenadante se recuperaron y colocaron en un pocillo de una impronta comercial para la detección de VCA (*Bion Enterprises, USA*). Dichas improntas poseen en cada pocillo una mezcla de células linfoblastoideas EBV+ (línea celular P3HR1) y células B normales EBV-.

En cada determinación se incluyó como control positivo una muestra de suero de un paciente pediátrico IgM positivo para VCA previamente determinado y como control negativo una muestra de suero de un paciente con serología específica negativa. La impronta se incubó a 37°C durante 90 min. y luego se realizaron dos lavados de 5 min. con PBS y un lavado con agua destilada. Sobre cada pocillo se colocaron 20 µl de anticuerpo secundario anti IgM humano conjugado con FITC (*Dako cytomation, USA*) y se incubó la impronta a 37°C durante 30 min. Se realizaron dos lavados con PBS y uno con agua destilada y se realizó el montaje con un medio comercial acuoso (*Dako cytomation, USA*). La visualización de la impronta se realizó con un microscopio de fluorescencia (*Carl Zeiss, Alemania*) utilizando un filtro adecuado para FITC. El criterio

de positividad se estableció como la presencia de al menos dos células positivas por campo visualizado con un objetivo 40x.

Al momento de determinar la presencia de anticuerpos de tipo IgG anti VCA se omitió el paso de pretratamiento con el reactivo de unión a IgG y luego se procedió de forma similar a lo previamente descripto. Para la detección se utilizó anticuerpo secundario anti IgG humano conjugado con FITC (*Dako cytomation, USA*).

Para la determinación de anticuerpos de tipo IgM anti CMV se utilizó el mismo protocolo de incubación y se utilizaron improntas comerciales con la línea celular L929, CMV+ (*Bion Enterprises, USA*).

4.5. Enzimoinmunoensayo para *Toxoplasma gondii*

La detección de anticuerpos de tipo IgM anti *Toxoplasma gondii* en el suero de los pacientes con MNI fue realizada con el equipo comercial *Vidas Toxo IgM* (*bioMérieux, Francia*). La técnica, totalmente automatizada, se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante en un autoanalizador MiniVidas (*bioMérieux, Francia*).

4.6. Hibridación *in situ* para EBERs

Esta técnica fue realizada sobre cortes histológicos fijados en formol e incluidos en parafina utilizando el equipo comercial *PNA ISH Detection Kit* (*Dako cytomation, USA*) según las instrucciones del fabricante. Previamente los cortes de las biopsias se montaron sobre portaobjetos pretratados para facilitar su adherencia. Se procedió a desparafinar los cortes histológicos mediante pasajes sucesivos por xilol y etanol, comenzando por xilol 100% y finalizando con etanol al 70%. Cada corte histológico se trató luego con una solución de proteinasa K 5 µg/ml en PBS durante 20 min. a 37°C y se lavó con agua destilada. La hibridación se realizó con 2 sondas de oligonucleótidos de 30 bases complementarias específicas para los fragmentos EBER1 y EBER2 (*Dako cytomation, USA*), conjugadas con FITC. Los EBERs se transcriben en el orden de 10^6 por episoma viral y por ello permiten la detección con gran sensibilidad de la presencia del EBV. La reacción de hibridación se realizó a 55°C durante 90 min. Luego de un lavado de 25 min. a 55°C con una solución astringente provista por el fabricante, se incubó cada muestras con un anticuerpo anti FITC conjugado con la enzima fosfatasa alcalina y posteriormente cada corte se lavó dos veces con PBS durante 5 min. Finalmente, las muestras se incubaron en oscuridad durante 60 min. con el sustrato de fosfatasa alcalina NBT/BCIP (cloruro de nitro-blue/5-bromo-4-cloro-3´-indolfosfato) y

la reacción fue interrumpida sumergiendo los cortes en agua destilada. Cada corte histológico se contracoloreó con hematoxilina, y se montó con una solución de montaje acuoso comercial (*Dako cytomation, USA*) para luego observarlo bajo el microscopio óptico. En cada reacción de hibridación se utilizó como control positivo un LH previamente caracterizado como EBV+ y como control negativo se realizó el mismo procedimiento en un corte caracterizado como EBV-. En forma adicional se incluyó en cada determinación un control de integridad del ARN mediante una zonda específica para GAPDH.

4.7. Extracción de ADN

Se extrajo el ADN genómico total a partir de cada una de las muestras de plasma, CMSP, SF (D0, D30 y D90) y biopsias ganglionares en fresco con el equipo comercial *QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemania)* según las especificaciones provistas por el fabricante. El ADN del virus presente en estas muestras se purifica en forma conjunta con el ADN genómico.

4.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

4.8.1 Verificación de la integridad del ADN purificado

Se realizó la amplificación del gen de la β-globina a partir del ADN purificado de cada muestra disponible de CMSP, SF y biopsias ganglionares con el objeto de confirmar la integridad del dicho ADN. Para esta reacción se utilizaron los cebadores específicos GH20: 5´-gaagagccaaggacaggtac-3´ y PCO4: 5´-caacttcatccacgttcacc-3´ y el producto de amplificación logrado es de 260 pb.

La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl en presencia de solución salina de amplificación (10 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 1,5 mM $MgCl_2$; 1 µM de cada cebador; 200 µM de una mezcla con cada uno de los deoxinucleótidos trifosfato; 2,5 UI de la enzima *Taq* ADN polimerasa (todos los reactivos provistos por *Invitrogen, USA*) y 200 ng de ADN total como templado. La reacción se realizó en un termociclador de la marca *Applied Biosystems* (*Applied Biosystems, USA*) y constó de un primer paso de desnaturalización de 5 min. a 95°C seguido por 35 ciclos de 45 seg. a 94°C; 45 seg. a 55°C y 45 seg. a 72°C seguidos por un último paso de extensión de 7 min. a 72°C. Como control positivo se utilizó el ADN extraído de la línea celular Ramos y como control negativo, se adicionaron 3 µl de H_2O en vez de ADN.

Con el objetivo de verificar el tamaño de los fragmentos, 10 µl de los amplicones fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% disuelta en solución salina TAE 1x (40 mM Tris-AcH pH 7,6; 1 mM EDTA) y teñido con bromuro de etidio. Para este fin y conjuntamente con las muestras se corrió un marcador de peso molecular comercial (*CienMarker, Biodynamics, Argentina*). La corrida electroforética se realizó a 100 V y amperaje variable durante 30 min. Los geles fueron luego visualizados y fotografiados bajo luz ultravioleta.

4.8.2. Tipificación de EBV

Se realizó la tipificación viral a partir del ADN purificado de cada muestra disponible de CMSP, SF y biopsias ganglionares según lo descripto por Sample y colaboradores [Sample y col., 1990]. Esta reacción de tipificación por PCR se basa en el uso de cebadores específicos que flanquean una región polimórfica del gen que codifica para EBNA3C y que alberga una deleción de 93 pb y que se encuentra presente en EBV1, pero no en EBV2. Consecuentemente, los fragmentos de amplificación observados resultaron de 153 pb para EBV1 y de 246 pb para EBV2. Los cebadores específicos utilizados en la reacción de amplificación fueron: EBNA3Cfwd 5´-agaaggggagcgtgtgttgt-3´ (99939-99958 del genoma patrón de EBV que corresponde a la línea celular linfoblastoidea B95.8, número de acceso de *GeneBank* V01555) y EBNA3Crev 5´-ggctcgtttttgacgtcggc-3´ (100072-100091). La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl con la misma mezcla de reacción descripta en el ítem 4.8.1 pero con los cebadores específicos de este fragmento y en el mismo termociclador. La reacción de amplificación constó de un primer paso de desnaturalización de 5 min. a 95°C seguido por 35 ciclos de 45 seg. a 94°C; 45 seg. a 55°C y 45 seg. a 72°C y posteriormente una extensión final de 7 min. a 72°C. Como control positivo se utilizó el ADN extraído de la línea celular B95.8 y como control negativo, se adicionaron 3 µl de H_2O en vez de ADN. Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis y visualizados de igual manera a la descripta en el ítem 4.8.1.

Durante la mononucleosis infecciosa, la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T citotóxicos controla rápida y eficientemente el número de linfocitos B infectados por EBV. Teniendo en cuenta además que no se recomienda extraer un volumen de sangre mayor a 6 ml en pacientes pediátricos, la cantidad de linfocitos B

presentes en CMSP que contienen genoma viral puede no resultar adecuada para su exitosa amplificación por PCR. Por este motivo, se optó por una estrategia de PCR anidada con dos pares de cebadores para amplificar el ADN viral proveniente de las CMSP. De manera similar se aplicó esta estrategia a las SF considerando que en las muestras de convalecencia (D90) la carga viral podía en algunos casos verse muy diminuida. Luego para abordar con una sensibilidad equivalente las diferentes muestras se optó por aplicar esta estrategia también a los linfomas.

4.8.3. Amplificación de la región del promotor del gen BZLF1

Se amplificó la región promotora del gen BZLF1, -221 a +12 con respecto al sitio de inicio de la transcripción, usando como templado el ADN total purificado a partir de cada una de las muestras disponibles de CMSP, SF y biopsias ganglionares.

Los cebadores externos utilizados para el primer ciclo de amplificación fueron: BZLF1extf: 5´-cgagtttgggtccatcatc-3´ (103138-103157) y BZLF1extr: 5´-ctgacccccgaacttaatga-3´ (103457–103476). Estos cebadores se diseñaron con el programa primer3 v.0.4.0 de libre acceso en Internet (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/). Los cebadores internos utilizados, previamente descriptos por Gutiérrez y colaboradores [Gutiérrez y col., 2002], fueron: BZLF1fwd: 5´-ccggcaaggtgcaatgttt-3´ (103180–103198) y BZLF1rev: 5´-agcatgccatgcatatttc-3´ (103403-103421). La mezcla de reacción para el primer ciclo de PCR se realizó en 25 µl finales con el agregado de solución de amplificación (10 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM KCl); 1× de solución potenciadora; 1 mM SO_4Cl_2; 0,6 µM de cada cebador; 200 µM de una mezcla con cada uno de los deoxinucleótidos trifosfato; 0,375 UI de la enzima *Platinum pfx* ADN polimerasa con actividad 3´-5´ exonucleasa correctora (todos los reactivos provistos por *Invitrogen, USA*) y 200 ng de ADN total como templado.

Con el objetivo de obtener una masa de ADN suficiente para su posterior secuenciación, la mezcla de amplificación para el segundo ciclo de PCR se preparó en 50 µl. Todos los reactivos se utilizaron en la misma concentración final que para el primer ciclo, sin el agregado de solución potenciadora y como templado se utilizó 2 µl del producto de la reacción anterior. Las condiciones de ciclado, que fueron las mismas para las dos etapas, constaron de una desnaturalización de 5 min. a 94°C seguida de 35 ciclos de 30 seg. a 94°C; 30 seg. a 60°C; 30 seg. a 68°C y una extensión final de 7 min. a 68°C.

Como control positivo se utilizó ADN de la línea celular B95.8 y como control negativo en ambos ciclos de amplificación se utilizó agua destilada en lugar de templado. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis según lo descripto anteriormente. La banda de ADN específica se cortó del gel, purificó y cuantificó para su posterior secuenciación como se detalla en el ítem 4.9.

Para establecer la sensibilidad de la estrategia de PCR anidada, se amplificó el ADN de una curva de calibración confeccionada a partir de diluciones seriadas al décimo partiendo de $1x10^6$ células B95.8 (EBV+) diluidas en células Ramos (EBV-).

4.8.4. Amplificación de la región 3´ codificante del gen BKRF1 (C-ter. de EBNA1)

De igual forma a lo descripto previamente, se optó por la estrategia de PCR anidada para la amplificación de la región 3´ codificante de EBNA1 a partir del ADN obtenido de todas las muestras. Los cebadores se diseñaron con el programa primer3 v.0.4.0. En la primera reacción de amplificación, se utilizaron los cebadores: EBNA1extf: 5´-agatggtgagcctgacgtg-3´ (109218-109236) y EBNA1extr: 5´-gctgaggttttgaaggatgc-3´ (109663-109682) y en la segunda ronda de amplificación, EBNA1fwd: 5´-cccgcagatgacccaggaga-3´ (109261-109280) y EBNA1rev 5´-tttggaatggcccctggaccc-3´ (109570-109590). La mezcla de reacción para la primera amplificación se realizó en 25 µl finales con el agregado de solución salina de amplificación (10 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM KCl); 1 mM SO_4Cl_2; 0,6 µM de cada cebador; 200 µM de una mezcla con cada uno de los deoxinucleótidos trifosfato; 0,375 UI de la enzima *Platinum pfx* ADN polimerasa con actividad 3´-5´ exonucleasa correctora (todos los reactivos provistos por *Invitrogen, USA*) y 200 ng de ADN total como templado. De forma similar a lo descripto para la amplificación el gen BZLF1, la segunda amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl, utilizando 2 µl del primer ciclado como templado. Ambas condiciones de ciclado constaron de una desnaturalización de 5 min. a 95°C seguida de 35 ciclos de 45 seg. a 94°C; 45 seg. a 60°C; 45 seg. a 68°C y una extensión final de 7 min. a 68°C.

Se utilizó ADN de la línea celular B95.8 como control positivo y agua destilada en lugar de templado como control negativo en ambos ciclos de amplificación. A su vez, los amplicones se sometieron a electroforesis, se recuperaron del gel, purificaron y cuantificaron para su posterior secuenciación como se describe en el ítem 4.9.

Para establecer la sensibilidad de la estrategia de PCR anidada, se amplificó el ADN de una curva de calibración confeccionada a partir de diluciones seriadas al décimo partiendo de $1x10^6$ células B95.8 (EBV+) diluidas en células Ramos (EBV-).

4.8.5. Amplificación de la región 3´ codificante del gen BNLF1 (frag. C-ter. de LMP1)

Para la amplificación de esta región se optó por la técnica de PCR semianidada. Las mezclas de reacción se prepararon de igual manera que como fue descripto en el ítem 4.8.3. Los cebadores utilizados en la primera reacción de amplificación fueron: LMPC: 5´-ttccttctctaacgcactttctc-3´ (169163-169186) diseñado con el programa primer3 v.0.4.0 y LMP11: 5´-tgattagctaaggcattccca-3´ (168075-168095) descripto previamente [Knecht y col., 1993]. El programa de ciclado utilizado constó de un paso de desnaturalización de 5 min. a 95°C seguida de 36 ciclos de 45 seg. a 95°C; 45 seg. a 56°C; 1 min. a 68°C y una extensión final de 10 min. a 68°C. En la segunda ronda de amplificación se utilizaron las mismas condiciones de ciclado, donde 2 µl del producto de amplificación se amplificaron en 50 µl. Los cebadores utilizados fueron LMP11 y LMP6: 5´-tctggatgtattaccatggac-3´ (168756-168776) también descriptos por Knetch y col.

Como controles positivos y negativos se utilizó ADN de la línea celular B95.8 y agua destilada libre de RNAsa respectivamente como se describió anteriormente. Los amplicones se sometieron a electroforesis, recuperaron del gel, purificaron y cuantificaron para su posterior secuenciación como se describirá en el ítem 4.9.

Para establecer la sensibilidad de la estrategia de PCR anidada, se amplificó el ADN de una curva de calibración confeccionada a partir de diluciones seriadas al décimo partiendo de $1x10^6$ células B95.8 (EBV+) diluidas en células Ramos (EBV-).

4.9. Purificación de los productos de amplificación

La banda de ADN correspondiente al producto de amplificación de la PCR se cortó del gel de agarosa con un bisturí estéril y purificó con la resina comercial *QIAEX II Gel Extraction System* (*QIAGEN, Alemania*). Luego de la purificación, el ADN se resuspendió en 20 µL de agua estéril y libre de ribonucleasas, y 2 µl se sometieron nuevamente a electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio junto con un patrón de masa y peso molecular conocidos (*QuantiMarker, Biodynamics, Argentina*).

Se cuantificó el ADN purificado mediante la absorbancia a 260 nm y se realizó la relación 260/280 para verificar el grado de pureza.

4.10. Secuenciación directa de productos de amplificación

Los productos de amplificación de los genes BZLF1, BKRF1 y BNLF1, previamente purificados, se secuenciaron de manera automatizada utilizando el reactivo comercial *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (*Applied Biosystems, USA*) en un equipo *Applied Biosystems 3100*. Para secuenciar los amplicones de la región promotor de BZLF1 se utilizaron los cebadores internos BZLF1fwd y BZLF1rev. Para la región 3´ codificante de BKRF1 se utilizaron los cebadores EBNA1fwd y EBNA1rev, y para la secuenciación de los amplicones del gen BNLF1 se utilizaron los cebadores LM6 y LMP-11.

4.11. Análisis de Secuencias

Para la visualización de los cromatogramas y edición de las secuencias se utilizó el programa BioEdit versión 7.0.4.1 [Hall, 1999]. Para cada región analizada, las secuencias obtenidas con ambos cebadores se alinearon y se generó una secuencia consenso para cada una de las muestras analizadas. En caso de detectar la presencia de picos dobles, que corresponden a más de una base en una misma posición, ésta se completó con una base degenerada siguiendo la nomenclatura IUPAC. En todos los casos, para generar las secuencias consenso se eliminaron las secuencias correspondientes a los cebadores. De esta manera se obtuvieron secuencias de 204 pb para la región promotora del gen BZLF1 y de 289 pb y 660 pb para los genes que codifican para EBNA1 y LMP1, respectivamente. Las secuencias consenso generadas a partir de los distintos aislamientos incluidos en este trabajo fueron depositados en las base de datos de *GenBank* (Apéndices E, F y G)

Se alinearon todas las secuencias consenso generadas a partir de cada una de las muestras disponibles para cada región génica estudiada y se las comparó con la secuencia de referencia (línea celular B95.8) con el fin de detectar los polimorfismos presentes y caracterizar las variantes virales. El análisis *in silico* para determinar los sitios predictivos de unión de factores de transcripción celular a la región promotora de BZLF1 se realizó con el programa Alibaba versión 2.1, con plataforma gratuita en línea (http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html). Este programa utiliza los recursos almacenados en la base de datos Transfec versión 4.0.

Para el análisis de recombinación se utilizó el programa Simplot versión 3.5.1 [Lole y col., 1999]. Para dicho análisis la región repetitiva de 33pb y la deleción de 30pb fueron removidas del alineamiento de forma tal que todas las secuencias a evaluar tuviesen la misma extensión total. La reconstrucción de los arreglos genómicos y el análisis global de asociación entre todos los polimorfismos detectados en los diferentes genes estudiados se realizó con el programa DNAsp versión 5.10.01 [Librado y col., 2009].

4.12. Reconstrucción de las relaciones filogenéticas

Para la reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre muestras, se utilizó el programa PAUP* versión 4.0b10 [Swofford, 2003] y el programa MEGA5 versión 5.0 [Tamura y col., 2011]. El criterio de reconstrucción que se aplicó fue el de máxima verosimilitud. Para la estimación del modelo de evolución de cada alineamiento de secuencias analizado se utilizó el programa Modeltest versión 3.7 [Posada y col., 1998] (Tabla 3). Este programa utiliza el algoritmo *hierarchical likelihood ratio test* para estimar, con valor estadístico, cuál es el modelo de evolución que más se ajusta a los datos experimentales, de entre 56 modelos posibles. La validación estadística de la topología de cada árbol fue realizada mediante remuestreo (1000 pseudoréplicas), siguiendo el mismo modelo de evolución deducido anteriormente. Para la visualización de los árboles filogenéticos se utilizó el programa Treeview [Page, 1996] o el programa MEGA5.

Para la reconstrucción de las relaciones filogenéticas y caracterización de las variantes de LMP1 detectadas en este trabajo según la nomenclatura introducida por Edwards y col. (ver apéndice A) [Edwards y col., 1999; Edwards y col., 2004] se utilizaron las secuencias patrón de cada una de las siete variantes descriptas en base a sustituciones nucleotídicas clave. Brevemente, se descargaron de *GenBank* las secuencias de las variantes China1 (número de acceso de *GenBank* AY337723.1), China2 (AY337724.1), Med+ (AY337722.2), Med- (AY337721.2), Alaskan (AY337725.1), North Carolina (NC) (AY337726.2). La secuencia correspondiente a la variante China3 se reconstruyó en el programa BioEdit siguiendo el patrón de sustituciones descripto en [Chang y col., 2009] (ver apéndice H). Adicionalmente se incluyó en los análisis la secuencia de referencia B95.8 (V01555).

Tabla 3: Modelos de evolución

Alineamiento	*Modelo de evolución*	*Parámetros*
C-ter EBNA1 (Figura 14)	JC+G	Todas las sustituciones con igual probabilidad; Igual frecuencia de bases (A = 0,250; C = 0,250; G = 0,250; T = 0,250) R=0,5
C-ter LMP1 (Figura 17)	T92+G	Todas las sustituciones con igual probabilidad; frecuencia desigual de bases (A = 0,216; C = 0,284; G = 0,284; T = 0,216) R=0,85
Porción 5´ C-ter LMP1 (Figura 19A)	JC+G	Todas las sustituciones con igual probabilidad; Igual frecuencia de bases (A = 0,250; C = 0,250; G = 0,250; T = 0,250) R=0,5
Porción 3´ C-ter LMP1 (Figura 19B)	JC	Todas las sustituciones con igual probabilidad; Igual frecuencia de bases (A = 0,250; C = 0,250; G = 0,250; T = 0,250) R=0,5

Abreviaturas: JC: Jukes-Cantor; JC+G: Jukes-Cantor con tasa de variación entre sitios que sigue una distribución gamma (G). T92+G: Tamura 3 parámetros con tasa de variación entre sitios que sigue una distribución gamma (G). R: Transiciones/Transversiones

4.13. Clonado de productos de amplificación

Para el clonado de aquellos productos de amplificación que presentaron indicios de coinfección por secuenciación directa se utilizó el equipo comercial *TOPO Zero Blunt PCR Cloning Kit* (*Invitrogen, USA*), según indicaciones del fabricante. Este equipo ha sido diseñado para el clonado de productos de amplificación con extremos romos obtenidos con *Platinum pfx* ADN polimerasa. Los productos de amplificación fueron diluidos a una concentración final de 2,7 ng/µl y 1 µl de esta dilución se utilizó en la reacción de clonado. La misma se realizó durante 20 min. a temperatura ambiente, en un volumen final de 6 µl, según las indicaciones del fabricante. El producto de la reacción de clonado se utilizó inmediatamente para transformar bacterias competentes.

4.14. Preparación de bacterias competentes

Se utilizaron las bacterias *E. coli* DH5α y el método químico de $CaCl_2$. Brevemente, se obtuvo un cultivo puro de *E. coli* DH5α en 100 ml de medio líquido Luria Bertani (LB). El crecimiento bacteriano se controló por comparación de turbidez contra la escala de Mc Farland y se cosechó cuando la turbidez estuvo entre 2 y 3 de la misma. El cultivo se enfrió durante 10 min. sobre hielo y se centrifugó durante 10 min. a 4°C a 4.100 rpm en una centrífuga Sorvall Rotor GSA. Se descartó el sobrenadante y los tubos se mantuvieron invertidos durante 1 min. para eliminar los restos de medio de cultivo. Las bacterias se resuspendieron en 30 ml de una solución de $MgCl_2$ 80 mM, $CaCl_2$ 20 mM fría y se agitaron suavemente. Se repitió el paso de centrifugación y eliminación de la solución anterior, y el *pellet* bacteriano se resuspendió en 4 ml de $CaCl_2$ 0,1 M

frío. Lentamente, se agregaron 140 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a las células resuspendidas, se agitó suavemente por inversión y se incubó sobre hielo durante 15 min. Por último, se agregaron nuevamente 140 µl de DMSO a las bacterias, se agitó suavemente por inversión y se procedió a preparar alícuotas de las bacterias para su posterior congelamiento a -80°C en tubos estériles.

4.15. Transformación de bacterias competentes

Para cada reacción se agregaron los 6 µl del vector recombinante producto de la reacción de clonado a 100 µl de *E. coli* DH5α competentes y se incubó sobre hielo durante 30 min. Posteriormente, los tubos se incubaron durante exactamente 90 seg. a 42ºC en baño de agua sin agitación y se transfirieron nuevamente a baño de hielo por 2 min.. Se agregaron 400 µl de medio líquido SOC (Bacto triptona 2% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, glucosa 20 mM en un volumen final de 1.000 ml) a cada tubo y se incubó durante 90 min. a 37°C. Las bacterias se centrifugaron durante 5 min. a 8.000 rpm y se resuspendieron en 100 µl del sobrenadante. La suspensión bacteriana se sembró con espátula de vidrio estéril sobre medio sólido LB, con kanamicina (50 µg/ml). Las placas se incubaron a temperatura ambiente hasta la absorción total del líquido, y posteriormente se incubaron a 37ºC durante toda la noche.

4.16. Análisis de las colonias recombinantes

De cada placa de bacterias transformadas se seleccionaron al menos 10 colonias recombinantes. Dado que el vector contiene un gen letal en el sitio de inserción del fragmento de ADN a clonar, sólo las bacterias que incorporen el vector con la resistencia al antibiótico y con el inserto interrumpiendo el gen letal, podrán crecer y dar origen a una colonia recombinante. Dichas colonias se repicaron en 4 ml de medio *Terrific Broth* (TB) líquido con kanamicina (50 µg/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37ºC con agitación (100 rpm) para su posterior procesamiento.

La presencia del ADN viral recombinante en las colonias crecidas en medio TB se determinó por la técnica de PCR a partir de 1 ml de dicho cultivo. A fin de obtener todas las bacterias presentes en 1 ml del cultivo, el mismo se centrifugó a 8.000 rpm durante 5 min. y se descartó el sobrenadante. Las bacterias se resuspendieron en 300 µl de Solución I (Tris HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA10 mM; glucosa 50 mM) fría y se

lisaron posteriormente por el agregado de 300 µl de Solución II (NaOH 0,2 N; SDS 1%). La mezcla se homogeneizó por inversión lenta y se incubó 5 min. a temperatura ambiente. Se agregaron 300 µl de Solución III (AcK/AcH) helada, se incubó durante 10 min. sobre hielo y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min. a 4ºC. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se incubó durante al menos 30 min. con RNAsa A (concentración final 20 µg/ml) a 37ºC. La solución de ADN se extrajo dos veces con 1 volumen de cloroformo, mezclando por inversión y centrifugando 5 min. a 10.000 rpm en cada oportunidad. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y el ADN se precipitó por agregado de 1 volumen de alcohol isopropílico. La mezcla se incubó durante 30 min. a -20ºC, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. a 4ºC y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se lavó con 500 µl de alcohol etílico 75% frío, se agitó en vortex, se centrifugó a 10.000 rpm a 4ºC durante 5 min. y se secó por evaporación a 37ºC. El ADN plasmídico extraído se resuspendió en 40 µl de agua estéril y libre de nucleasas.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl en presencia de solución de amplificación (Tris-HCl 10 mM pH 8,4; KCl 50 mM); $MgCl_2$ 1,5 mM; 1 µM de cada cebador; 200 µM de una mezcla con cada uno de los deoxinucleótidos trifosfato; 2,5 UI de la enzima *Taq* ADN polimerasa (todos los reactivos provistos por *Invitrogen, USA*) y 3 µl de ADN plasmídico como templado. Los cebadores utilizados en cada caso fueron los ya descriptos para amplificar el segundo ciclo de PCR de cada región génica. Los amplicones fueron sometidos a electroforesis y visualizados bajo luz UV como se describió anteriormente.

4.17. Purificación de ADN plasmídico para su secuenciación

Con el objetivo de obtener ADN plasmídico de buena calidad para ser secuenciado, se utilizó el equipo comercial *Ultra Clean 6 Minutes Mini plasmid Prep Kit* (*MoBio, USA*).

Los 3 ml restantes del cultivo realizado en TB líquido con kanamicina (50 µg/ml) se centrifugaron a 8.000 rpm durante 5 min. y se descartó el sobrenadante. Las bacterias se resuspendieron en 50 µl de solución 1, provista con el equipo, y se prosiguió luego según las indicaciones del fabricante.

Finalmente, el ADN plasmídico se eluyó en 100 µl de solución de elusión. Luego de la purificación, se cuantificaron 2 µl por comparación de la intensidad de fluorescencia frente a un patrón de masa y peso molecular conocidos (*λHind*III, *Gibco, USA*)

4.18. Secuenciación de los clones

El ADN plasmídico purificado se secuenció de manera automatizada utilizando el reactivo comercial *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (*Applied Biosystems, USA*) en un equipo Applied Biosystems 3100 (*Applied Biosystems, USA*). Los cebadores utilizados en la reacción de secuenciación reconocen secuencias del vector de clonado ubicadas a ambos lados del sitio de inserción del ADN a clonar. Las secuencias de los cebadores son: M13Reverse: 5'-caggaaacagctatgac-3' y M13Forward (-20): 5'-gtaaaacgacggccag-3'.

4.19. PCR cuantitativa en tiempo Real

A fin de cuantificar la carga viral en la etapa aguda y en la convalecencia de la MNI, se estandarizó la determinación de EBV por PCR en tiempo real a partir del ADN purificado de las muestras de plasma. Para la mezcla de reacción se utilizó la mezcla comercial *SYBER GREEN Master Mix* (*Applied Biosystems, USA*) a la cual se le adicionaron 5 µl del ADN purificado como templado, los cebadores específicos en una concentración final 150 nM y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 25 µl. La reacción de amplificado se realizó en un termociclador *Step One Real time PCR system* (*Applied Biosystems, USA*) con un programa de ciclado estándar 2 min. a 50°C, 10 min. a 95°C y 40 ciclos de 15 seg. a 95°C con 1 min. de extensión a 60°C. Se utilizaron los cebadores BALF5up: 5´-cggaagccctctggacttc-3´ (156483-156465) y BALF5dwn: 5´-ccctgtttatccgatggaatg-3´ (156394-156414) los cuales fueron previamente descriptos [Wadowsky y col., 2003]. Se generó una curva estándar mediante diluciones seriadas al quinto a partir del ADN purificado de una suspensión de $1x10^6$ células Raji (EBV+). El ADN de las células Raji se extrajo con el equipo comercial *QIAamp DNA Mini Kit* (*QIAGEN, Alemania*) según las especificaciones provistas por el fabricante. Dado que cada célula Raji contiene 50 copias del genoma viral, el rango lineal de la curva cubrió 4 logaritmos incluyendo desde $2x10^6$ copias de genoma de EBV hasta 650 copias de genoma. El límite de detección fue de 130 copias de genoma y se calculó mediante la amplificación de una dilución al quinto a partir del

estándar que contiene 650 copias y luego dos diluciones seriadas al medio. La amplificación de estas diluciones se realizó por triplicado y a su vez se incluyeron tres replicas de cada amplificación. La dilución con 130 copias del genoma viral se detectó sistemáticamente en todas las determinaciones (Ct promedio 36,0365; Coeficiente de variación, CV= 0,022).

Se incluyó en cada corrida la curva estándar con el objetivo de extrapolar y cuantificar la carga viral presente en cada una de las muestra de los pacientes, la cual se expresó como copias de genoma viral por 1 ml de plasma. Tanto la curva como las muestras de los pacientes se ensayaron por duplicado. Los valores de Ct de la curva estándar se verificaron en cada corrida con el fin de asegurar resultados similares y validar los valores de carga viral calculados a partir de las muestras de los pacientes con MNI. Las variaciones en Ct<1 para cada punto de la curva estándar fueron consideradas aceptables.

4.20. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Instat v3.05 (*Graphpad, USA*). Para el análisis, se aplicaron las pruebas de Fisher (*Fisher's exact test*) o χ^2 (*Chi square test*) para analizar la asociación entre las variables. Todas las pruebas fueron de dos colas y los valores de $P<0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Descripción de la población en estudio

Durante el período de desarrollo de este trabajo de tesis doctoral, se enrolaron 29 pacientes pediátricos con sintomatología clínica compatible con el síndrome mononucleósico. Según el criterio de inclusión preestablecido, los 15 casos con anticuerpos IgM anti VCA positivos por IFI se incluyeron en el estudio (Figura 7).

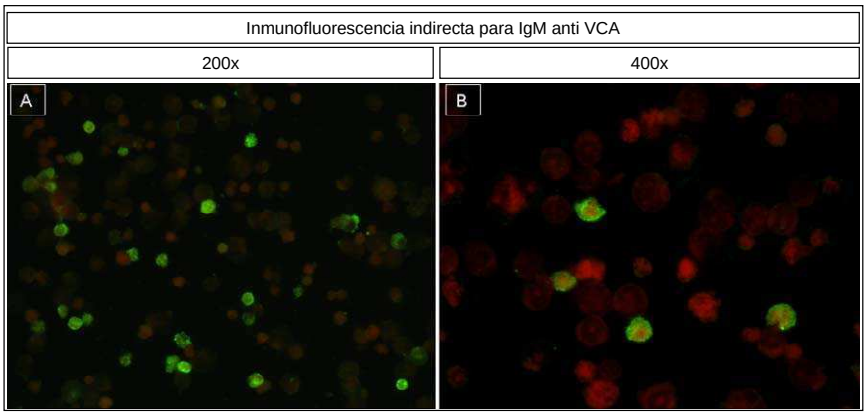


Figura 7. IFI para IgM anti VCA. Se observa inmunorreactividad positiva (verde) en las células que expresan el antígeno VCA. Las células negativas se observan contracoloreadas en rojo. A) Paciente MNI 9, aumento 200x. B) Paciente MNI 12 aumento 400x.

El rango de edades de los pacientes con MNI fue de 2 a 17 años con una mediana de 4 años y la distribución por sexos fue de 7 varones y 8 mujeres. La edad, sexo y tiempo transcurrido entre la aparición de los síntomas y la consulta médica para cada caso en particular, así como los datos de la serología determinada se detallan en la tabla 4.

Tabla 4: Características de los pacientes con MNI

Paciente	*Edad*	*Sexo*	*Días de Evolución*	*IgM EBV*	*IgG EBV*	*IgM CMV*	*IgM Toxo*
MNI 1	9 años	M	15	pos.	1/160	neg.	neg.
MNI 2	2 años	M	7	pos.	1/40	neg.	neg.
MNI 3	4 años	M	7	pos.	1/160	neg.	neg.
MNI 4	2 años	M	5	pos.	1/160	neg.	neg.
MNI 5	4 años	F	13	pos.	1/160	neg.	neg.
MNI 6	3 años	F	7	pos.	1/160	neg.	neg.
MNI 7	4 años	M	7	pos.	1/160	neg.	neg.
MNI 8	5 años	F	6	pos.	1/160	neg.	neg.
MNI 9	6 años	F	10	pos.	1/160	neg.	neg.
MNI 10	8 años	F	15	pos.	1/160	neg.	neg.
MNI 11	2 años	M	10	pos.	1/160	neg.	neg.
MNI 12	17 años	F	12	pos.	1/160	neg.	neg.
MNI 13	2 años	F	10	pos.	1/160	neg.	neg.
MNI 14	6 años	F	7	pos.	1/40	neg.	neg.
MNI 15	8 años	M	9	pos.	1/160	neg.	neg.

Abreviaturas: MNI: mononucleosis infecciosa, pos.: positivo, neg.: negativo, EBV: virus de Epstein Barr, CMV: citomegalovirus, Toxo: *Toxoplasma gondii*, M: masculino, F: femenino

Si bien los pacientes MNI 2, 3 y 9 no concurrieron a las consultas de seguimiento D30 y D90 y el paciente MNI 15 no concurrió a la consulta D90, sus respectivas muestras iniciales fueron incluidas para el análisis de variantes de EBV en la primoinfección.

Por otra parte, en el período de este trabajo de tesis, se diagnosticaron en la División Anatomía Patológica 62 nuevos casos de linfomas pediátricos, 29 (46,8%) LH y 33 (53,2%) LNH. La asociación de estos linfomas con EBV se determinó mediante hibridación *in situ* para EBERs (Figura 8).

De esta forma se determinó la presencia de EBV exclusivamente en el núcleo de las células tumorales en 15 (51,72%) LH y en de 12 LNH (36,36%). El porcentaje de células tumorales positivas fue variable dentro de cada caso en particular. Se determinaron como positivos aquellos casos que contenían más de un 5% de células tumorales EBERs positivas. Tomando como criterio de inclusión la positividad del linfoma para EBV y la disponibilidad de suficiente cantidad de muestra en fresco, se incluyeron en el estudio 14 LH y 6 casos de LNH. Las edades de los pacientes abarcaron el rango de 3 a 18 años con una mediana de 7 años, y la relación varón: mujer fue de 9:11. La distribución individual de edades y sexos así como la clasificación histológica de cada caso se detallan en la tabla 5.

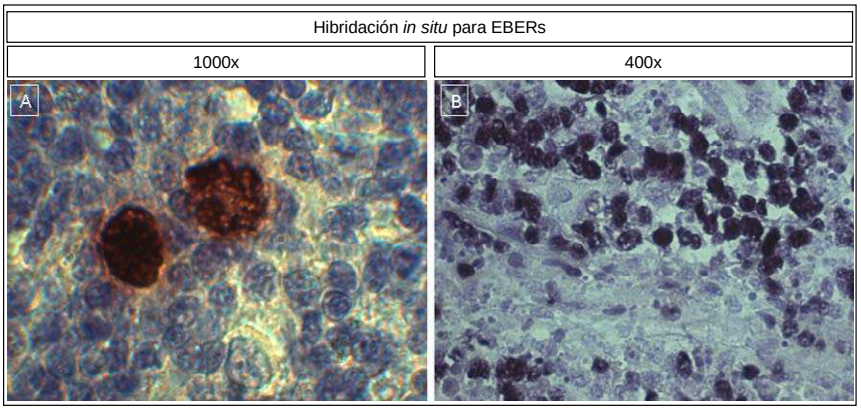


Figura 8. Hibridación *in situ* para pequeños ARN virales EBERs. A) Paciente 7, LH, aumento 1000x. Se observa la marcación específica restringida al núcleo de las células tumorales de Reed-Sternberg y ausencia de la misma en los linfocitos adyacentes. B) Paciente 15, linfoma LNH, AGCT, aumento 400x. La marcación específica se observa restringida al núcleo de las células tumorales.

Tabla 5: Clasificación de linfomas y distribución por sexo y edad

Paciente	*Clasificación*	*Subclasificación*	*Edad*	*Sexo*	*ISH EBERs*
T1	LNH	DGCB	14 años	M	pos.
T2	LNH	DGCB	9 años	M	pos.
T3	LNH	DGCB	7 años	F	pos.
T4	LH	CM	5 años	M	pos.
T5	LH	CM	5 años	M	pos.
T6	LH	EN	12 años	F	pos.
T7	LH	CM	6 años	M	pos.
T8	LH	EN	15 años	F	pos.
T9	LH	CM	7 años	M	pos.
T10	LH	CM	10 años	M	pos.
T11	LH	CM	9 años	M	pos.
T12	LH	CM	3 años	M	pos.
T13	LH	CM	10 años	M	pos.
T14	LH	CM	7 años	M	pos.
T15	LNH	AGCT	8 años	M	pos.
T16	LNH	LB	4años	M	pos.
T17	LNH	DGCB	6 años	M	pos.
T18	LH	CM	4 años	F	pos.
T19	LH	EN	5 años	F	pos.
T20	LH	EN	18 años	F	pos.

Abreviaturas: LH: linfoma de Hodgkin, LNH: linfoma no Hodgkin, DGCB: Difuso a Grandes Células B, AGCT: Anaplásico a Grandes Células T, CM: Celularidad Mixta, EN: Esclerosis Nodular, LB: Linfoma de Burkitt.

5.2. Tipificación viral

La tipificación viral, determinada por el tamaño del fragmento de amplificación del gen que codifica para EBNA3C permitió detectar ambos tipos virales en la población estudiada.

En el caso de los pacientes con MNI, 14/15 (93%) resultaron infectados con EBV1, mientras que sólo un caso con EBV2. No se detectó ningún caso de coinfección con ambos tipos virales. Por último, el mismo tipo viral se mantuvo en CMSP y SF de un mismo paciente a lo largo de los tres meses de estudio.

Por su parte, EBV1 fue detectado en 14/20 (70%) muestras de biopsias tumorales de pacientes con linfomas, mientras que 6/20 (30%) resultaron con EBV2. Al igual que para los pacientes con MNI, no se detectó ningún caso de coinfección con ambos tipos virales.

A modo ilustrativo, se muestra la imagen de un gel de agarosa con los diferentes productos de amplificación obtenidos a partir de los ADN de los 20 linfomas EBV+ (Figura 9).

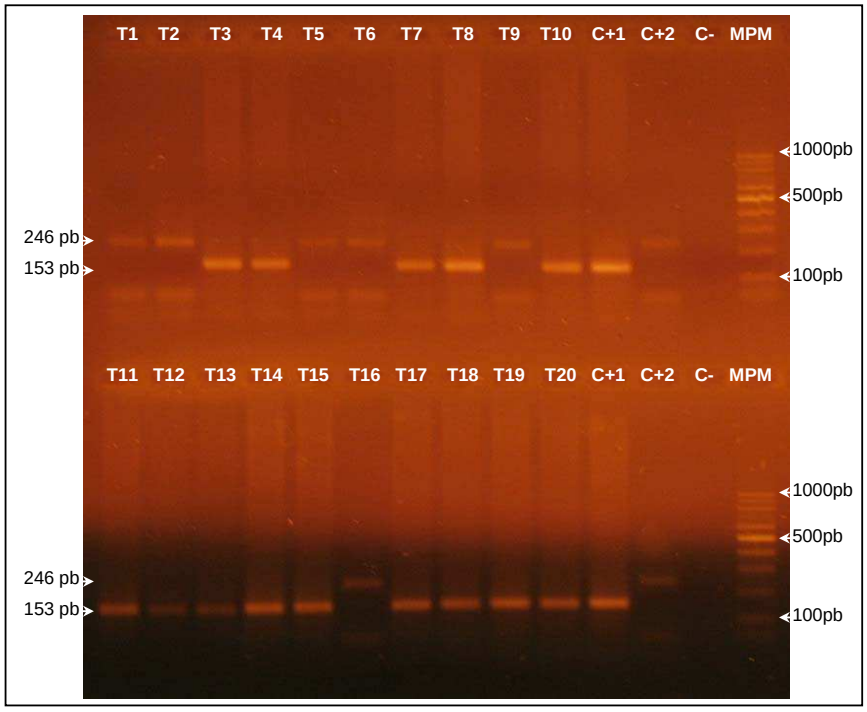


Figura 9. Electroforesis de los productos de amplificación del gen que codifica para EBNA3C en gel de agarosa al 2%. Se muestran las tipificaciones correspondientes a los tumores 1 al 20 (T1-T20). C+1: control + para EBV1; C+2: control positivo para EBV2; C-: control negativo; M: marcador de peso molecular.

5.3. Caracterización de variantes de EBV

Las variantes virales de los genes que codifican para EBNA1, LMP1 y la región del promotor de BZLF1 se caracterizaron mediante el análisis de los cromatogramas obtenidos por secuenciación directa de los productos de amplificación.

Dado que en los pacientes con MNI el número de CMSP que contiene al EBV es reducido y que durante la convalecencia tardía la secreción viral en saliva disminuye, sumado al hecho de que sólo se permite extraer una escasa cantidad de sangre en pacientes pediátricos, fue necesario implementar técnicas con mayor sensibilidad para detectar el virus. Para este fin, ciertos autores han utilizado el potencial transformante del EBV para establecer líneas celulares linfoblastoideas a partir de muestras clínicas y de esta forma aumentar el número de células portadoras del virus. Sin embargo, este abordaje puede llevar a la selección negativa de variantes con poca capacidad transformante. En este trabajo de tesis, mediante la estrategia de PCR anidada seguida de la secuenciación directa (en ambos sentidos) se buscó aumentar la sensibilidad de detección y evitar el cultivo a fin de minimizar la posible selección negativa. Se observa en la figura 10 como la sensibilidad de detección de células EBV+ aumentó hasta en tres órdenes de magnitud mediante la PCR anidada, con respecto a la PCR de un solo ciclo de amplificación. De esta forma se logró amplificar, en cantidad suficiente para ser secuenciado, el ADN proveniente de hasta 10 células para el promotor del gen BZLF1 y también para los genes que codifican para LMP1 y EBNA1.

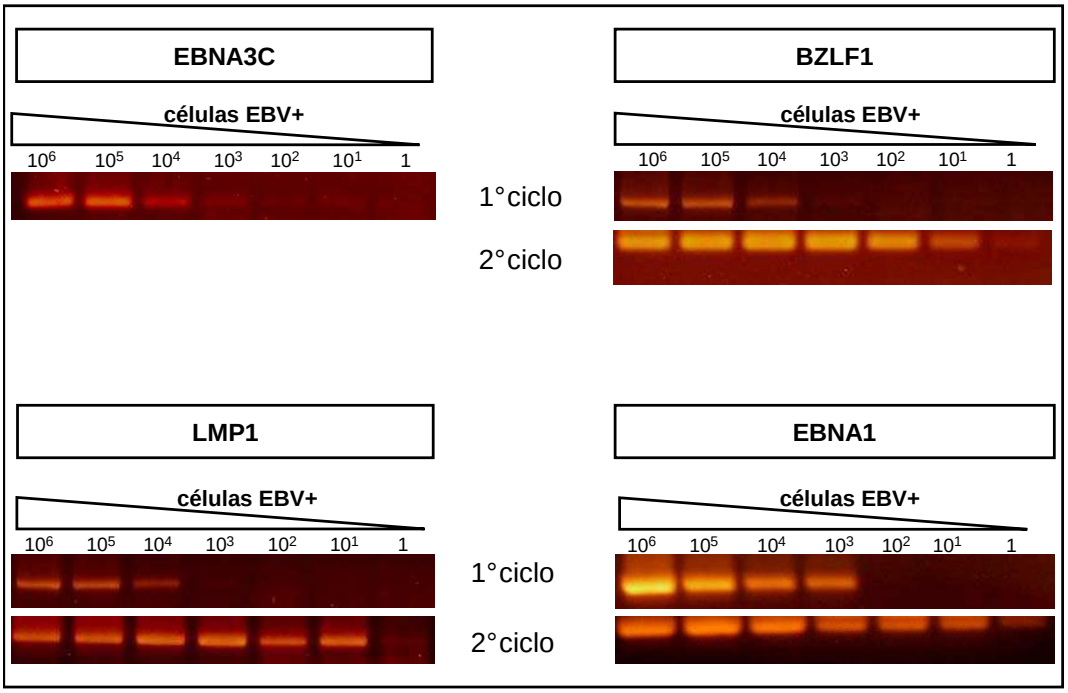


Figura 10: Análisis sensibilidad de PCR en 1º y 2º ciclos de amplificación por PCR en células B95.8 diluidas en células Ramos EBV-, para los fragmentos génicos estudiados. EBNA3C sólo se amplificó mediante un ciclo de PCR dado que no se realizó secuenciación posterior

5.3.1. Caracterización de variantes de la región promotora del gen BZLF1

En la serie de pacientes pediátricos analizados se identificaron dos variantes de Zp originalmente descriptas en otras regiones geográficas, las variantes Zp-P y Zp-V3. La variante Zp-P fue detectada en CMSP y SF de 13/15 (86%) pacientes con MNI y en 9/20 (45%) biopsias tumorales. Asimismo, la variante Zp-V3 fue detectada en ambos compartimentos de un paciente (7%) con MNI y en 9/20 (45%) muestras tumorales. Cabe destacar la coexistencia de estas dos variantes, que se evidenció por la presencia de picos dobles en el cromatograma en CMSP, pero no en las SF, en el paciente 9 (MNI 9) (Figura 11).

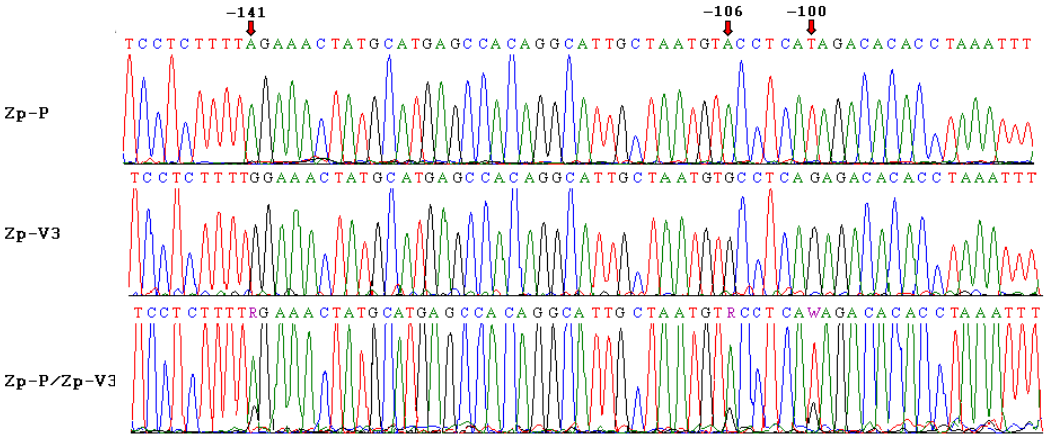


Figura 11: Análisis de secuencias de ADN de la región Zp. La variante Zp-P (cromatograma superior) es considerada prototípica y es la correspondiente al genoma viral de la línea celular B95.8. La variante Zp-V3 (medio) es la característica del genoma viral de la línea celular AG876. El cromatograma inferior corresponde a la muestra de CMSP del paciente 9 donde se observa la presencia de picos dobles en las posiciones con más de un nucleótido e indicadas por las flechas rojas.

Es importante destacar que además de las dos variantes previamente descriptas, se caracterizó una nueva variante en dos muestras de LH y en una muestra de MNI. Esta nueva variante contenía las mismas sustituciones descriptas en la variante Zp-V3 más una sustitución adicional (G→T) en la posición -49, y en consecuencia se denominó Zp-V3+49 [Lorenzetti y col., 2009]. Las tres variantes de Zp detectadas en este estudio se muestran alineadas en la figura 12.

Figura 12: Alineamiento de secuencias de ADN de la región Zp comprendida entre las posiciones -144 y -47. Se muestra esta región dado que por fuera de ella no se detectó ninguna sustitución nucleotídica. Las flechas rojas indican las posiciones con sustituciones nucleotídicas respecto de la variante prototípica Zp-P, también contenida en la línea de referencia B95.8.

Con el objetivo de analizar si las sustituciones descriptas en esta región alteraban la unión de los diversos factores celulares descriptos en la figura 4B, se realizó un análisis *in silico* de las tres variantes encontradas. Dicho análisis predictivo demostró que la sustitución (A→G) en la posición -141 en las variantes Zp-V3 y Zp-V3+49, generaba un sitio de unión para el factor NF-1 y la consecuente pérdida del sitio de unión del factor celular MEF-2D (Figura 13). Adicionalmente, la sustitución (G→T) en la posición -49 de la variante Zp-V3+49 produjo un sitio de unión para el factor celular NF-κB y la pérdida del sitio de unión de Sp1/Sp3 (Figura 13). La sustitución en la posición -100 no se localizó en el sitio de unión de factores celulares. Por otra parte, si bien la sustitución en -106 se localiza en un sitio de unión de la proteína Zebra, el análisis *in silico* no permitió determinar si esta sustitución modifica la capacidad de unión de esta proteína viral.

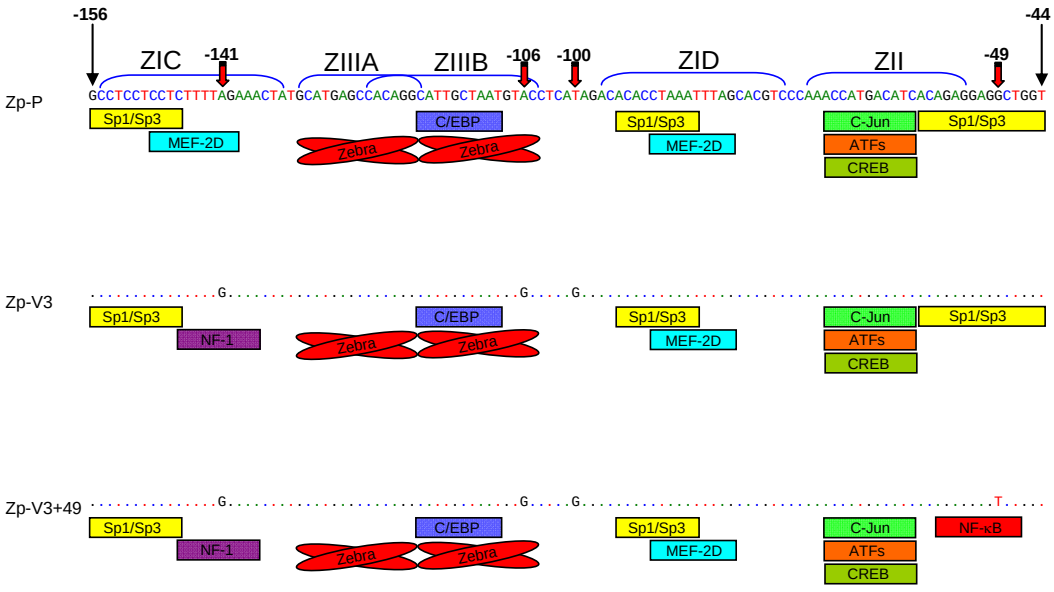


Figura 13: Análisis *in silico* de la región promotora del gen BZLF1. Se muestra en la figura la región comprendida desde la posición -156 hasta la posición -44 dado que las sustituciones nucleotídicas descriptas se encuentran comprendidas en esta región. Bajo la secuencia de cada variante viral se detallan los factores celulares y el activador viral Zebra con capacidad de unión al ADN en *cis*. Las flechas rojas indican las posiciones con sustituciones nucleotídicas respecto de la variante prototípica. Las llaves azules delimitan las diferentes regiones reguladoras.

La totalidad de las variantes de promotor de BZLF1 detectadas en los distintos pacientes, tiempos y tipos de muestras en ambas patologías se detallan en la tabla 6.

Tabla 6. Distribución de tipos virales y variantes de Zp

Paciente	*Muestra*	*Patología*	*Tipo EBV*	*Variante de Zp*		
				D0	*D30*	*D90*
MNI 1	CMSP	MNI	1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
	SF		1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
MNI 2	CMSP	MNI	1	Zp-P	No disp.	No disp.
	SF		1	Zp-P	No disp.	No disp.
MNI 3	CMSP	MNI	1	Zp-P	No disp.	No disp.
	SF		1	Zp-P	No disp.	No disp.
MNI 4	CMSP	MNI	1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
	SF		1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
MNI 5	CMSP	MNI	1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
	SF		1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
MNI 6	CMSP	MNI	1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
	SF		1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
MNI 7	CMSP	MNI	2	Zp-V3	Zp-V3	Zp-V3
	SF		2	Zp-V3	Zp-V3	Zp-V3
MNI 8	CMSP	MNI	1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
	SF		1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
MNI 9	CMSP	MNI	1	Zp-P/Zp-V3	No disp.	No disp.
	SF		1	Zp-P	No disp.	No disp.
MNI 10	CMSP	MNI	1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
	SF		1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
MNI 11	CMSP	MNI	1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
	SF		1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
MNI 12	CMSP	MNI	1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
	SF		1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
MNI 13	CMSP	MNI	1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
	SF		1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
MNI 14	CMSP	MNI	1	Zp-P	Zp-P	Zp-P
	SF		1	No amplif.	Zp-P	Zp-P
MNI 15	CMSP	MNI	1	Zp-V3+49	Zp-V3+49	No disp.
	SF		1	Zp-V3+49	Zp-V3+49	No disp.
T1	Biopsia GL	LNH	2		Zp-V3	
T2	Biopsia GL	LNH	2		Zp-V3	
T3	Biopsia GL	LNH	1		Zp-V3	
T4	Biopsia GL	LH	1		Zp-V3+49	
T5	Biopsia GL	LH	2		Zp-V3	
T6	Biopsia GL	LH	2		Zp-V3	
T7	Biopsia GL	LH	1		Zp-P	
T8	Biopsia GL	LH	1		Zp-V3+49	
T9	Biopsia GL	LH	2		Zp-V3	
T10	Biopsia GL	LH	1		Zp-P	
T11	Biopsia GL	LH	1		Zp-P	
T12	Biopsia GL	LH	1		Zp-P	
T13	Biopsia GL	LH	1		Zp-P	
T14	Biopsia GL	LH	1		Zp-P	
T15	Biopsia GL	LNH	1		Zp-V3	
T16	Biopsia GL	LNH	2		Zp-V3	
T17	Biopsia GL	LNH	1		Zp-P	
T18	Biopsia GL	LH	1		Zp-V3	
T19	Biopsia GL	LH	1		Zp-P	
T20	Biopsia GL	LH	1		Zp-P	

Abreviaturas: GL: ganglio linfático; No disp.: no disponible; No amplif.: no amplificable.

A diferencia de otros trabajos previos, en este estudio prospectivo se estudió la distribución de variantes virales en ambos compartimentos no sólo en la infección aguda (D0) sino también en su convalecencia (D30 y D90). A D0 todos los pacientes presentaron una sola variante de Zp en sus muestras de SF y sólo uno de ellos presentó coinfección con dos variantes virales en las muestras de CMSP. En aquellos pacientes en los que se contaba con las muestras de seguimiento, la variante original se mantuvo, en cada caso, a lo largo del estudio (D30 y D90) en ambos compartimentos.

Tanto en MNI como en linfomas se observó una asociación estadísticamente significativa entre el EBV2 y la variante Zp-V3 (P=0,0001). De hecho, el 100% de las muestras tipificadas como EBV2 (7/7) contenían la variante Zp-V3. Las muestras tipificadas como EBV1 presentaron las tres variantes descriptas de Zp, sin embargo se estableció una asociación significativa entre EBV1 y la variante Zp-P (P=0,0002). Si bien la variante Zp-V3+49 sólo se observó en el genoma de EBV1, el pequeño número de casos detectados con esta nueva variante no permitió establecer una asociación estadísticamente significativa entre estos dos polimorfismos. Por su parte, se observó la distribución preferencial de la variante Zp-V3 en linfomas EBV+ (P=0,02). Sin embargo, no se observó una asociación significativa entre una variante particular y la localización en un compartimento anatómico del huésped (P>0,05).

La coinfección observada por secuenciación directa en las CMSP del paciente MNI 9 se confirmó mediante clonado y secuenciación de diez clones obtenidos luego de una reacción de amplificación independiente. De forma similar, se confirmó también la presencia de una única variante de Zp en las SF del mismo paciente tras analizar un número similar de clones (Tabla 7).

Tabla 7: Variantes de Zp detectadas en los clones

Paciente	***Comp.***	***Muestra***	***Número de clon***									
			C1	***C2***	***C3***	***C4***	***C5***	***C6***	***C7***	***C8***	***C9***	***C10***
MNI 9	CMSP	D0	Zp-V3	Zp-P	Zp-P	Zp-V3	Zp-P	Zp-P	Zp-P	Zp-V3	Zp-P	Zp-P
	SF	D0	Zp-P	Zp-P	Zp-P	Zp-P	Zp-P	Zp-P	Zp-P	Zp-P	Zp-P	Zp-P

5.3.2. Caracterización de variantes de la región C-ter de EBNA1

Para la caracterización de las variantes de la región C-ter de EBNA1 se utilizó la nomenclatura introducida originalmente por Bhatia y col [Bhatia y col., 1996]. Según esta nomenclatura, las secuencias son clasificadas en cinco variantes principales según el residuo aminoacídico codificado por el codón 487. Luego, las variantes fueron exhaustivamente clasificadas en subvariantes de acuerdo a la presencia de mutaciones adicionales a la del codón 487.

Entre los pacientes con MNI se observaron, en primer término, las variantes P-ala, P-thr, V-leu y V-ala, según el aa codificado por el codón 487 y luego se realizó la subclasificación, según las sustituciones adicionales. De esta forma se caracterizaron las subvariantes: P-thr´ en 3/15 casos, P-thr´´ en 2/15, la variante original V-leu en 3/15, V-leu Ag en 3/15 y V-ala-iii en 1/15 casos, entre aquellos pacientes que no presentaron coinfección. Finalmente, se detectó la coinfección con dos subvariantes de EBNA1 en los tres casos restantes. Estas coinfecciones fueron con las subvariantes V-leu Ag y P-thr´ en el caso del paciente MNI 6; con la subvariante P-thr´´ y la variante P-ala en el paciente MNI 1 y con la variante P-ala y la subvariante V-ala-i en el paciente MNI 9.

Mientras que las subvariantes P-thr´, P-thr´´ y V-leu Ag habían sido previamente descriptas, las subvariantes V-ala-i y V-ala-iii se caracterizaron por primera vez durante el desarrollo de este trabajo [Lorenzetti y col., 2010a]. Si bien las subvariantes V-ala-i y V-ala-iii poseen un residuo alanina en la posición 487, estas acumulan suficientes mutaciones como para diferenciarse de la prototípica P-ala y en consecuencia ser consideradas como nuevas variantes de alanina. Esta idea fue reforzada mediante el análisis filogenético de las variantes detectadas en este estudio, en el cual se observó que las subvariantes de V-ala segregan conjuntamente y en forma independiente de la variante prototípica P-ala y de la subvariante P-ala´ (Figura 14).

Es importante mencionar que en este estudio la variante P-ala, considerada prototípica, sólo se detectó en dos casos y siempre en coinfección con otra subvariante.

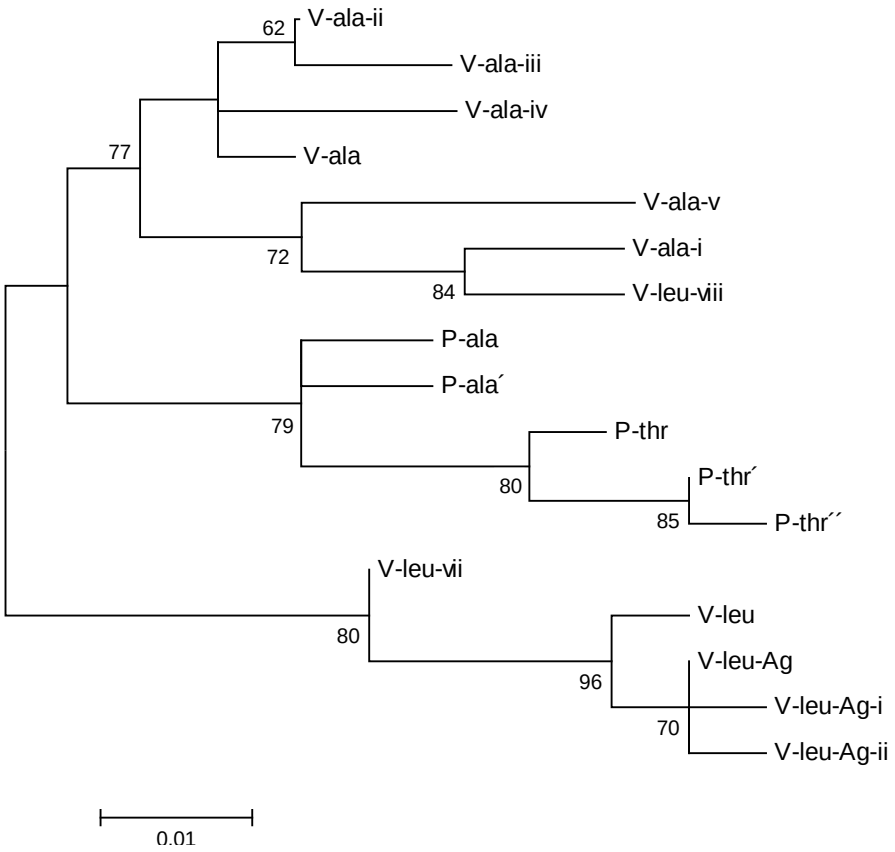


Figura 14: Árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento realizado con las secuencias directas de los fragmentos de amplificación de la región C-ter del antígeno EBNA1. Los valores de *bootstrap* indicados en los nodos fueron obtenidos luego de 1000 remuestreos. La escala indica el número de sustituciones por sitio. La variante V-ala (número de acceso de *GenBank* AF120228), la variante P-thr (número de acceso de *GenBank* X98164.1) y la variante P-ala de B95.8 (número de acceso de *GenBank* V01555) fueron incluidas en el análisis filogenético con el fin de analizar el agrupamiento de los aislamientos obtenidos en este trabajo.

Trece pacientes con MNI presentaron infección con una sola subvariante al momento del diagnóstico en tanto que en los dos casos restantes (MNI 6 y MNI 9) se observó la coinfección con dos subvariantes. En el caso del paciente MNI 6, a D0, la coinfección con las subvariantes P-thr´ y V-leu Ag se detectó en las SF pero no en las CMSP; mientras que en el caso del paciente MNI 9 ocurrió lo contrario; la coinfección por P-ala y V-ala-i se detectó en CMSP, pero no en SF. Por otro lado, de los 13 pacientes que no presentaron coinfección a D0, en el paciente MNI 1 se detectó la coinfección con las subvariantes P-thr´´ y P-ala en las CMSP, durante el período de convalecencia sólo en la muestra D90.

En el caso del paciente MNI 6, el hecho de disponer de las muestras de seguimiento en ambos compartimentos, permitió describir la dinámica de la infección primaria.

Durante la primo infección (D0) se detectaron las subvariantes P-thr´ y V-leu Ag en SF mientras que en CMSP sólo se detectó la subvariante V-leu Ag. Por su parte, en la muestra de seguimiento (D30) no se observaron indicios de coinfección ni en SF, donde sólo se detectó la subvariante P-thr´, ni en las CMSP donde la subvariante V-leu-Ag continuó siendo la única detectable. Hacia el final de la convalecencia (D90) la subvariante P-thr´ fue la única detectada en ambos compartimentos. Las subvariantes caracterizadas en cada paciente y su distribución en ambos compartimentos a lo largo del tiempo se resumen en la tabla 8.

Tabla 8. Distribución de tipos virales y variantes de EBNA1 en MNI

Paciente	***Muestra***	***Patología***	***Tipo EBV***	***Variante de EBNA1***		
				D0	***D30***	***D90***
MNI 1	CMSP	MNI	1	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´/P-ala
	SF		1	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´
MNI 2	CMSP	MNI	1	V-leu Ag	No disp.	No disp.
	SF		1	V-leu Ag	No disp.	No disp.
MNI 3	CMSP	MNI	1	P-thr´	No disp.	No disp.
	SF		1	P-thr´	No disp.	No disp.
MNI 4	CMSP	MNI	1	P-thr´	P-thr´	P-thr´
	SF		1	P-thr´	P-thr´	P-thr´
MNI 5	CMSP	MNI	1	V-leu Ag	V-leu Ag	V-leu Ag
	SF		1	V-leu Ag	V-leu Ag	V-leu Ag
MNI 6	CMSP	MNI	1	V-leu Ag	V-leu Ag	P-thr´
	SF		1	V-leu Ag/P-thr´	P-thr´	P-thr´
MNI 7	CMSP	MNI	2	V-leu	V-leu	V-leu
	SF		2	V-leu	V-leu	V-leu
MNI 8	CMSP	MNI	1	V-leu Ag	V-leu Ag	V-leu Ag
	SF		1	V-leu Ag	V-leu Ag	V-leu Ag
MNI 9	CMSP	MNI	1	P-ala/V-ala-i	No disp.	No disp.
	SF		1	V-ala-i	No disp.	No disp.
MNI 10	CMSP	MNI	1	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´
	SF		1	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´
MNI 11	CMSP	MNI	1	P-thr´	P-thr´	P-thr´
	SF		1	P-thr´	P-thr´	P-thr´
MNI 12	CMSP	MNI	1	V-leu	V-leu	V-leu
	SF		1	V-leu	V-leu	V-leu
MNI 13	CMSP	MNI	1	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´
	SF		1	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´
MNI 14	CMSP	MNI	1	V-leu	V-leu	V-leu
	SF		1	No amplif.	V-leu	V-leu
MNI 15	CMSP	MNI	1	V-ala-iii	V-ala-iii	No disp.
	SF		1	V-ala-iii	V-ala-iii	No disp.

Abreviaturas: No disp.: no disponible; no amplif..: no amplificable.

Los casos de coinfección observados por secuenciación directa fueron confirmados mediante clonado y secuenciación de diez clones obtenidos luego de una reacción de amplificación independiente (Tabla 9). En todos los casos se confirmó el resultado obtenido por secuenciación directa.

Tabla 9: Subvariantes de EBNA1 detectadas en los clones

Pac	***Com***	***Mue***	***Número de clon***									
			C1	***C2***	***C3***	***C4***	***C5***	***C6***	***C7***	***C8***	***C9***	***C10***
MNI 6	CMSP	D0	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag
	SF	D0	V-leu-Ag	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	V-leu-Ag	P-thr´	P-thr´	P-thr´
	CMSP	D30	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag	V-leu-Ag
	SF	D30	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´
	CMSP	D90	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´
	SF	D90	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´	P-thr´
MNI 9	CMSP	D0	P-ala	V-ala-i	V-ala-i	V-ala-i	V-ala-i	V-ala-i	P-ala	V-ala-i	V-ala-i	V-ala-i
	SF	D0	V-ala-i	V-ala-i	V-ala-i	V-ala-i	V-ala-i	V-ala-i	V-ala-i	V-ala-i	V-ala-i	V-ala-i
MNI 1	CMSP	D90	P-ala	P-thr´´	P-ala	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´	P-ala
	SF	D90	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´	P-thr´´

Abreviaturas: Pac.: paciente; Com.: compartimento; Mue.: muestra;

Entre los pacientes con linfomas se detectó la variante V-leu en 2/20 casos y las subvariantes virales P-ala´ (1/20), P-thr´ (4/20), V-leu Ag (4/20), todas ellas previamente descriptas. Se identificaron por primera vez y nombraron las subvariantes V-leu Ag-i, V-leu Ag-ii, V-leu-vii, V-leu-viii y las subvariantes V-ala-iii, V-ala-iv y V-ala-v. Cada una de estas subvariantes fue sólo detectada en 1 paciente. Finalmente, la subvariante V-ala-ii fue detectada en 2/20 linfomas EBV+. No se encontró indicio de coinfección en ninguno de los casos de linfomas EBV+. En la tabla 10 se detalla la subvariante viral caracterizada en cada linfoma EBV+.

Tabla 10. Distribución de Tipos virales y variantes de EBNA1 en tumores EBV+

Paciente	*Muestra*	*Patología*	*Tipo EBV*	*Variante de EBNA1*
T1	Biopsia GL	LNH	2	V-leu Ag
T2	Biopsia GL	LNH	2	P-thr´
T3	Biopsia GL	LNH	1	V-ala-ii
T4	Biopsia GL	LH	1	V-ala-iii
T5	Biopsia GL	LH	2	V-leu-vii
T6	Biopsia GL	LH	2	V-leu
T7	Biopsia GL	LH	1	P-thr´
T8	Biopsia GL	LH	1	V-ala-iv
T9	Biopsia GL	LH	2	V-leu Ag-i
T10	Biopsia GL	LH	1	V-leu Ag-ii
T11	Biopsia GL	LH	1	P-thr´
T12	Biopsia GL	LH	1	V-leu Ag
T13	Biopsia GL	LH	1	V-leu Ag
T14	Biopsia GL	LH	1	V-leu Ag
T15	Biopsia GL	LNH	1	V-ala-ii
T16	Biopsia GL	LNH	2	V-ala-v
T17	Biopsia GL	LNH	1	V-leu-viii
T18	Biopsia GL	LH	1	P-ala´
T19	Biopsia GL	LH	1	P-thr´
T20	Biopsia GL	LH	1	V-leu

Abreviaturas: GL: ganglio linfático

No se encontró una asociación significativa entre las variantes o subvariantes particulares detectadas en MNI y su distribución preferencial entre los compartimentos del hospedador (P>0,05). Tampoco se observó la asociación de una subvariante viral y la presencia en linfomas (P>0,05). En el análisis global de todas las subvariantes de EBNA1 halladas, tanto en MNI como en linfomas, la asociación entre las subvariantes de EBNA1 y el tipo viral también resultó no significativo (P>0,05).

El alineamiento de las secuencias de nucleótidos de todas las variantes y subvariantes de la región C-ter del gen BKRF1 caracterizadas en este trabajo se muestra en la figura 15.

Además de las sustituciones nucleotídicas del codón 487, que definen la variante del gen, se han detectado en ambas patologías ciertas mutaciones comunes a varias de las subvariantes descriptas, entre ellas las más frecuentes son: las transversiones CAA→GAA/CAT (Gln→Glu/His) en el codón 471; la transversión CCG→CAG (Pro→Gln) en el codón 476; la transversión AGT→TGT (Ser→Cys) en el codón 492; la sustitución de la tercer base del codón 499 por cualquiera de los tres nucleótidos restantes GAC→GAN (Asp→Glu); la transversión ACT→AAT (Thr→Asn) en el

codón 502; la transversión CTA→CTC (Leu→Leu) en el codón 520; la transversión ACT→ATT (Thr→Ile) en el codón 524 y la transición ATT→GTT (Ile→Val) en el codón 528. Estos cambios de aminoácidos comunes a diferentes subvariantes también han sido descriptos en varias líneas celulares EBV+, a saber, Ag876 (número de acceso de *Genbank* DQ279927), Raji (número de acceso de *Genbank* M20868) y P3HR1 (número de acceso de *Genbank* U21201) lo cual demostraría que estos cambios son compatibles con la funcionalidad de la proteína. Todas las sustituciones nucleotídicas detectadas en cada una de las subvariantes y los respectivos cambios de amino ácidos se detallan en la tabla 11.

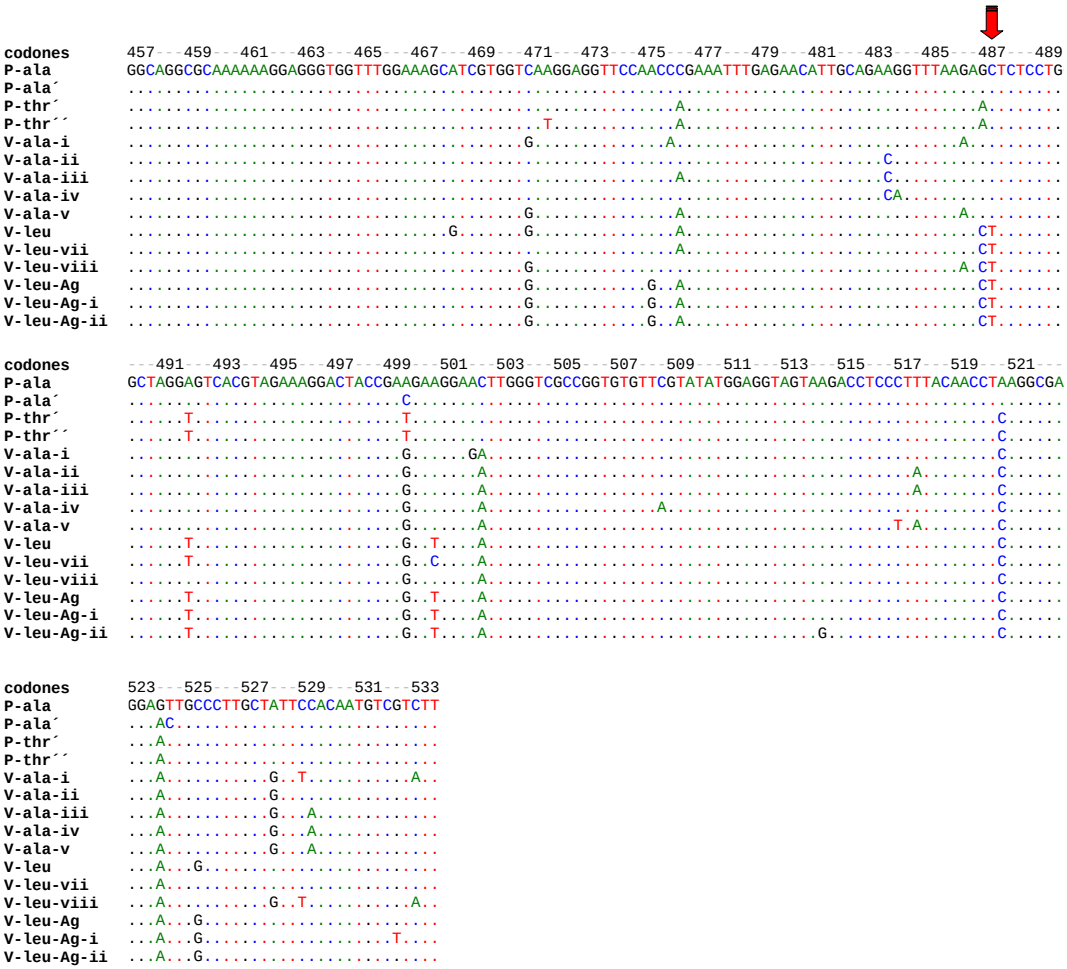


Figura 15: Alineamiento de variantes de secuencias de ADN de la región correspondiente al dominio *core* y región adyacente en el extremo 3´ del gen BKRF1 que codifica para EBNA1 caracterizadas en este trabajo. La flecha roja indica la posición del codón 487. La numeración en la parte superior indica el número de codón en referencia a la secuencia de B95.8.

Tabla 11. Sustituciones nucleotídicas y cambios aminoacídicos de EBNA1 en MNI y tumores

Paciente	***Variante***	***Codón***																						
		468	471	475	476	483	484	486	**487**	492	499	500	502	508	511	514	517	520	524	525	528	529	532	533
Mononucleosis infecciosa																								
B95.8; MNI 1*; MNI 9*	P-ala	CAT	CAA	ACC	CCG	GAA	GGT	AGA	**GCT**	AGT	GAC	GAA	ACT	TTC	GGA	AAG	CTT	CTA	ACT	GCC	ATT	CCA	CGT	CTT
		His	Gln	Thr	Pro	Glu	Gly	Arg	**Ala**	Ser	Asp	Glu	Thr	Phe	Gly	Lys	Leu	Leu	Thr	Ala	Ile	Pro	Arg	Leu
MNI 9*	V-ala-i		GAA		ACG			AAA			GAG		GAT		GGA			CTC	ATT		GTT			ATT
			Glu		Thr			Lys			Glu		Asp		Gly			Leu	Ile		Val			Ile
MNI 3; MNI 4; MNI 11; MNI 6*****	P-thr´				CAG				**ACT**	TGT	GAT							CTC	ATT					
					Gln				**Thr**	Cys	Asp							Leu	Ile					
MNI 1*; MNI 10	P-thr´´		CAT		CAG				**ACT**	TGT	GAT							CTC	ATT					
			His		Gln				**Thr**	Cys	Asp							Leu	Ile					
MNI 7	V-leu	CGT	GAA		CAG				**CTT**	TGT	GAG	GAT	AAT					CTC	ATT	GGC				
		Arg	Glu		Gln				**Leu**	Cys	Glu	Asp	Asn					Leu	Ile	Gly				
MNI 2; MNI 5; MNI 6*****; MNI 8	V-leu Ag		GAA	AGC	CAG				**CTT**	TGT	GAG	GAT	AAT					CTC	ATT	GGC				
			Glu	Ser	Gln				**Leu**	Cys	Glu	Asp	Asn					Leu	Ile	Gly				
MNI 15	V-ala-iii				CAG	GAC					GAG		AAT				CTA	CTC	ATT		GTT	CAA		
					Gln	Asp					Glu		Asn				Leu	Leu	Ile		Val	Gln		
Linfomas																								
T18	P-ala´										GAA								GTT					
											Glu								Val					
T3; T15	V-ala-ii					GAC					GAG		AAT				CTA	CTC	ATT		GTT			
						Asp					Glu		Asn				Leu	Leu	Ile		Val			
T4	V-ala-iii				CAG	GAC					GAG		AAT				CTA	CTC	ATT		GTT	CAA		
					Gln	Asp					Glu		Asn				Leu	Leu	Ile		Val	Gln		
T8	V-ala-iv					GAC	AGT				GAG		AAT	TTA				CTC						
						Asp	Ser				Glu		Asn	Leu				Leu						
T16	V-ala-v		GAA		CAG			AAA			GAG		AAT				TTA	CTC	ATT		GTT	CAA		
			Glu		Gln			Lys			Glu		Asn				Leu	Leu	Ile		Val	Gln		
T2; T7; T11; T19	P-thr´				CAG				**ACT**	TGT	GAT							CTC	ATT					
					Gln				**Thr**	Cys	Asp							Leu	Ile					
T6; T20	V-leu	CGT	GAA		CAG				**CTT**	TGT	GAG	GAT	AAT					CTC	ATT	GGC				
		Arg	Glu		Gln				**Leu**	Cys	Glu	Asp	Asn					Leu	Ile	Gly				
T1; T12; T13; T14	V-leu Ag		GAA	AGC	CAG				**CTT**	TGT	GAG	GAT	AAT					CTC	ATT	GGC				
			Glu	Ser	Gln				**Leu**	Cys	Glu	Asp	Asn					Leu	Ile	Gly				
T9	V-leu Ag-i		GAA	AGC	CAG				**CTT**	TGT	GAG	GAT	AAT					CTC	ATT	GGC			CTT	
			Glu	Ser	Gln				**Leu**	Cys	Glu	Asp	Asn					Leu	Ile	Gly			Leu	
T10	V-leu Ag-ii		GAA	AGC	CAG				**CTT**	TGT	GAG	GAT	AAT			AGG		CTC	ATT	GGC				
			Glu	Ser	Gln				**Leu**	Cys	Glu	Asp	Asn			Arg		Leu	Ile	Gly				
T5	V-leu-vii				CAG				**CTT**	TGT	GAG	GAC	AAT					CTC	ATT					
					Gln				**Leu**	Cys	Glu	Asp	Asn					Leu	Ile					
T17	V-leu-viii		GAA					AAA	**CTT**		GAG		AAT					CTC	ATT		GTT	TCA		ATT
			Glu					Lys	**Leu**		Glu		Asn					Leu	Ile		Val	Ser		Ile

Nota: El codón 487 se resalta en negrita; *****: coinfección. Las subvariantes P-ala, P-thr´ y V-leu fueron descriptas por Bhatia y col.[Bhatia y col., 1996]. P-thr´´ y P-ala´ fueron caracterizadas por fassone y col. [Fassone y col., 2000]. V-leu Ag es la secuencia contenida en la línea celular Ag 876 [Dolan y col., 2006] .

Todas las transversiones descriptas, salvo la correspondiente al codón 520, representaron un cambio en el aminoácido codificado por dicho codón (flechas rojas, Figura 16). Las correspondientes a los codones 471, 487, 492, 499 y 502, se hallaron localizadas dentro del dominio *core* de unión al ADN (aa 461 a 504); sin embargo, ninguna de ellas se localizó en los codones que codifican para sitios de unión con el surco menor del ADN (flechas verdes, Figura 16) [Ceccarelli y col., 2000]. Por su parte, las sustituciones aminoacídicas en los codones 524 y 528 no se localizaron dentro del dominio *core* (flechas rojas, Figura 16).

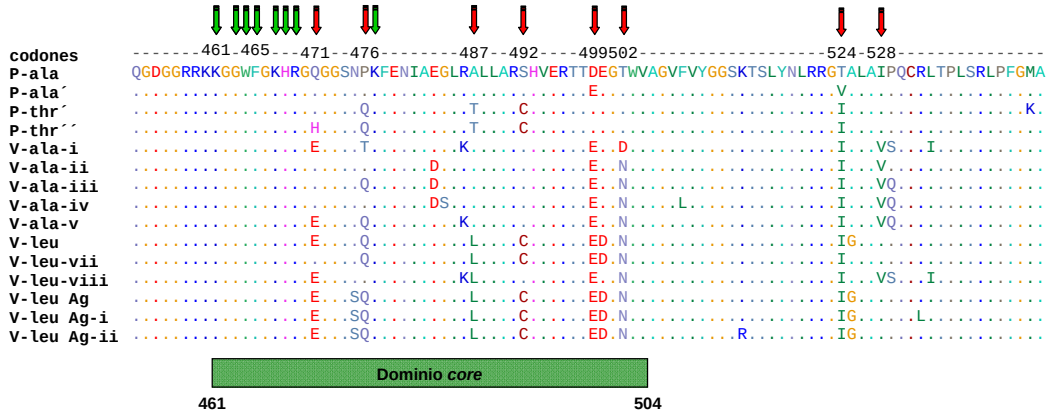


Figura 16: Alineamiento en aminoácidos de las variantes de la región *core* y región adyacente en el C-ter del gen que codifica para EBNA1 caracterizadas en este trabajo. La caja verde delimita la región de unión al ADN [Ceccarelli y col., 2000; Do y col., 2008]. Las flechas verdes señalan los aminoácidos que participan en la unión al ADN [Ceccarelli y col., 2000]. Las flechas rojas señalan las posiciones con mayor frecuencia de substitución detectadas en este estudio.

5.3.3. Caracterización de variantes de la región C-ter de LMP1

Con el fin de caracterizar las variantes de la región C-ter del antígeno LMP1, se utilizó la nomenclatura adoptada por Edwards y col. [Edwards y col., 1999] ya que esta contempla sustituciones en todo el largo del extremo C-ter de la proteína. Dado que dicha región presenta un elevado gran número de mutaciones, este esquema de clasificación se basa en la identificación de sustituciones patrón para identificar a las variantes, pero sin tener en cuenta sustituciones adicionales en otras posiciones. De este modo se identificaron hasta la fecha 10 variantes y múltiples subvariantes, que llevan a su vez el mismo nombre de la variante principal.

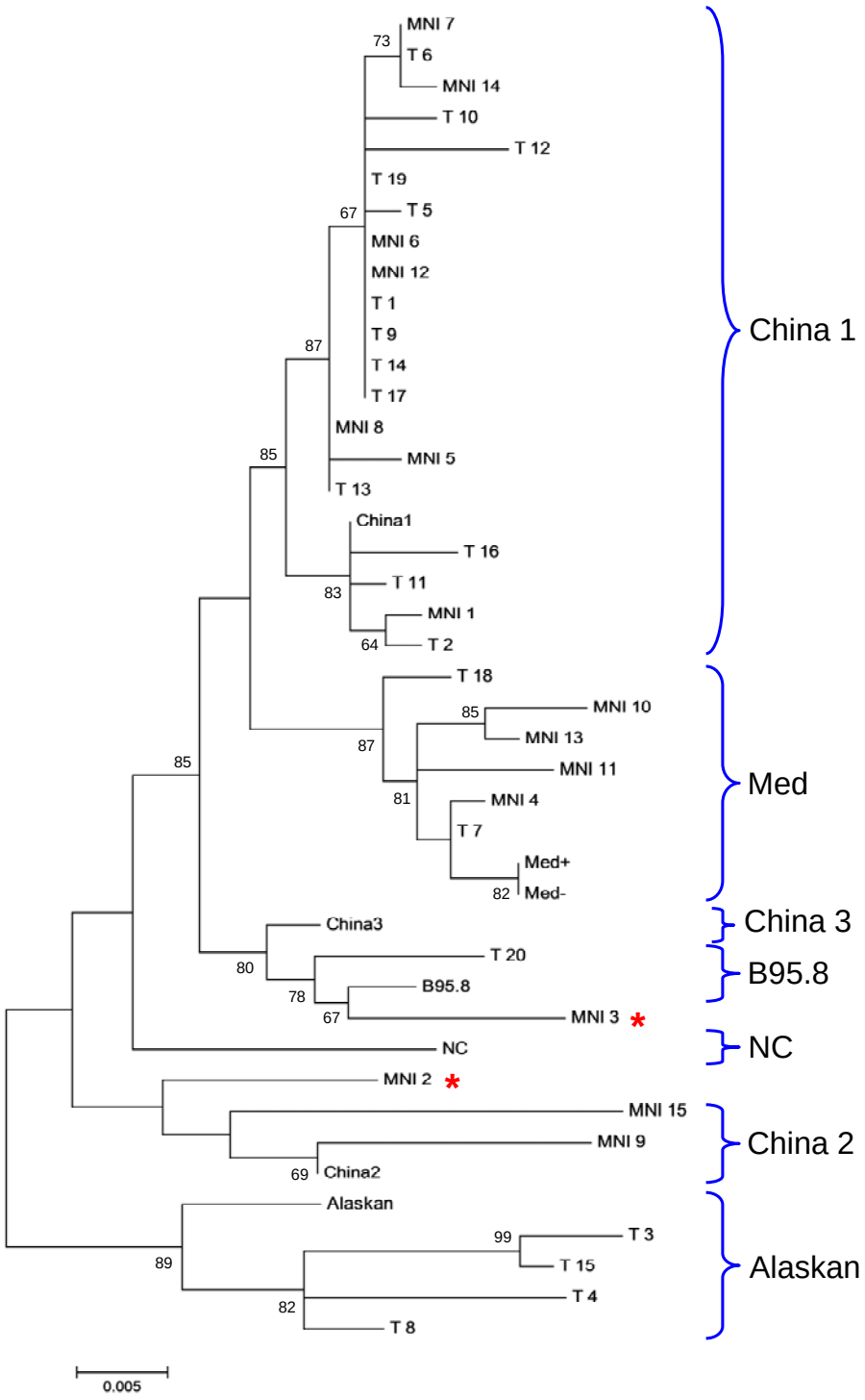


Figura 17: Árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento realizado con las secuencias directas de los fragmentos de amplificación de la región C-ter del antígeno LMP1. Los valores de *bootstrap* indicados en los nodos fueron obtenidos tras 1000 remuestreos. Las llaves azules encierran a los aislamientos caracterizados dentro de cada una de las variantes patrón. Los asteriscos rojos señalan a los dos aislamientos productos de una recombinación. La escala indica el número de sustituciones por sitio.

Las variantes detectadas en las diferentes muestras se clasificaron según el patrón de sustituciones detectadas y posteriormente se corroboraron los agrupamientos mediante la reconstrucción filogenética utilizando las secuencias patrón para cada variante, las cuales se obtuvieron de *GeneBank* (Figura 17).

Entre los pacientes con MNI, la variante China 1 resultó ser la más prevalente en nuestra región geográfica. Esta variante se identificó en 7/15 casos (46,7%), seguida por las variantes Med- en 4 casos (26,7%) y China 2 en 2 casos (13,3%). Los dos pacientes restantes, MNI 2 y MNI 3, presentaron cada uno una variante recombinante producto de la variante Med en el extremo 5´ y la variante China 2 o B95.8 en el extremo 3´, respectivamente. En ambos casos el sitio de recombinación fue la región repetitiva de 33 pb (rep33), región previamente descripta como muy favorable para la ocurrencia de esta clase de eventos.

Inicialmente, los eventos de recombinación observados en estos dos pacientes fueron estudiados mediante un análisis filogenético en el que se analizaron en forma independiente las regiones 5´ y 3´, a ambos lados de la zona repetitiva, de los fragmentos secuenciados junto con los de las secuencias patrón pero sin incluir la región rep33 ni la región del30. Las reconstrucciones filogenéticas demostraron que ambos fragmentos 5´ cosegregaron conjuntamente con las secuencias patrones correspondientes a las variantes Med+ y Med- (Figura 18A). Por su parte los fragmentos 3´ cosegregaron conjuntamente con las variantes China 2 (MNI 2) y B95.8 (MNI 3) (Figura 18B). La reconstrucción filogenética demostró además la existencia de la elevada homología existente en la región 3´ luego de la zona rep33 entre las variantes B95.8 y China 3, lo cual se evidenció por un agrupamiento próximo en el árbol filogenético. Esta elevada homología entre ambas secuencias (B95.8 y China 3) se debe a que la variante China 3 no presenta variación con respecto a la variante B95.8 en la zona adyacente a rep33 hacia el extremo 3´. Dado que la única diferencia entre las variantes Med+ y Med- es la presencia de la deleción de 30 pb (del30) luego de la zona rep33, hacia la región 3´, no fue posible diferenciar entre estas dos variantes en el extremo 5´ de las secuencias de los pacientes MNI 2 y MNI 3.

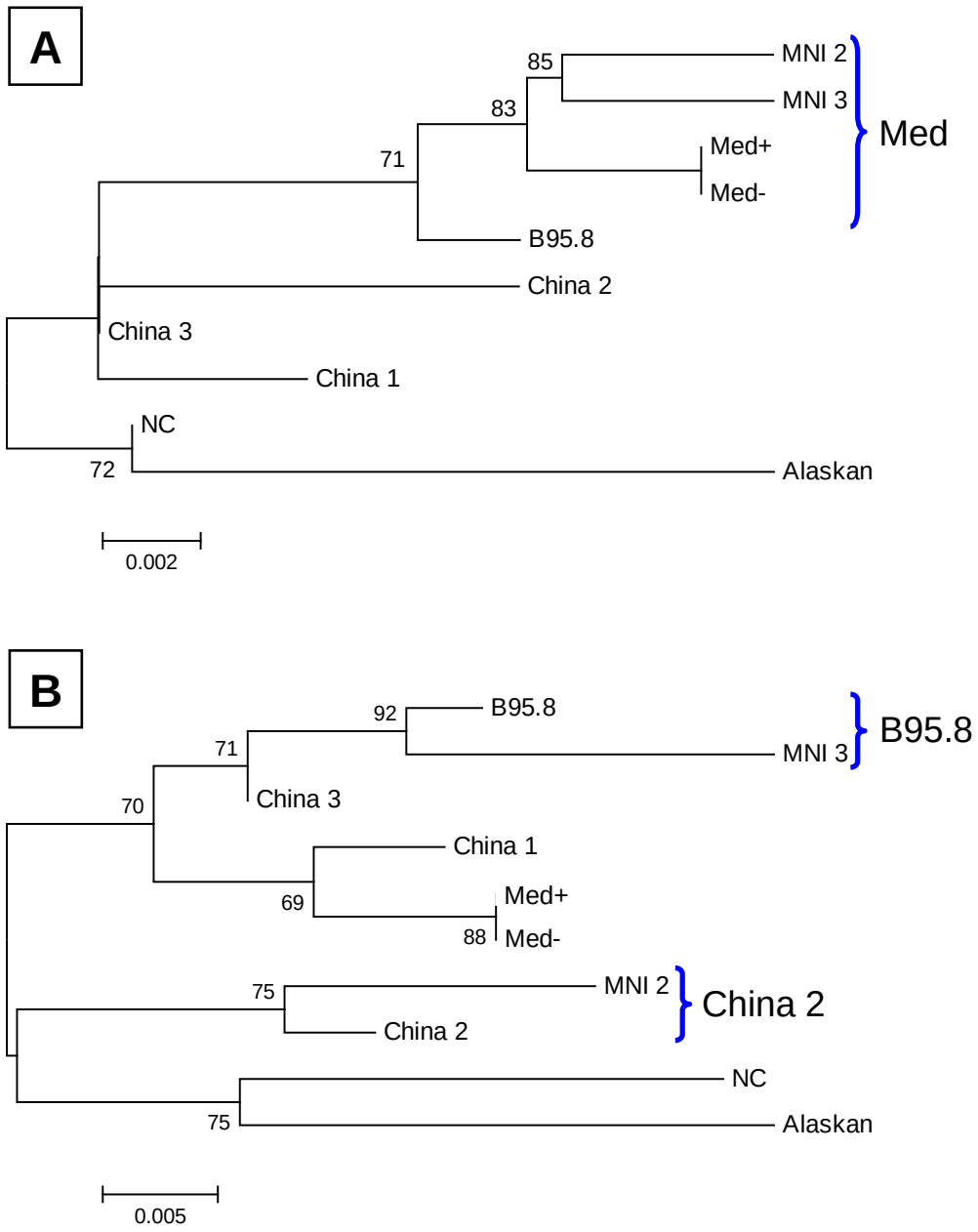


Figura 18: Árboles filogenéticos obtenidos a partir del alineamiento realizado con las secuencias directas de los fragmentos de amplificación de la región C-ter del antígeno LMP1. Los valores de *bootstrap* indicados en los nodos fueron obtenidos tras 1000 remuestreos. Las llaves azules encierran a los aislamientos caracterizados dentro de cada una de las variantes patrón. La escala indica el número de sustituciones por sitio. **A)** Árbol obtenido con el alineamiento de correspondiente a la región 5´ de los fragmentos secuenciados. **B)** Árbol obtenido con el alineamiento correspondiente a la región 3´ de los fragmentos secuenciados.

Posteriormente, las recombinaciones observadas en ambos casos fueron reconfirmadas mediante un análisis de recombinación *in silico* (Figura 19). Al igual que para el análisis filogenético, la región rep33 también fue omitida. En este análisis la región rep33 En la figura 19A se grafica el resultado del análisis comparativo de la secuencia nucleotídica obtenida a partir del aislamiento del paciente MNI 2 frente a la secuencias patrón de las variantes B95.8 (secuencia de referencia), Med, China 2 y China 3. Se observa que la variante del paciente MNI 2 presenta alta homología con la secuencia patrón Med en el extremo 5´ y, luego de la región rep33 hacia el extremo 3´, presenta homología con la secuencia patrón China 2. En la figura 19B se grafica el resultado del análisis comparativo obtenido a partir del aislamiento del paciente MNI 3 frente a la secuencias patrón de las variantes B95.8 (secuencia de referencia), Med, China 2 y China 3. Se observa en la figura que la variante del paciente MNI 3 presenta alta homología con la secuencia patrón Med en el extremo 5´ y luego de la región rep33 presenta homología con la secuencia patrón B95.8, siendo además el fragmento inmediatamente posterior a la región repetitiva también similar a la secuencia de la variante China 3. Como se describió previamente, ésta homología con ambas secuencias (B95.8 y China 3) se debe a que la variante China 3 no presenta variación con respecto a la variante B95.8 en la zona adyacente a rep33 hacia el extremo 3´.

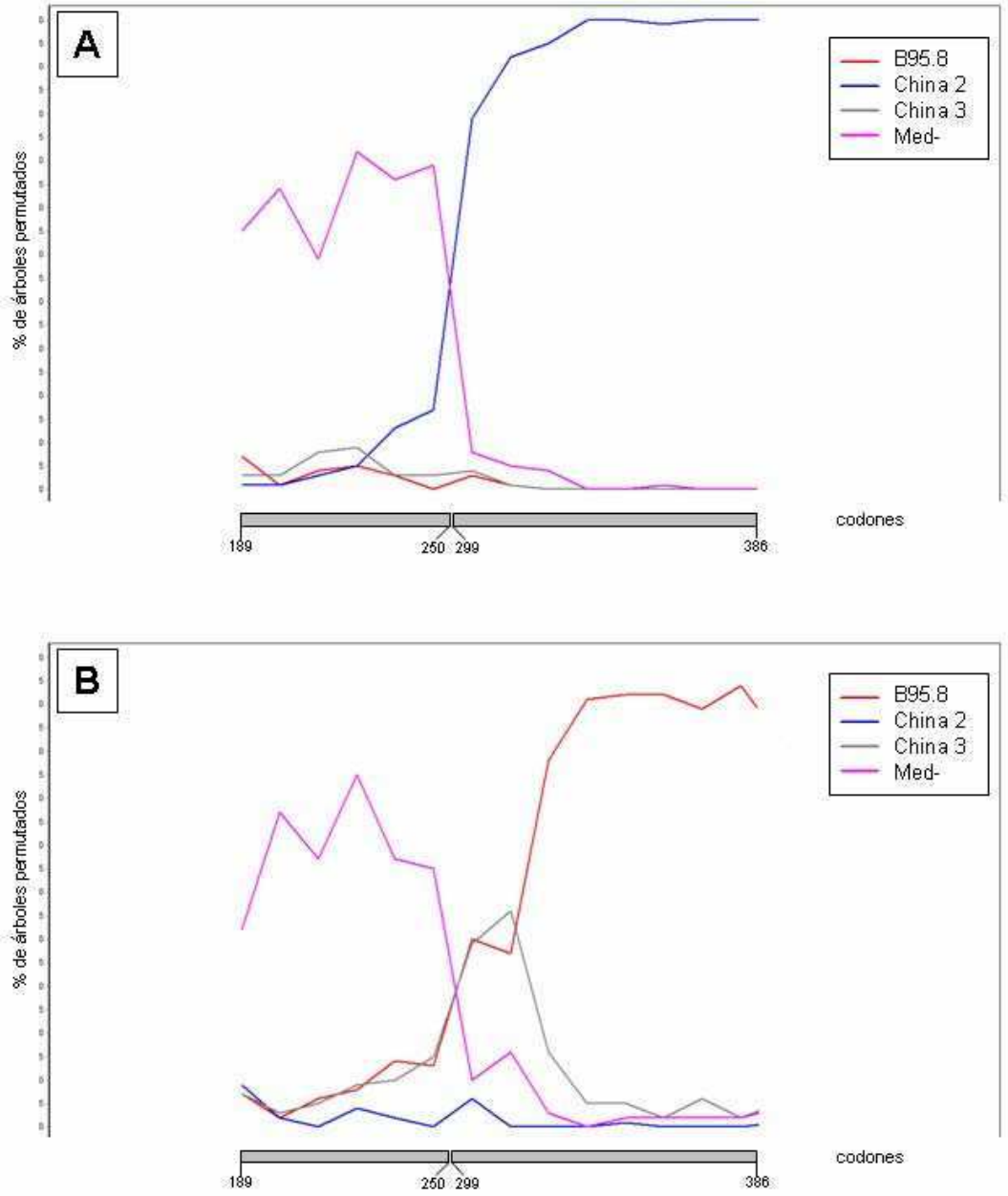


Figura 19: Estudio de recombinación realizado por comparación de las secuencias obtenidas de los aislamientos de los pacientes MNI 2 y MNI 3 con secuencias patrón. En el eje de las abscisas se muestra la representación esquemática del C-ter de la proteína LMP1. Las barras grises representan las regiones 5´ (codones 189-250) y 3´ (codones 299-386) de la región C-ter de LMP1 de las variante analizada. La secuencia rep33 fue omitida del análisis. **A)** Gráfico del análisis de recombinación de la secuencia del paciente MNI 2. **B)** Gráfico de recombinación de la secuencia del paciente MNI 3.

Curiosamente, no se observaron coinfecciones ni compartimentación de variantes de LMP1 entre los diferentes sitios anatómicos. Más aún, todos los pacientes presentaron en la primoinfección y a lo largo del seguimiento la misma variante descripta en cada caso al inicio del estudio. Ninguna de las variantes de LMP1 halladas resultó asociada a una distribución preferencial entre ambos compartimentos (P>0,05).

Mientras que la del30 junto con otras mutaciones puntuales define una variante, el número de rep33 y la presencia o ausencia de la ins15 pueden diferir entre aislamientos que agrupan conjuntamente en el análisis filogenético. En un primer análisis, se tuvo en cuenta la presencia de la rep33 y la ins15 en forma independiente de la variante caracterizada. Se describió entre los pacientes con MNI un rango de rep33 que abarcó entre 3 ½ y 6 ½ unidades repetitivas (3 ½ en 1 caso, 4 ½ en 4 casos, 5 ½ en 9 casos y 6 ½ en 1 caso). Cuando se tuvo en cuenta la variante viral en el análisis, los pacientes MNI 4, MNI 10, MNI 11 y MNI 13, cuyos aislamientos presentaron todos la variante Med-, variaron en el número de repeticiones, a saber el paciente MNI 4 presentó 4 ½ rep33, MNI 11 y MNI 13 presentaron 5 ½ rep33, finalmente MNI 10 presentó 6 ½ rep33. De forma similar los aislamientos de los pacientes MNI 9 y MNI 15 fueron caracterizados como China 2, pero contenían 4 ½ y 3 ½ rep33, respectivamente. Adicionalmente, se observó que el aislamiento del paciente MNI 1 fue el único con la variante China 1 que no contenía la ins15. Por otro lado, se detectó la inserción de 15 pb en la tercera o cuarta unidad de rep33 en 7/15 (46,7%) casos (Figura 20). En el caso de los pacientes MNI 3 y MNI 7, la ins15 se detectó en la tercera unidad de rep33 y en los pacientes MNI 5, MNI 6, MNI 8, MNI 12 y MNI 14 en la cuarta. No se encontró ningún caso con la ins15 presente en ambas posiciones. Hasta el momento, la ins15 sólo había sido descripta en la tercera unidad repetitiva de rep33; sin embargo, el hecho de ser detectada en la cuarta unidad de rep33 no alteró la formación de un sitio de unión JAK3.

Asimismo se observó una elevada proporción de aislamientos con la presencia del30, 8/15 (53,3%), mientras que el resto de los pacientes contenían la secuencia salvajes (*wt*) para esta región.

En la Tabla 12 se detallan todos los polimorfismos descriptos para los pacientes con MNI así como las sustituciones adicionales según el sistema de nomenclatura elegido.

Tabla 12. Distribución de tipos virales y variantes de LMP1 en pacientes con MNI

Pac	*Muestra*	*Tipo EBV*	*Variantes de LMP1*						*Variante*	*Sustituciones en codones adicionales a la variante*
			D0		*D30*		*D90*			
			estatus del30	*N° de rep33*	*estatus del30*	*N° de rep33*	*estatus del30*	*N° de rep33*		
MNI 1	CMSP	1	del30	5 1/2	del30	5 1/2	del30	5 1/2	China 1	189(A>C); 192(G>C); 315(A>C); 329(A>C)
	SF	1	del30	5 1/2	del30	5 1/2	del30	5 1/2	China 1	189(A>C); 192(G>C); 315(A>C); 329(A>C)
MNI 2	CMSP	1	*wt*	4 1/2	No disp.	No disp.	No disp.	No disp.	Med-China 2	212(G>A); 225(A>G); 282(A>G); 319(G>C); 331(G>C); 333(G>A); 355(G>C)
	SF	1	*wt*	4 1/2	No disp.	No disp.	No disp.	No disp.	Med-China 2	212(G>A); 225(A>G); 282(A>G); 319(G>C); 331(G>C); 333(G>A); 355(G>C)
MNI 3	CMSP	1	del30	4 1/2 + I	No disp.	No disp.	No disp.	No disp.	Med-B95.8	211(T>C); 212(G>A); 271(G>C); 277(A>C); 314(G>A); 328(G>C); 333(G>A); 356(T>C); 366(T>A)
	SF	1	del30	4 1/2 + I	No disp.	No disp.	No disp.	No disp.	Med-B95.8	211(T>C); 212(G>A); 271(G>C); 277(A>C); 314(G>A); 328(G>C); 333(G>A); 356(T>C); 366(T>A)
MNI 4	CMSP	1	*wt*	4 1/2	*wt*	4 1/2	*wt*	4 1/2	Med-	190(A>G); 212(G>A); 252(G>C); 282(A>G); 293(A>G); 328(A>C)
	SF	1	*wt*	4 1/2	*wt*	4 1/2	*wt*	4 1/2	Med-	190(A>G); 212(G>A); 252(G>C); 282(A>G); 293(A>G); 328(A>C)
MNI 5	CMSP	1	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	China 1	214(G>C); 332(G>C); 333(A>G)
	SF	1	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	China 1	214(G>C); 332(G>C); 333(A>G)
MNI 6	CMSP	1	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	China 1	213(C>A); 214(G>C)
	SF	1	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	China 1	213(C>A); 214(G>C)
MNI 7	CMSP	2	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	China 1	207(T>G); 213(C>A); 214(G>C)
	SF	2	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	China 1	207(T>G); 213(C>A); 214(G>C)
MNI 8	CMSP	1	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	China 1	-
	SF	1	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	China 1	-
MNI 9	CMSP	1	*wt*	4 1/2	No disp.	No disp.	No disp.	No disp.	China 2	192(G>C); 194(A>C); 223(A>G); 232(C>A); 250(G>C); 293(A>G); 306 (T>C); 308(A>C); 331(A>C) 355(G>C)
	SF	1	*wt*	4 1/2	No disp.	No disp.	No disp.	No disp.	China 2	192(G>C); 194(A>C); 223(A>G); 232(C>A); 250(G>C); 293(A>G); 306(T>C); 308(A>C); 331(A>C); 355(G>C)
MNI 10	CMSP	1	*wt*	6 1/2	*wt*	6 1/2	*wt*	6 1/2	Med-	212(G>A); 214(G>C); 252(G>C); 318(G>A); 318(G>A); 319(G>A); 355(G>T)
	SF	1	*wt*	6 1/2	*wt*	6 1/2	*wt*	6 1/2	Med-	212(G>A); 214(G>C); 252(G>C); 318(G>A); 318(G>A); 319(G>A); 355(G>T)
MNI 11	CMSP	1	*wt*	5 1/2	*wt*	5 1/2	*wt*	5 1/2	Med-	212(G>A); 252(G>C); 322(A>C); 326(G>C); 332(G>C)
	SF	1	*wt*	5 1/2	*wt*	5 1/2	*wt*	5 1/2	Med-	212(G>A); 252(G>C); 322(A>C); 326(G>C); 332(G>C)
MNI 12	CMSP	1	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	China 1	213(C>A); 214(G>C)
	SF	1	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	China 1	213(C>A); 214(G>C)
MNI 13	CMSP	1	*wt*	5 1/2	*wt*	5 1/2	*wt*	5 1/2	Med-	212(G>A); 252(G>C); 319(G>A); 355(G>T)
	SF	1	*wt*	5 1/2	*wt*	5 1/2	*wt*	5 1/2	Med-	212(G>A); 252(G>C); 319(G>A); 355(G>T)
MNI 14	CMSP	1	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	China 1	207(T>G); 213(C>A); 214(G>C); 322(A>G)
	SF	1	NA	NA	del30	5 1/2 + I	del30	5 1/2 + I	China 1	207(T>G); 213(C>A); 214(G>C); 322(A>G)
MNI 15	CMSP	1	*wt*	3 1/2	*wt*	3 1/2	No disp.	No disp.	China 2	192(G>C); 196(A>G); 201(C>T); 232(C>A); 244(A>T); 246(G>C); 331(G>C); 341(A>G); 352(A>G); 355(G>C)
	SF	1	*wt*	3 1/2	*wt*	3 1/2	No disp.	No disp.	China 2	192(G>C); 196(A>G); 201(C>T); 232(C>A); 244(A>T); 246(G>C); 331(G>C); 341(A>G); 352(A>G); 355(G>C)

Abreviaturas: No disp.: no disponible; NA: no amplificable; del30: contiene la deleción de 30 pb; *wt:* no contiene la deleción de 30 pb; I: contiene inserción de 15 pb.

Entre los pacientes con linfoma se caracterizaron las variantes China 1 en 13 casos (65%), la variante Alaskan en 4 casos (20%), Med- en 2 casos (10%) y B95.8 en 1 caso (5%). Al igual que lo previamente descripto para las otras regiones polimórficas estudiadas, no se detectó en ninguna muestra tumoral la coinfección con más de una variante de LMP1 en el único sitio anatómico analizado. Tampoco se detectó en estos pacientes la presencia de variantes recombinantes constituidas a partir de dos variantes diferentes. Si bien la variante Alaskan sólo fue detectada exclusivamente en linfomas EBV+, el análisis estadístico de los polimorfismos del fragmento C-ter de LMP1 determinó una asociación no significativa entre esta variante y su presencia en tumores (P>0,05).

Con respecto al análisis de las unidades repetidas rep33, el rango observado fue de 3 ½ a 6 ½ (3 ½ en 2/20 casos, 4 ½ en 2/20, 5 ½ en 15/20 y 6 ½ en 1/20 casos). En forma similar a lo ya descripto en los pacientes con MNI, se observó un número variable de rep33 entre los diferentes pacientes con la misma variante. Las variantes presentes en los pacientes T3 y T15 fueron caracterizadas como Alaskan al igual que en los pacientes T4 y T8, pero los primeros contenían 5 ½ rep33 mientras que los segundos sólo 3 ½. El paciente T6 fue el único cuyo aislamiento se caracterizó como China 1 y que a su vez presentó 6 ½ rep, mientras que el resto de los casos caracterizados como China 1 presentaron 5 ½ rep33. Finalmente, los aislamientos de los pacientes T7 y T18, caracterizados como Med-, presentaron 4 ½ y 5 ½ rep33, respectivamente. A su vez también se observó variación entre pacientes respecto a la presencia de la inserción de 15 pb en aquellos casos en los que se detectó la misma variante de LMP1. Para la variante China 1, 10 aislamientos presentaron la inserción mientras que los tres restantes no.

La presencia de la ins15 fue detectada en 11/20 (55%) de los casos, en la tercer unidad rep33 en 1/11 casos y en la cuarta unidad de rep33 en los 10 casos restantes. El sitio JAK3 creado por la ins15 tampoco se vio modificado en los aislamientos en los que ésta fue detectada en la cuarta rep33.

La presencia de del30 fue observada en 13/20 (65%).

En la tabla 13 se detallan todos los polimorfismos descriptos para los aislamientos obtenidos a partir de muestras de linfomas EBV+ así como las sustituciones adicionales según el sistema de nomenclatura elegido.

Tabla 13. Distribución de tipos virales y variantes de LMP1 en pacientes con linfomas EBV+

Paciente	*Muestra*	*Tipo EBV*	*Variantes de LMP1*			*Sustituciones en codones adicionales a la variante*
			estatus del30	*N° de rep33*	*Variante*	
T1	biopsia GL	2	del30	5 1/2 + I	China 1	213(C>A); 214(G>C); 230(A>G)
T2	biopsia GL	2	del30	5 1/2	China 1	189(A>C); 192(G>C); 216(G>A); 315(A>C)
T3	biopsia GL	1	*wt*	5 1/2	Alaskan	192(G>C); 228(G>C); 231(C>G); 240(A>G); 306(T>C); 339(A>C); 347(G>C); 355(G>A); 355(G>C); 357(C>T); 361(C>A); 366(T>A); 377(C>A)
T4	biopsia GL	1	*wt*	3 1/2	Alaskan	192(G>C); 209(G>C); 209(T>C); 218(A>G); 220(A>G); 222(G>C); 228(G>C); 266(A>G); 306(T>C); 338(T>A); 345(G>A); 348(T>G); 355(G>A); 355(G>C); 368(G>C)
T5	biopsia GL	2	del30	5 1/2 + I	China 1	213(C>A); 214(G>C); 214(A>C); 230(A>G)
T6	biopsia GL	2	del30	6 1/2 + I	China 1	207(T>G); 213(C>A); 214(G>C); 230(A>G)
T7	biopsia GL	1	*wt*	4 1/2	Med -	212(G>A); 252(G>C)
T8	biopsia GL	1	*wt*	3 1/2	Alaskan	192(G>C); 228(G>C); 306(T>C); 335(G>A); 355(G>A); 355(G>C); 366(T>A)
T9	biopsia GL	2	del30	5 1/2 + I	China 1	213(C>A); 214(G>C); 230(A>G)
T10	biopsia GL	1	del30	5 1/2 + I	China 1	190(A>G); 191(A>G); 196(A>G); 213(C>A); 214(G>C); 230(A>G); 332(G>T)
T11	biopsia GL	1	del30	5 1/2	China 1	189(A>C); 192(G>C); 309(A>C)
T12	biopsia GL	1	del30	5 1/2 + I	China 1	213(C>A); 214(G>C); 218(A>C); 227(C>G); 230(A>G); 353(C>G); 354(C>G)
T13	biopsia GL	1	del30	5 1/2 + I	China 1	209(T>C); 214(G>C); 230(A>G)
T14	biopsia GL	1	del30	5 1/2 + I	China 1	213(C>A); 214(G>C); 230(A>G)
T15	biopsia GL	1	wt	5 1/2	Alaskan	192(G>C); 228(G>C); 231(C>G); 240(A>G);265 (A>G); 266(A>G); 293(A>G); 306(T>C); 335()C>G); 339(G>A); 355(G>A); 355(G>C); 361(C>A); 366(T>A); 377(C>A)
T16	biopsia GL	2	del30	5 1/2	China 1	189(A>C); 192(G>C); 208(A>T); 220(A>G); 225(A>G)
T17	biopsia GL	1	del30	5 1/2 + I	China 1	213(C>A); 214(G>C); 230(A>G)
T18	biopsia GL	1	*wt*	5 1/2	Med -	212(G>A); 293(A>G); 330(A>G); 349(A>C)
T19	biopsia GL	1	del30	5 1/2 + I	China 1	213(C>A); 214(G>C); 230(A>G)
T20	biopsia GL	1	*wt*	4 1/2 +I	B95.8	212(G>A); 220(A>G); 240(A>G); 246(A>C); 273(A>G); 286(T>G) 342(A>T); 366(T>A)

Abreviaturas: GL: ganglio linfático; del30: contiene la deleción de 30 pb; *wt:* no contiene la deleción de 30 pb; I: contiene inserción de 15 pb.

Con el objetivo de determinar la posible asociación entre los distintos polimorfismos de LMP1 estudiados, se realizó un análisis integrado de los mismos en todos los aislamientos obtenidos en ambas patologías. Para esto se consideró el número de rep33 en dos categorías: bajo número de rep33 (≤ 4 ½ repeticiones) y elevado número de rep33 (≥ 5 ½ repeticiones). De esta forma se observó una asociación estadísticamente significativa entre del30 y un número elevado de rep33 (P=0,0009) así como también entre del30 y la presencia de la inserción de 15 pb (P=0,0001), mientras que la asociación entre un elevado número de rep33 y la presencia de la inserción resultó no significativa (P>0,05). Por su parte, ni la presencia de del30 (P>0,05) ni un elevado número de rep33 (P>0,05) estuvieron asociadas en forma estadísticamente significativa a las patologías neoplásicas. Si bien no se describió una asociación entre una variante de LMP1 en particular y el tipo viral (P>0,05), se observó que el genoma de EBV 2 siempre contuvo la del30 y en consecuencia la asociación de estos dos polimorfismos resultó significativa (P=0,0272). Contrariamente, en el EBV1 ambos polimorfismos, del30 y *wt*, se distribuyeron de forma similar (P>0,05). Paralelamente, tampoco se encontró una asociación entre el tipo viral y el número de rep33 o la presencia de ins15 (P>0,05).

En la figura 20 se muestra una selección de las variantes caracterizadas en este trabajo donde se observan los polimorfismos y sustituciones nucleotídicas más informativos. Ningún polimorfismo puntual resultó asociado a neoplasia (P>0,05). Entre las sustituciones comunes a todos los aislamientos se encuentran los codones 212, 309, 338, 342 y 366, siendo la sustitución en el codón 342 la única que no produce un cambio en el aa codificado. Estas sustituciones fueron descriptas previamente en el genoma de las líneas celulares P3HR1 y Raji, por lo que se podría suponer que no alteran las capacidades transformantes de LMP1. A su vez, no se detectaron mutaciones en los sitios de unión de factores TRAFF y/o TRADD, lo cuales resultan fundamentales para la actividad transformante de LMP1 (Fig 21).

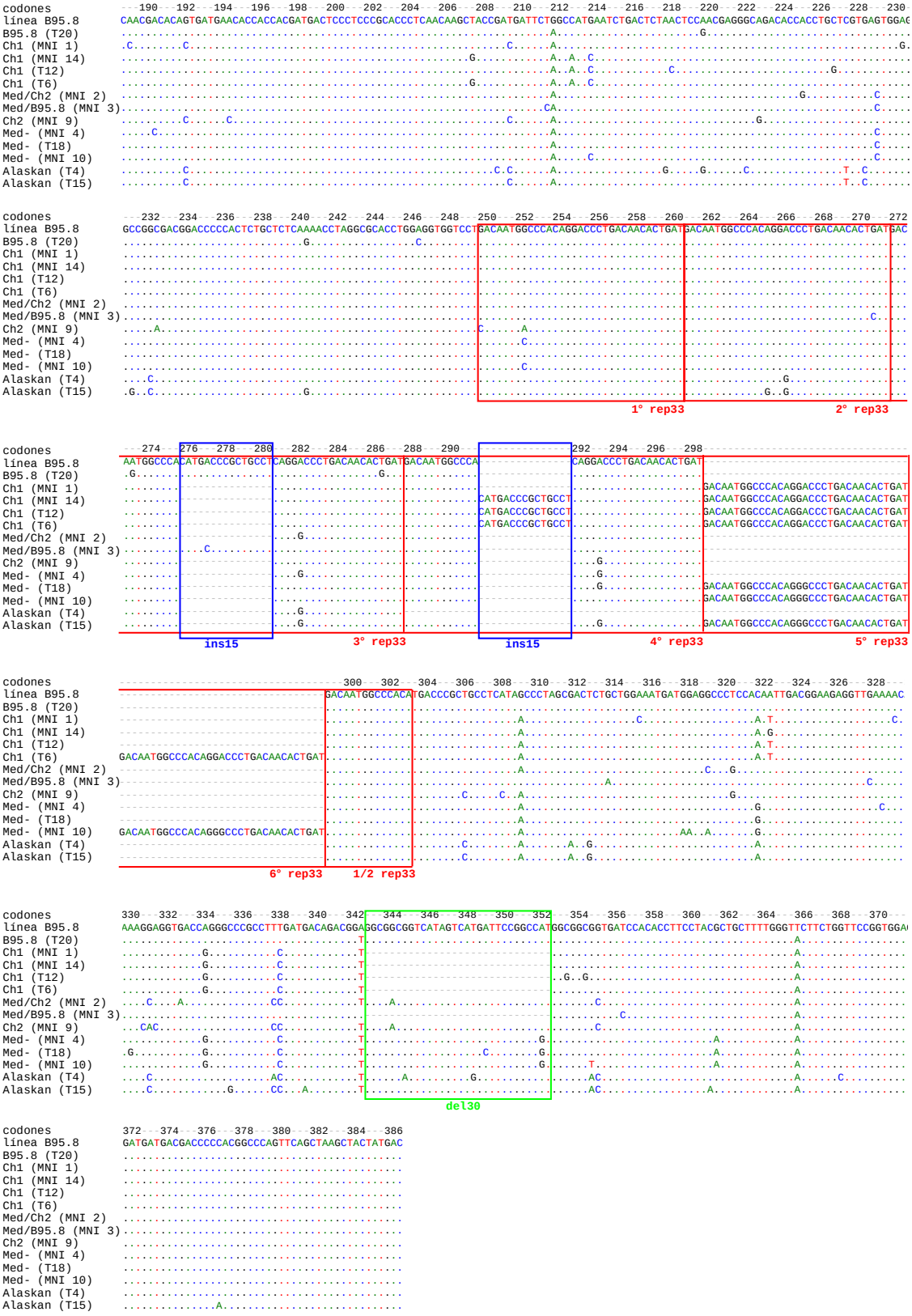

codones
línea B95.8
B95.8 (T20)
Ch1 (MNI 1)
Ch1 (MNI 14)
Ch1 (T12)
Ch1 (T6)
Med/Ch2 (MNI 2)
Med/B95.8 (MNI 3)
Ch2 (MNI 9)
Med- (MNI 4)
Med- (T18)
Med- (MNI 10)
Alaskan (T4)
Alaskan (T15)
1° rep33
2° rep33
ins15
3° rep33
ins15
4° rep33
5° rep33
6° rep33
1/2 rep33
del30

Figura 20: Alineamiento en nucleótidos de la región 3´ del gen BNLF1 que codifica para LMP1. Se muestran alineadas una selección de las variantes caracterizadas en este trabajo. La numeración de los codones en la parte superior del alineamiento se refiere a la secuencia de referencia, línea celular B95.8. A la izquierda de cada secuencia se indica la variante (Ch1: China 1, Ch2: China 2) y entre paréntesis el paciente del cual proviene el aislamiento. Los recuadros rojos delimitan las unidades repetitivas de rep33. Los recuadros azules señalan los sitios de inserción de ins15 y el recuadro verde delimita la deleción del30.

En la figura 21 se muestran los alineamientos de la selección de variantes de LMP1 en aa y se muestran los dominios de interacción con proteínas celulares.

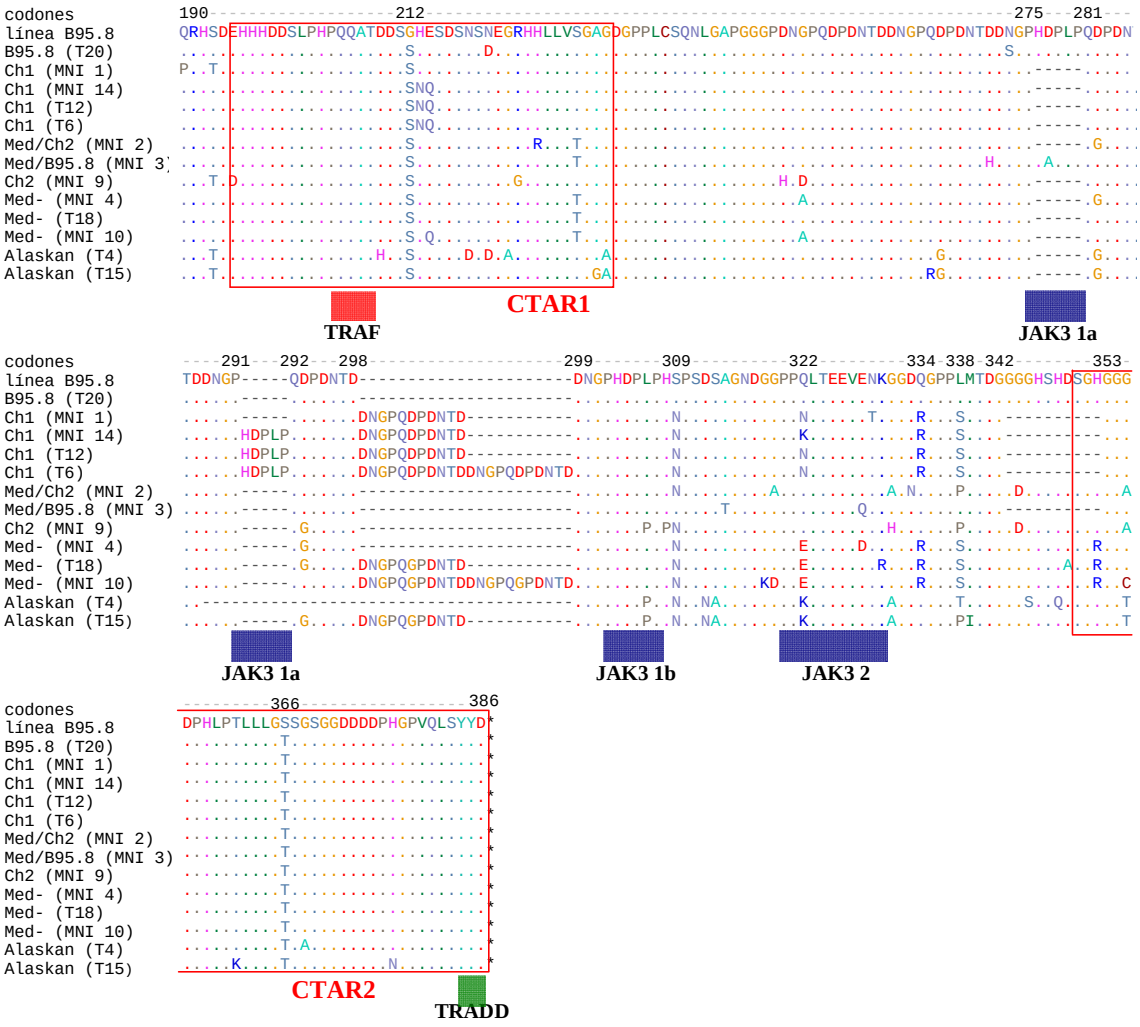


Figura 21: Alineamiento en aminoácidos de la región C-ter de LMP1 de una selección de variantes caracterizadas en este trabajo. La numeración de los codones en la parte superior del alineamiento se refiere a la secuencia de referencia, línea celular B95.8, y señalan los codones más frecuentemente sustituidos. A la izquierda de cada secuencia se indica la variante Ch1: China 1, Ch2: China 2) y entre paréntesis el paciente del cual proviene el aislamiento. Los recuadros rojos señalan los dominios CTAR1 y CTAR2. El cuadrado rojo señala el sitio de unión del factor TRAF, los cuadrados azules señalan los sitios de unión de JAK3 y el cuadrado verde señala el sitio de unión del factor TRADD. El asterisco (*) indica codón *stop*.

5.4. Análisis integral de asociación de todos los polimorfismos

Con el objetivo de evaluar la posible asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados, se realizó un análisis *in silico*, donde se reconstruyeron todos los arreglos genómicos detectados en ambos grupos de pacientes (Tabla 14).

Tabla 14. Arreglos genómicos de EBV

Arreglo N°	***Frec***	***Pacientes***	***Polimorfismos (EBNA3C_BZLF1_EBNA1_LMP1)***
1	2	MNI 1*****, T11	EBV1_Zp-P_P-thr_5 1/2 rep33 ins15- del30
2	1	MNI 2	EBV1_Zp-P_V-leu_4 1/2 rep33 ins15- wt
3	1	MNI 3	EBV1_Zp-P_P-thr_4 1/2 rep33 ins15+ del30
4	2	MNI 4, T7	EBV1_Zp-P_V-leu_5 1/2 rep33 ins15+ del30
5	10	MNI 5, MNI 6*****, MNI 8, MNI 12, MNI 14, T10, T12, T13, T14, T17	EBV1_Zp-P_V-leu_5 1/2 rep33 ins15+ del30
6	4	MNI 7, T1, T5, T9	EBV2_Zp-V3_V-leu_5 1/2 rep33 ins15+ del30
7	1	MNI 9*****	EBV1_Zp-P_V-ala_4 1/2 rep33 ins15- wt
8	1	MNI 10	EBV1_Zp-P_P-thr_6 1/2 rep33 ins15- wt
9	2	MNI 11, MNI 13	EBV1_Zp-P_P-thr_5 1/2 rep33 ins15- wt
10	3	MNI 15, T4, T8	EBV1_Zp-V3+49_V-ala_3 1/2 rep33 ins15- wt
11	1	T2	EBV2_Zp-V3_P-thr_5 1/2 rep33 ins15- del30
12	2	T3, T15	EBV1_Zp-V3_V-ala_5 1/2 rep33 ins15- wt
13	1	T6	EBV2_Zp-V3_V-leu_6 1/2 rep33 ins15+ del30
14	1	T16	EBV2_Zp-V3_V-ala_5 1/2 rep33 ins15- del30
15	1	T18	EBV1_Zp-V3_P-ala_5 1/2 rep33 ins15- wt
16	1	T19	EBV1_Zp-P_P-thr_5 1/2 rep33 ins15+ del30
17	1	T20	EBV1_Zp-P_V-leu_4 1/2 rep33 ins15+ wt

Abreviaturas: Frec: frecuencia; ins15+: presencia de ins15; ins15-: ausencia de ins15; wt: ausencia de del30.
Notas: (*) indica los pacientes con coinfección en algún momento del estudio, pero sólo la variante mayoritaria fue incluida en el análisis.

Si bien no se encontraron asociaciones completas entre los polimorfismos de las distintas regiones génicas estudiadas (P>0,05), el arreglo número 5 resultó el más frecuente en esta región geográfica. En este arreglo genómico se encontraron combinadas las variantes génicas

que previamente en este estudio, se había descripto en forma individual como las de mayor circulación en nuestra región geográfica. A su vez, este arreglo se observó equitativamente tanto en pacientes con MNI (5 casos) como en linfomas EBV+ (5 casos). Por su parte y a pesar de sólo detectarse en tres casos, resulta de sumo interés destacar la presencia del arreglo número 3, dado que éste combina polimorfismos individuales de baja frecuencia identificados casi exclusivamente en nuestra región. Dicho arreglo incluye para el gen BZLF1 la variante Zp-V3+49 sólo detectada y caracterizada por primera vez en este trabajo, para EBNA1 la variante V-ala sólo descripta en América del Sur, particularmente en aislamientos de Argentina y Brasil, y 3 ½ rep33 en la región C-ter de LMP1, sólo descripta en forma esporádica fuera de nuestra región.

Aunque no se observó una asociación significativa entre todos los polimorfismos de EBV estudiados en este trabajo, sí se detectó una asociación adicional entre algunos de ellos. En consecuencia, se encontró una asociación significativa entre la variante Zp-V3, en la región promotora del gen BZLF1 y un elevado número de rep33 (P=0,0363) así como también su asociación con el EBV2 (P=0,0001) previamente descripta en el apartado 5.3.1. Sin embargo, las variantes del gen que codifica para EBNA1 no se encontraron asociadas con ningún polimorfismo de los genes que codifican para LMP1, la región promotora de BZLF1 ni con el tipo viral, definido por el gen que codifica para EBNA3C (P>0.05 en todos los casos).

5.5. Análisis de la carga viral

Los valores de carga viral en plasma fueron determinados por PCR cuantitativa en los pacientes con MNI con el fin de establecer si alguna variante viral en particular se asocia con un aumento de la carga viral, lo cual podría ser consecuencia de una mayor replicación durante la infección aguda y/o persistencia en la replicación viral durante el período de convalecencia analizado (Figura 22).

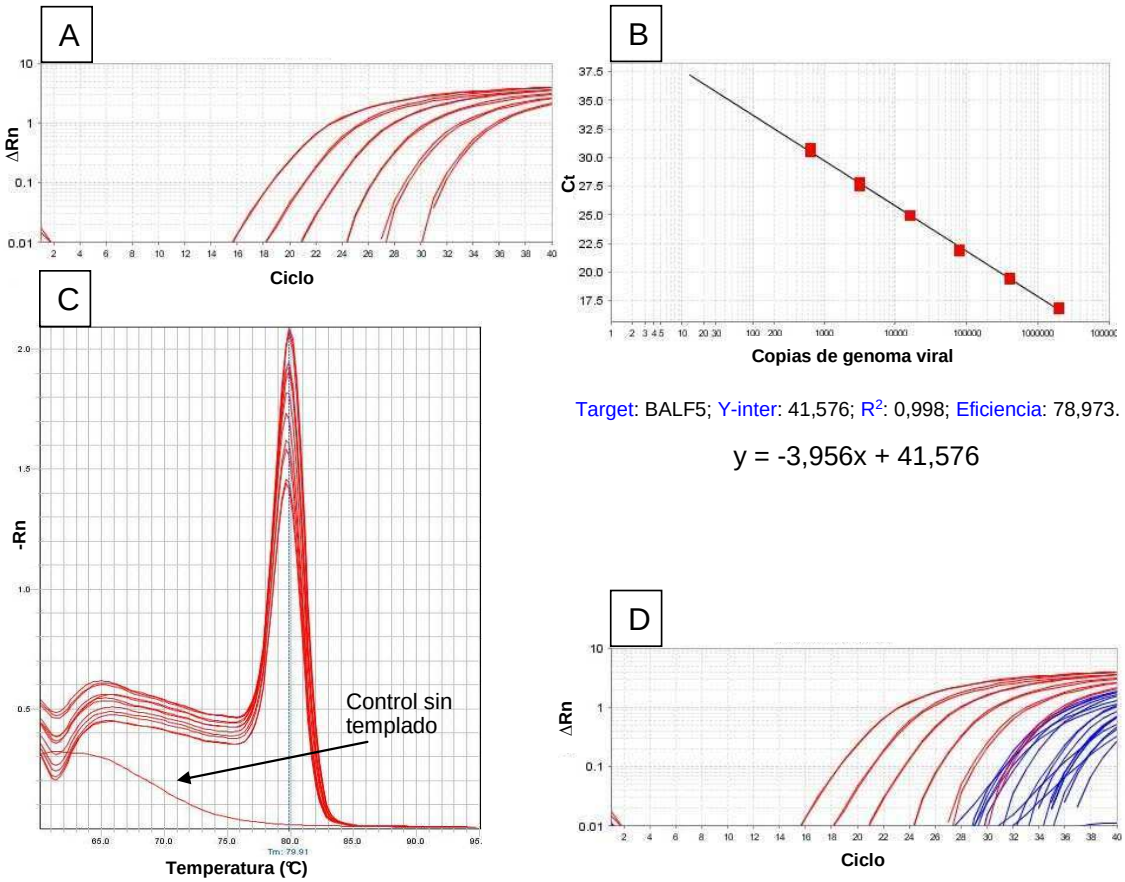


Figura 22: Análisis de carga viral en pacientes con MNI. **A)** Diagrama de amplificación en escala logarítmica de la curva estándar realizada con diluciones seriadas 1/5 a partir del ADN extraído de $4x10^4$ células Raji, las cuales contienen 50 copias del genoma de EBV por célula. La primera curva de amplificación corresponde a $2x10^6$ copias de genoma viral y la última a 640 copias de genoma viral. Se grafica el cambio de fluorescencia (ΔRn) contra el numero de ciclo. **B)** Curva de calibración linealizada generada al graficar el valor decimal de Ct para cada punto de la curva contra el número de copias de genoma viral. Bajo la curva se detalla la ecuación de la recta, la eficiencia de la reacción, el coeficiente de regresión de la recta y el valor de intersección con el eje Y, lo que correspondería al número predictivo de ciclos necesarios para detectar una copia de genoma viral. **C)** Gráfico derivativo de la curva de disociación de los productos de amplificación de la curva estándar. Un sólo pico de disociación prueba la presencia de sólo un producto de amplificación y en consecuencia la especificidad de los cebadores. **D)** Diagrama de amplificación en escala logarítmica de la curva estándar (rojo) y muestras (D0) de los pacientes con MNI (azul).

En la tabla 15 se detallan los valores de carga viral determinados en los pacientes con MNI a lo largo del estudio.

Tabla 15. Valores de carga viral en pacientes con MNI

Paciente	*Días de evolución*	*D0*	*D30*	*D90*
MNI 1	15	neg.	neg.	neg.
MNI 2	7	552	No disp.	No disp.
MNI 3	7	4948	No disp.	No disp.
MNI 4	5	neg.	neg.	neg.
MNI 5	13	3455	neg.	neg.
MNI 6	7	5250	neg.	neg.
MNI 7	7	250	neg.	neg.
MNI 8	6	neg.	neg.	neg.
MNI 9	10	178	No disp.	No disp.
MNI 10	15	neg.	neg.	neg.
MNI 11	10	660	neg.	neg.
MNI 12	12	neg.	neg.	neg.
MNI 13	10	neg.	neg.	neg.
MNI 14	7	neg.	neg.	neg.
MNI 15	9	980	neg.	No. disp.

Abreviaturas: neg.: negativo; No disp.: no disponible
Nota: El resultado de la carga viral se expresa como copias de genoma viral/ ml de plasma.

Al momento de la consulta diagnóstica (D0), sólo 8/15 pacientes presentaron valores detectables de carga viral en plasma. En dichos casos, los valores oscilaron entre 178 y 5250 copias de genoma/ml de plasma y resultaron menores a los valores observados en otras patologías relacionadas con EBV en pacientes inmunocomprometidos [Gulley y col., 2010], lo cual podría indicar un eficiente control de la infección por parte del sistema inmunitario del paciente. Más aún, en todos los casos en los que se contaba con muestras de seguimiento, tanto a tiempo D30 como D90, siempre se observaron valores de carga viral negativos.

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

En este estudio prospectivo, realizado entre los años 2007 y 2011, se analizaron y caracterizaron las variantes de la secuencia de la región promotora del gen BZLF1 y de la región que codifica el extremo carboxilo-terminal de los antígenos virales EBNA1 y LMP1 que circulan en nuestra región geográfica en pacientes pediátricos con MNI y linfomas EBV+. Se estudió además la dinámica de la infección primaria por EBV en dos compartimentos, tanto durante la etapa aguda como durante su convalecencia.

Se ha demostrado que la epidemiología del EBV en países en vías de desarrollo, como la Argentina, presenta un patrón con una primoinfección a muy temprana edad y sólo ocasionalmente con sintomatología asociada [Chabay y col., 1999; Chan y col., 2001; Luzuriaga y col., 2010]. Este perfil epidemiológico con una infección primaria esencialmente asintomática en niños, sería la principal causa del número acotado de pacientes sintomáticos enrolados, dado que la pesquisa se realizó desde el examen clínico. Este hecho marcó una diferencia respecto del número de pacientes estudiados en comparación con otros trabajos que incluyeron exclusivamente pacientes adultos [Higgins y col., 2007], en quienes la infección primaria suele manifestarse con sintomatología asociada [Luzuriaga y col., 2010; Vouloumanou y col., 2012].

Se ha descripto que la epidemiología de los LH EBV+ presenta un patrón característico según la edad y las condiciones socio-económicas de la población. De acuerdo con esto se describe al EBV como asociado hasta en el 90% de los LH en países en vías de desarrollo mientras que sólo se asocia al 40% de los LH en los países desarrollados [Rickinson y col., 2007].

Entre los pacientes con linfomas se diagnosticaron en este período 29 (46,77%) LH y 33 (53,23%) LNH. Estos porcentajes de distribución resultaron similares a los descriptos para pacientes pediátricos en todo el territorio de la República Argentina (42,50% y 57,50%, respectivamente) [ROHA, 2011]. La asociación de los LH estudiados con el EBV resultó ser del 51,72% (15/29), muy similar al 54% previamente informado por este grupo de trabajo [Chabay y col., 2008]. A su vez, estos resultados son semejantes al 44,8% de asociación informado para LH pediátrico [Barros y col., 2011], y cercanos al 64% de asociación con LH de adultos [Loureiro y col., 2004], ambos correspondientes a la región sudeste de Brasil. Por otra parte, en la población del Noreste de Brasil se observó un mayor porcentaje de asociación

(87%) con EBV en LH pediátrico [Araujo y col., 2006]. En este aspecto la Argentina presentaría un patrón de asociación similar al de los países desarrollados. Por su parte, la asociación de los LNH con el EBV resultó del 36,36% (12/33) que a su vez fue concordante con datos previos de nuestro grupo de trabajo donde se describieron asociaciones entre el 30 y el 40% entre el virus y los LNH [Chabay y col., 2011; Chabay y col., 2002].

En lo referente a los subtipos virales, la distribución observada en esta serie, tanto en las MNI como en los linfomas, mostró que EBV1 es el tipo viral más frecuentemente detectado. La infección con EBV1 se describió en el 93,33% (14/15) de los casos de MNI y en el 70% (14/20) de los linfomas. Este predominio de EBV1 se asemeja a lo descripto en la bibliografía en general y en nuestra región geográfica en particular [Correa y col., 2004]. La alta prevalencia de EBV1 en los linfomas es coincidente con los datos previos publicados por nuestro grupo de trabajo, donde Chabay y col. describieron aislamientos de EBV1 en el 60% de linfomas pediátricos [Chabay y col., 2004; Chabay y col., 2008]. Por otro lado, cabe destacar que en el presente trabajo no se detectó ningún caso de coinfección con ambos tipos virales entre los pacientes con MNI; sin embargo, en un estudio de nuestro país realizado en pacientes adultos sanos seropositivos se había descripto que el 75,9% se encontraban infectados con EBV1, 17,6% con EBV2 y que sólo el 6,5% presentaba coinfección con ambos tipos virales [Correa y col., 2004]. Esta diferencia con lo observado por Correa y col. podría deberse fundamentalmente a que los pacientes pediátricos todavía no se han visto expuestos a sucesivas reinfecciones como sí lo estuvieron los adultos a lo largo de la adolescencia y/o la adultez temprana. Es válido suponer que los pacientes pediátricos con MNI incluidos en este estudio constituirán la población de portadores sanos adultos en el futuro. Sin embargo, no puede dejar de considerarse que el reducido número de pacientes pediátricos analizados, en comparación con el estudio realizado en pacientes adultos publicado por Correa y col., podría ser el factor responsable ante la falta de detección de coinfecciones con ambos tipos virales. Por su parte, otro trabajo realizado en China con pacientes pediátricos reveló un porcentaje de coinfección cercano al 12% en pacientes pediátricos con infección activa crónica por EBV, pero no observó coinfección en niños con MNI [Jin y col., 2010]. Un trabajo posterior, también en niños con MNI de China, tampoco detectó coinfecciones con ambos tipos virales [Ai y col., 2012]. Si bien se han descripto coinfecciones en las células tumorales en pacientes con linfomas EBV+ [Guidoboni y col., 2005; Martini y col., 2007], en nuestra serie no se detectó la coinfección con ambos tipos virales en los tumores EBV+.

Entre los polimorfismos descriptos para la región promotora del gen BZLF1, el más frecuente resultó ser la variante Zp-P, de la línea celular patrón B95.8, detectada en el 86,7% (13/15) de las muestras de MNI en ambos compartimentos y en el 45% (9/20) de las muestras de linfomas EBV+. Esta variante, considerada prototípica, fue originalmente caracterizada por Gutiérrez y col. en el 59% de los casos en una serie de pacientes adultos que combinaba muestras de LNH, PTLD y CNF de diferentes regiones geográficas como África, Asia y América [Gutiérrez y col., 2002]. En este estudio, los autores también detectaron esta variante viral, Zp-P, sólo en el 11% de las CMSP de portadores sanos, pero siempre en coinfección con otra variante, Zp-V4. Este descubrimiento culminó en el planteo inicial de los autores de que la variante Zp-P se encontraba estadísticamente asociada a patologías neoplásicas EBV+ [Gutiérrez y col., 2002]. Luego, esta hipótesis fue rechazada cuando esta misma variante fue detectada por otros autores tanto en muestras de CNF y PTLD asiáticos como también en el 52,8% de las CMSP de dadores sanos adultos de la misma región geográfica [Tong y col., 2003]. Posteriormente, Martini y col. encontraron la variante Zp-P en 49,2% de linfomas asociados a HIV, pero también en el 73% de las CMSP de pacientes adultos sanos [Martini y col., 2007] y Jin y col describieron esta variante en 84% de pacientes pediátricos con MNI y en 85% de controles sanos [Jin y col., 2010], en Italia y China, respectivamente. Todos estos últimos hallazgos concuerdan con nuestra observación de que la variante Zp-P no se encuentra asociada a tumores EBV+.

Por su parte, la variante Zp-V3 fue inicialmente descripta y caracterizada por Gutiérrez y col. como estrictamente asociada a linfomas y nunca fue detectada en CMSP de adultos sanos o con MNI [Gutiérrez y col., 2002]. Posteriormente, otros autores confirmaron esta asociación estadística, aunque la variante Zp-V3 también se identificó en CMSP de adultos sanos y adultos con MNI. Martini y col. detectaron a esta variante en aproximadamente el 50% de los linfomas asociados a HIV, pero sólo en el 27% de las CMSP de adultos sanos [Martini y col., 2007] en Italia. Luego, Tong y col. describieron a la variante Zp-V3 en 73% de los CNF y PTLD estudiados, pero a su vez la detectaron en el 50% de los casos de MNI o CMSP de adultos sanos [Tong y col., 2003]. Jin y col. describieron a la variante Zp-V3 como estadísticamente asociada a la infección activa crónica por EBV y a la linfocitosis hemofagocítica asociada a EBV [Jin y col., 2010]. En el presente estudio la variante Zp-V3 fue detectada en 2/15 casos de MNI, como la única variante infectiva en ambos compartimentos en uno de los casos y en coinfección con la variante Zp-P, sólo en las CMSP,

en el otro. Paralelamente, se la encontró en 9/20 muestras de linfomas y esto permitió establecer su asociación con los linfomas EBV+. Nuestros resultados en pacientes pediátricos, en línea con los últimos trabajos publicados [Jin y col., 2010; Martini y col., 2007; Tong y col., 2003], no mostraron una asociación estadísticamente significativa entre la variante Zp-P y su ocurrencia preferencial en linfomas EBV+, pero sí confirmaron esta asociación para la variante Zp-V3. Hasta la fecha no se han realizado estudios funcionales de la variante Zp-V3 que evalúen su capacidad de modificar la transcripción de ZEBRA, y por ende su capacidad de modificar las características oncogénicas del virus.

Sumada a las dos variantes ya descriptas, se caracterizó una nueva variante, la cual se denominó Zp-V3+49 por presentar una sustitución G→T en la posición -49 con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Si bien la mayoría de los elementos reguladores están contenidos en la región que abarca desde la posición -221 hasta el +12 (Figura 4), la nueva transversión descripta no está contenida en ningún sitio regulador. Esta variante se identificó en 2 linfomas y también en un caso de MNI, y dado que no fue previamente descripta por ningún otro grupo de trabajo, se trataría de una nueva variante de circulación en nuestra región que no se asocia a ninguna patología particular. De todas formas, sería necesario analizar un mayor número de pacientes para poder arribar a una conclusión fehaciente acerca de la relación de esta variante con las distintas patologías relacionadas al EBV.

Cabe destacar que no se detectó en ningún caso la variante Zp-V4, la cual había sido descripta por Gutiérrez y col. en adultos sanos y en MNI [Gutiérrez y col., 2002]. Tampoco se detectaron las variantes Zp-V1, ni Zp-V3+118 descriptas en otras regiones geográficas [Jin y col., 2010; Tong y col., 2003]. Estas observaciones contribuyen a fortalecer la noción de que si bien existen variantes de Zp preferentemente relacionadas a linfomas, también existen variantes restringidas a las diferentes regiones geográficas.

A diferencia de lo descripto por otros autores en pacientes adultos sanos y con MNI, donde se ha detectado coinfección con más de una variante de Zp [Gutiérrez y col., 2002; Martini y col., 2007], entre todos los casos de pacientes pediátricos aquí descriptos sólo se observó la coinfección con dos variantes de Zp en las CMSP del paciente MNI 9, pero no en las SF del mismo paciente. Esto resultó en concordancia con otro trabajo en el que no se encontraron coinfecciones con distintas variantes de Zp en pacientes pediátricos con MNI [Jin y col., 2010]. De manera similar a lo discutido previamente, se puede suponer que la variante viral detectada en los pacientes pediátricos con MNI refleja la única variante infectiva

original, mientras que en adultos es más común la detección de coinfecciones debido a la posibilidad de reinfección.

En cuanto a la asociación entre polimorfismos, en nuestra serie el tipo viral EBV2 siempre se halló en asociación con la variante Zp-V3; hallazgo que confirma los resultados de otros estudios anteriores, los cuales también detectaron en el contexto del genoma viral de EBV2 exclusivamente a la variante Zp-V3 [Gutiérrez y col., 2002; Jin y col., 2010; Martini y col., 2007; Tong y col., 2003]. Sin embargo, la sola detección de la variante Zp-V3 no permite inferir el tipo viral, dado que ésta también fue detectada en el genoma de EBV1, tanto en MNI (MNI 9) como en linfomas (T3, T15 y T18). Adicionalmente, se confirmó la asociación entre el EVB1 y la variante Zp-P también observada por los autores anteriormente mencionados.

A diferencia de todos los trabajos previamente mencionados, este estudio prospectivo fue diseñado con el objetivo de realizar un seguimiento de los pacientes con MNI durante la infección aguda y su convalecencia. Todos los pacientes que contaban con muestras de seguimiento D30 y D90 presentaron, en ambos compartimentos, la misma variante descripta para cada uno de ellos al inicio del estudio. Esto se observó incluso en aquellos casos en los que en el análisis de otras regiones del genoma viral, como EBNA1, se detectó coinfección e intercambio dinámico de subvariantes entre los compartimentos. La presencia de una única variante sugiere que las mutaciones en la región Zp, particularmente aquellas que ocurren en zonas reguladoras de interacción con factores celulares y virales, someterían al virus a una presión de selección negativa en la población infectada, lo que culminaría finalmente con la eliminación de las variantes menos adaptadas a nivel poblacional. Este hecho podría explicar por qué a nivel mundial, sólo se han descripto un reducido número de variantes de la región Zp mientras que la variación en las otras regiones génicas estudiadas es considerablemente superior.

Aún no se han realizado estudios *in vitro* acerca de los efectos de las mutaciones presentes en las variantes naturales sobre la actividad del promotor BZLF1, y por ende sus efectos potenciales en patologías asociadas a EBV. A pesar de ello, existe una hipótesis que sugiere que estas mutaciones puntuales en las zonas reguladoras del promotor serían las responsables de que ciertas variantes virales presenten una capacidad alterada para mantener el ciclo latente, y en consecuencia sólo se encontrarían asociadas a patologías benignas EBV+ y en los portadores sanos [Gutiérrez y col., 2002; Miller y col., 2002]. Particularmente la sustitución T→C en -196 (que se localiza en el sitio regulador ZIA), característica de la

variante Zp-V4 descripta por Gutiérrez y col., sería la única diferencia entre esta variante, estrictamente asociada a condiciones benignas y la variante Zp-V3, la cual se halla estadísticamente asociada a patologías tumorales. Entre las variantes caracterizadas en este trabajo, en el análisis *in silico* de las variantes Zp-V3 y Zp-V3+49 se observa la pérdida de un sitio de unión MEF-2D en -141 en ambas variantes, el cual es el activador más potente de la expresión de ZEBRA frente a señales de estimulación de su expresión [McDonald y col., 2010]. El análisis *in silico* muestra que la sustitución en -141 genera la unión de un factor NF1, que podría ser tanto un activador como un inhibidor. Además, la mutación en -106 podría modificar la unión de ZEBRA a su propio promotor y la regulación positiva de su expresión, dado que se ha demostrado actividad sinérgica de dos dímeros de ZEBRA para estimular su propia expresión [Carey y col., 1992]. Sumado a esto, la mutación de la variante Zp-V3+49 modifica la unión del factor Sp1/Sp3, siendo reemplazado por el factor NF-kB. Sin embargo, este análisis predictivo de interacción de factores de transcripción con el promotor de BZLF1 se basa en la especificidad de unión de estos factores *in vitro*. La capacidad de unión de estas proteínas al ADN podría variar *in vivo*, particularmente por la interacción con otros factores de transcripción y por la accesibilidad de los sitios de unión, dada por metilación del ADN y acetilación de histonas [Daigle y col., 2011]. Todas estas mutaciones presentes en cada una de las variantes indican la necesidad de un análisis funcional *in vitro*, que confirmaría si ocurren alteraciones en la expresión de la proteína ZEBRA. A su vez, estas alteraciones podrían confirmar el por qué de la asociación exclusiva de dichas variantes a linfomas EBV+.

En lo referente al análisis de la proteína EBNA1, desde que las mutaciones puntuales en la región C-ter fueron originalmente descriptas, numerosos grupos de investigación, en diferentes regiones del mundo, se han enfocado al estudio de su secuencia codificante. Esto llevó a que se postularan numerosas teorías en cuanto a la asociación de determinados polimorfismos con ciertas regiones geográficas, con su distribución preferencial en los distintos compartimentos del hospedador y/o con la presencia en patologías tumorales.

En un principio se describió la asociación de ciertas variantes de EBNA1, como V-leu, asociadas a patologías tumorales como LB, CNF y linfomas T/NK nasales dado que esta variante fue detectada en las muestras tumorales, pero no en CMSP de adultos sanos de esa misma región [Bhatia y col., 1999; Bhatia y col., 1996; Gutiérrez y col., 1997; Gutiérrez y col., 1998].

Paralelamente, se introdujo la teoría de la asociación entre las variantes de EBNA1 y la región geográfica del aislamiento viral. Bajo esta hipótesis, se describió a la variante V-leu como restringida a América y África, pero presente tanto en muestras tumorales como en pacientes sanos [Chen y col., 1998; Habeshaw y col., 1999; MacKenzie y col., 1999]. Sumado a esto, en otro estudio no se detectó la variante V-leu en ningún tipo de muestra en pacientes de Dinamarca y China [Sandvej y col., 2000]. A su vez, la variante V-val fue descripta en muestras tanto de CNF, LH y MNI como de CMSP y SF de adultos sanos exclusivamente en Asia, donde es la variante de mayor circulación [Ai y col., 2012; Chen y col., 1998; Do y col., 2008; Sandvej y col., 2000; Wang y col., 2003; Wang y col., 2002; Wang y col., 2010; Zhang y col., 2004]. Con respecto a las variantes P-ala, P-thr, generalmente detectadas en Europa, estos mismos autores han aportado datos contradictorios [Do y col., 2008; Mai y col., 2007; Wang y col., 2003; Zhang y col., 2004]. Es por esta discordancia entre los hallazgos de los numerosos estudios que hasta la actualidad no se cuenta con evidencia concluyente acerca de la asociación de las variantes de EBNA1 con patologías tumorales y/o las diferentes regiones geográficas.

Dados estos antecedentes conflictivos mencionados anteriormente, sumado a la escasez de estudios pediátricos a nivel mundial y en particular de Sudamérica, se analizaron las variantes de EBNA1 en niños de esta región geográfica. En las muestras de nuestra serie se detectaron la variante V-leu y las subvariantes de ésta en el 46,7% de las muestras de MNI y en el 50% de los tumores, lo cual indica que la variante V-leu es la de mayor circulación en nuestra región geográfica; sin embargo, no se encontró una asociación preferencial de esta variante con las patologías tumorales. Estos datos son concordantes con datos previos que describen a V-leu como la variante de mayor circulación en los Estados Unidos y Brasil, pero que no estaría asociada al desarrollo de neoplasias [Chang y col., 1999; Chen y col., 1998; MacKenzie y col., 1999]. En lo concerniente a la dinámica de distribución de las variantes entre los compartimentos del hospedador, este estudio no demostró la existencia de una distribución preferencial.

Entre los aislamientos incluidos en este estudio, la variante V-leu original así como sus subvariantes coinciden con secuencias previamente descriptas o bien difieren en pocos cambios nucleotídicos (Tabla 8) [Bhatia y col., 1996; Chang y col., 1999; Chen y col., 1998; MacKenzie y col., 1999; Triantos y col., 1998]. Entre las subvariantes descriptas y definidas por primera vez en este trabajo, V-leu-Ag-i (T9) y V-leu-Ag-ii (T10), presentaron cada una,

una sola sustitución respecto de la subvariante V-leu-Ag, mientras que V-leu-vii (T5) se diferenció de V-leu en 4 sustituciones. Sólo la subvariante V-leu-viii, caracterizada en el paciente T17, difiere en forma significativa de la variante V-leu en nueve posiciones. Este caso particular es muy interesante porque presenta ciertas posiciones características que corresponden a la variante V-leu y otras descriptas en las subvariante V-ala-i. Cabe destacar que si bien el codón 487 se encuentra conservado, lo cual amerita su clasificación como V-leu, posee además sustituciones en los codones 486, 528 y 533 que son propios de la subvariante V-ala-i (Tabla 8). Este complejo patrón de mutaciones podría explicar, al menos en parte, el hecho de que si bien V-leu-viii, presente en el T17, es una subvariante de V-leu, esta se agrupó conjuntamente con las subvariantes de V-ala en el análisis filogenético (Figura 10).

Las subvariantes de P-thr se detectaron en el 46,7% de las MNI, pero sólo en el 20% de los linfomas. Esto es compatible con lo descripto para todas las regiones geográficas a nivel mundial, donde éstas suelen ser de elevada circulación entre la población adulta sana, pero rara vez detectadas en linfomas [Bhatia y col., 1996; Chang y col., 1999; Chen y col., 1998; Fassone y col., 2000; Gutiérrez y col., 1997; MacKenzie y col., 1999]. Sin embargo, no se halló una correlación estadística entre esta variante y la MNI.

Curiosamente, sólo se detectó a la variante P-ala en coinfección con otra variante en dos casos de MNI, mientras que en linfomas fue detectada en 1/20 casos, pero como variante única. Este hallazgo coincide en parte con lo descripto en la región europea donde esta variante se detecta preferentemente en pacientes sanos y en menor medida en patologías tumorales, pero a diferencia de nuestra región, en Europa representa una de las variantes de mayor circulación junto con P-thr [Gutiérrez y col., 1997; Habeshaw y col., 1999; Sandvej y col., 2000].

En forma adicional, para determinar la relación que existe entre los aislamientos desde el punto de vista epidemiológico, los estudios de reconstrucción filogenética permitieron identificar y definir 6 nuevas subvariantes de V-ala en 13,3% de las MNI y en el 25% de los linfomas. Esto resulta muy interesante dado que la variante V-ala y sus subvariantes, sólo fueron descriptas en pacientes de Brasil [Chang y col., 1999; MacKenzie y col., 1999]. Este hecho parece restringir aún más la circulación de esta variante a América del Sur a diferencia de la variante V-leu que es la de mayor circulación en toda América y África.

No se detectó, en ninguna de las muestras incluidas en este estudio, la presencia de la variante V-val lo cual no resultó llamativo dado que esta variante fue detectada, por otros autores, en forma exclusiva en muestras de Asia donde es la variante de mayor circulación, tanto en muestras tumorales, en MNI y también en las CMSP y SF de los portadores sanos [Ai y col., 2012; Chen y col., 1998; Do y col., 2008; Sandvej y col., 2000; Wang y col., 2003; Wang y col., 2002; Wang y col., 2010; Zhang y col., 2004].

En ningún caso se pudo establecer una asociación estadística entre una variante particular del gen que codifica EBNA1 y los linfomas EBV+. Todos los datos de análisis de secuencias presentados en este trabajo de tesis sustentan la teoría que propone la circulación preferencial de las variantes de EBNA1 en las distintas regiones geográficas y que éstas no se relacionan con el desarrollo de neoplasias asociadas a EBV.

Por su parte, y al igual que lo descripto anteriormente para el gen BZLF1, las variantes de EBNA1 en pacientes con MNI fueron caracterizadas en dos compartimentos a lo largo de los tres meses de seguimiento. Este estudio de compartimentación contribuye a ampliar el conocimiento previo sobre la distribución de variantes de EBNA1 en el hospedador, dado que hasta la fecha no se había abordado este análisis en pacientes con MNI. En la mayor parte de los casos (12/15) se detectó la misma variante viral en ambos compartimentos y dicha variante se mantuvo, en cada caso en particular, a lo largo de los tres meses de seguimiento. Por el contrario, en 3/15 casos se detectó la coinfección con dos variantes diferentes. El paciente MNI 1 presentó en su muestra de seguimiento D90, exclusivamente en las CMSP, coinfección con la variante prototípica P-ala y la subvariante P-thr´´. Este hecho puede ser interpretado como una coinfección desde D0 que sólo se evidenció recién a D90. No obstante, la posibilidad de que se trate de una reinfección por una variante diferente durante el período de convalecencia no puede descartarse, si bien esto es menos probable dado que la respuesta inmunitaria específica se ha instaurado recientemente. Por el contrario, en pacientes adultos con infección pasada se describen coinfecciones con diferentes subvariantes de EBNA1 hasta en el 62% de los casos y se postula que son el reflejo de sucesivas reinfecciones [Bhatia y col., 1996; Do y col., 2008; Gutiérrez y col., 1997; Sandvej y col., 2000; Wang y col., 2003; Wang y col., 2010; Zhang y col., 2004]. Los otros dos pacientes (MNI 6 y MNI 9) presentaron coinfecciones detectables desde el momento del diagnóstico (D0). Al igual que lo observado en el estudio de variantes de Zp, en el paciente MNI 9 se detectó la coinfección con dos subvariantes de EBNA1 en las CMSP, pero no en la muestra de SF concomitante. En el

paciente MNI 6 mediante el clonado de los aislamientos se observó una distribución dinámica de las subvariantes entre los dos compartimentos analizados a lo largo del estudio, donde las subvariantes P-thr´ y V-leu-Ag fueron detectadas en coinfección en las SF al inicio del estudio, pero hacia el final de su seguimiento P-thr´ se seleccionó como la única subvariante detectable en ambos compartimentos. En general cuando se observó coinfección de variantes de EBNA1, siempre en las SF se evidenció una tendencia hacia la selección de una única variante; sin embargo, en los CMSP la presencia de coinfecciones fue más frecuente. Esta observación concuerda con lo descripto en trabajos previos en adultos en los cuales también se describió esta tendencia hacia la selección de una única o de un reducido número de subvariantes en SF durante la convalecencia de la MNI [Fafi-Kremer y col., 2005; Sitki-Green y col., 2004]. Estos resultados sugieren que el virus en estado replicativo en la faringe es eficientemente controlado por la respuesta inmunitaria exacerbada del hospedador, manifestación clínica del síndrome mononucleósico, y sólo aquellas variantes más adaptadas a la replicación lítica prevalecen en dicho compartimento mientras que el virus en estado latente, el cual sólo expresa un reducido número de antígenos (o ninguno), es capaz de evadir dicho control, lo cual representa una ventaja para la infección persistente.

Es de destacar que hasta la realización de este trabajo de tesis, ningún estudio había detectado subvariantes de V-leu en muestras de SF de adultos sanos [Bhatia y col., 1996; Chang y col., 1999; Chen y col., 1998; Habeshaw y col., 1999; MacKenzie y col., 1999]; sin embargo, en nuestra serie de MNI se detectó esta variante en 7 muestras de SF, una de ellas en coinfección con otra variante. El hecho de que la variante V-leu no fuera detectada previamente en SF de adultos de América, pero sí en la SF de los niños aquí estudiados, sugeriría que cuando V-leu está presente junto a otras variantes, como suele ocurrir en SF de adultos o como se evidenció en ambos compartimentos del paciente MNI 6, presentaría una desventaja adaptativa ante la competencia con otra variante que la desplazaría. A diferencia de lo observado en MNI entre las muestras de linfomas no se detectó coinfección con variantes de EBNA1.

Con respecto a la asociación de variantes de EBNA1 con el tipo viral, se ha publicado información controvertida. Mientras que algunos estudios no encuentran una asociación significativa [Bhatia y col., 1996; Chang y col., 1999; MacKenzie y col., 1999], otros proponen la asociación entre la subvariante P-thr-v y EBV2, en China [Wang y col., 2010]; entre P-ala y EBV2 en Europa, y V-leu también con EBV2 en África [Habeshaw y col.,

1999]. Recientemente, Ai y col. describieron una asociación entre EBV1 y una subvariante de V-val, V-val-v1, pero esto podría deberse simplemente a que estos representan el tipo viral y variante de EBNA1 de mayor circulación [Ai y col., 2012]. En este estudio, no encontramos una asociación significativa entre los tipos virales y una variante de EBNA1 en particular, tal vez debido a la gran cantidad de variantes de EBNA1 que circulan en nuestra región; no obstante se observó una tendencia hacia la asociación de las variantes P-thr y V-ala en el genoma EBV1. Por su parte, las variantes V-leu se encontraron en ambos tipos virales en forma equitativa.

De forma similar a lo previamente discutido para la región promotora de BZLF1, no se conoce en profundidad el posible efecto de estas mutaciones puntuales sobre la actividad de la proteína EBNA1. Escasos estudios previos *in vitro* describieron una actividad transcripcional aumentada de la variante de mayor circulación en Asia, V-val, con respecto a la variante prototípica, P-ala; hecho que permitió a los autores suponer una incrementada participación en el proceso oncogénico y explicar el elevado número de casos de CNF con esta variante [Do y col., 2008; Mai y col., 2007]. Sin embargo, no se han realizado estudios de funcionalidad del resto de las variantes, inclusive las de circulación en nuestra región geográfica. Sólo un trabajo realizado en pacientes adultos con PTLD de América del Norte, se focalizó en el estudio de variantes de EBNA1 y su relación con la sobrevida de los pacientes, pero finalmente no describió una asociación estadísticamente significativa entre ambas variables [Greiner y col., 2000]. Se han descripto múltiples funciones para EBNA1, *p. ej*. posibilitar la replicación del genoma viral [Young y col., 2004], inhibir la apoptosis [Lu y col., 2011; Rowe y col., 2009] y regular la expresión de genes virales [Young y col., 2004]. Si bien en este trabajo no se realizaron ensayos de funcionalidad de las variantes de EBNA1 descriptas, es válido suponer que la capacidad de permitir la división del episoma viral durante la replicación celular no se ve afectada. Esto se sustenta en que los sitios esenciales de unión al ADN no presentaron sustituciones respecto del *wt* y además el genoma viral se detectó en los pacientes con MNI hasta el tercer mes post-infección, tanto en su forma latente (CMSPs) como en su forma replicativa (SF).

El gen BNLF1, que codifica para la proteína LMP1, es considerado el primer oncogén de EBV. *In vivo*, en los linfocitos B, la proteína LMP1 mimetiza la señalización del receptor celular CD40 activado que pertenece a la familia de receptores de TNF y es indispensable

para la transformación del linfocito [Uchida y col., 1999]. Mientras que el receptor CD40 interactúa con su ligando específico, expresado en células T activadas, para inducir la activación y diferenciación de los linfocitos B, la proteína LMP1 lo hace de manera independiente de ligando [Vaysberg y col., 2008]. LMP1 posee la capacidad de interactuar con los mismos factores celulares que el receptor CD40, denominados TRAFs y TRADD, y así activar vías de señalización celular como NF-κB, p38MAPK/ATF2, JNK/AP1y PI3K/Akt. La activación de estas vías de señalización culminan en la expresión de los genes *c-myc*, *TRAF1*, *Bcl2* y *BclXL*, entre otros, los cuales están involucrados en la transformación, sobrevida y proliferación celular [Faumont y col., 2009; Vaysberg y col., 2008]. Este hecho sugiere un papel central de LMP1 en el proceso neoplásico. Gran parte de la actividad oncogénica de LMP1 esta restricta a su región C-ter (aa 187-386), especialmente a dos regiones denominadas CTAR1 y CTAR2. Particularmente, los residuos aminoacídicos 204-208 (Pro-Glu-Glu-Ala-Thr) en el CTAR1 resultan indispensables para la unión de los factores TRAF1, 2, 3 y 5, mientras que los residuos 384 y 385 (Tyr-Tyr) en el CTAR2 resultan esenciales para la interacción con TRADD y el reclutamiento de TRAF2 [Vaysberg y col., 2008]. En forma adicional a las regiones CTAR1 y 2 se describió una región CTAR3 que posee motivos de unión a JAK-3, lo cual resulta en la activación de las vías de señalización reguladas por STAT1 y STAT3 [Guiretti y col., 2007; Vaysberg y col., 2008].

Posiblemente el gen BNLF1 sea el gen de EBV con mayor variación y las más frecuentes son las localizadas en el extremo C-ter, a saber la deleción de 30 pb, la inserción de 15 pb que codifica un motivo JAK-3, un número variable de repeticiones en tándem de 33 pb y sustituciones puntuales [Young y col., 2004]. La presencia de estas variaciones con potencial de alterar la señalización intracelular mediada por LMP1 serían el motivo por el cual este antígeno ha sido la proteína de EBV más estudiada en una amplia diversidad de patologías y regiones geográficas [Chang y col., 2009]. Sin embargo, escasos trabajos se han enfocado en patologías pediátricas [Berger y col., 1997b; Chabay y col., 2004; Guiretti y col., 2007] y sólo dos trabajos describieron estas mutaciones en casos de MNI pediátrica [Ai y col., 2012; Berger y col., 1997b].

Para la caracterización de las variantes de este gen se han utilizado principalmente dos esquemas de clasificación, lo cual vuelve dificultosa la comparación entre estudios. En este trabajo de tesis se eligió el sistema de clasificación introducido por Edwards y col. dado que este utiliza la región nucleotídica completa que codifica para el fragmento C-ter de este

antígeno [Edwards y col., 1999]. Por el contrario, el otro sistema de clasificación [Sandvej y col., 1997] utiliza dos porciones nucleotídicas más pequeñas en el fragmento que codifica para el C-ter y complementa esta información con datos correspondientes a la región promotora del gen y con la presencia de la secuencia de restricción de la enzima *Xho*I en el extremo N-ter, por lo que no resultó adecuado para el fragmento analizado.

La reconstrucción filogenética de las variantes de LMP1 demostró que las variantes China 1, China 3, B95.8 y ambas variantes Mediterráneas se encuentran relacionadas, mientras que las variantes China 2, NC y Alaskan conformaron grupos independientes entre sí, y a su vez independientes de las primeras. Este resultado concuerda con los resultados originalmente descriptos por Edwards y col [Edwards y col., 1999] y más recientemente por Saechan y col [Saechan y col., 2006; Saechan y col., 2010].

La variante con mayor frecuencia de detección en este estudio, tanto entre los pacientes con MNI como con linfomas, fue la variante China 1, lo cual nos permite concluir que esta variante no se encuentra asociada a ninguna patología en particular sino que es de elevada circulación en nuestra región geográfica. De forma similar, esta variante fue descripta como la de mayor circulación en Asia, tanto en tumores asociados a EBV y MNI, como entre la población sana [Ai y col., 2012]. A su vez se la ha descripto como variante de alta circulación en América del Norte, pero no en Europa donde predomina la variante B95.8 [Chang y col., 2009; Edwards y col., 1999; Saechan y col., 2010; Tiwawech y col., 2008]. Este trabajo de tesis es el primero que describe la circulación de la variante China 1 en nuestra región geográfica, dado que los estudios realizados anteriormente por nuestro grupo de trabajo y por otros, se centraron en el estudio de la región repetitiva y/o a la presencia de la deleción de 30 pb [Correa y col., 2004; Correa y col., 2007; Chabay y col., 2004; Guiretti y col., 2007]. De forma similar, la variante Med- fue detectada en ambas patologías asociadas a EBV, pero en menor proporción que la variante China 1. En otras regiones geográficas, esta variante se identificó también tanto en patologías tumorales como entre los portadores sanos adultos, principalmente en Europa, pero también en América del Norte y en un caso de LB de África [Edwards y col., 1999]. La variante China 2, que sólo había sido descripta en Asia [Chang y col., 2009; Saechan y col., 2010], fue detectada por primera vez en este trabajo en pacientes con MNI pero no en linfomas en nuestra región, aunque cabe recalcar nuevamente que hasta el presente estudio ningún otro trabajo había definido las variantes de LMP1 a lo largo de la región C-ter en Sudamérica. Finalmente, la variante Alaskan, considerada como una de las

variantes de alto riesgo, sólo se aisló de biopsias de pacientes con linfomas, lo cual es consistente con los resultados propuestos por Edwards y col. quienes sólo detectaron esta variante en neoplasias [Edwards y col., 1999]. Sin embargo, la variante Alaskan no resultó estadísticamente asociada con linfomas EBV+, probablemente debido al bajo número de casos estudiados. Además, otro grupo de investigación demostró que esta variante posee una capacidad aumentada para estimular la señalización mediada por el factor NF-κB [Mainou y col., 2006], lo cual sustenta el hecho de su potencial oncogénico aumentado que lo relacionaría con el hallazgo exclusivo en linfomas. En cuanto a la distribución geográfica de esta variante, este es el primer trabajo que detecta variantes Alaskan en una región fuera de América del Norte y más aún en una patología diferente al CNF [Chang y col., 2009; Edwards y col., 1999; Saechan y col., 2010].

En cuanto a la presencia de la deleción de 30 pb (del30), esta se identificó en una alta proporción de los casos tanto en MNI (53%) como en linfomas (65%) y no resultó estadísticamente asociada a estos últimos. Este hallazgo no fue inesperado, dado que se ha descripto un elevada prevalencia de del30 en MNI [Ai y col., 2012; Berger y col., 1997b]. En un primer estudio con pacientes pediátricos de Argentina, Chabay y col. describieron que el 75% de los linfomas estudiados contenían la del30 mientras que sólo fue detectada en el 36% de las muestras de hiperplasias reactivas y portadores sanos [Chabay y col., 2004]. En un estudio posterior donde se estudiaron LH y controles no neoplásicos de Argentina y Brasil, también se encontró la del30 estadísticamente asociada a las muestras tumorales: 74% y 57% de los LH de Argentina y Brasil, respectivamente, frente a 27% y 36% de los controles no neoplásicos estudiados [Guiretti y col., 2007]. Otro estudio de Argentina analizó la presencia de del30 en CMSP de adultos sanos y describió que sólo el 7,4% contenían la deleción [Correa y col., 2004]. Otros autores también han descripto esta asociación significativa entre del30 y neoplasias en aislamientos de Brasil [Chen y col., 1996; Hayashi y col., 1997]. Si bien en estos trabajos se comparó la presencia de del30 en linfomas y muestras de portadores sanos, y en este trabajo de tesis se enrolaron pacientes con linfomas y MNI, dado que esta última es una manifestación benigna, no neoplásica, producto de la primoinfección con EBV hubiese sido de esperar un resultado similar al de los portadores sanos.

Paralelamente en otras regiones geográficas, se describieron porcentajes de asociación variables entre del30 y las diferentes condiciones EBV+. En América del Norte se describe a las variantes del30 en el 48% de patologías tumorales, pero también en similar proporción en

adultos sanos; mientras que en México la asociación de del30 con el LH resultó significativa [Dirnhofer y col., 1999]. A su vez, en Europa se observó una asociación de hasta el 55% entre del30 y los linfomas asociados a HIV, pero sólo en alrededor del 30% tanto en LH como en la población adulta sana [Chang y col., 2009]. Por su parte, en China se observó la presencia de la deleción en el 85% de las patologías tumorales y en el 75% a 86% de la población sana [Chang y col., 2009; Zhou y col., 2001], mientras que en Túnez se detectó la del30 en aislamientos de CNF, CG y también en portadores sanos [BenAyed-Guerfali y col., 2011]. Finalmente, un estudio realizado sobre aislamientos de CNF de Rusia concluyó que la del30 no se encontraba asociada al desarrollo de esta patología en dicha región [Hahn y col., 2001].

De los estudios mencionados anteriormente surge que en Latinoamérica existe una asociación significativa de la variante del30 con los procesos neoplásicos, en este trabajo de tesis se demostró que la misma está asociada también a una patología benigna EBV+. Debido a la variabilidad entre la asociación de la variante delecionada y las patologías neoplásicas en las diferentes regiones geográficas, no está claramente dilucidado si la frecuencia de del30 en tumores EBV+ refleja la circulación de esta variante en cada región geográfica o se debe a una interacción específica entre el virus y el hospedador que culminaría en el desarrollo de un proceso neoplásico. A partir de la identificación de la variante China 1, que incluye la deleción de 30 pb como la variante de mayor circulación en nuestra región geográfica tanto en linfomas como en MNI se pueden plantear dos teorías: 1) que la elevada proporción de casos con la del30 simplemente estaría reflejando la variante de mayor circulación en nuestra región o 2) que las variantes del30 estarían asociadas al desarrollo de patologías relacionadas al EBV, tanto benignas como malignas.

Se ha demostrado en Argentina que la primoinfección por EBV ocurre a muy temprana edad [Chabay y col., 1999] conjuntamente con una elevada incidencia de linfomas de Hodgkin pediátricos EBV+ en niños menores de diez años [Chabay y col., 2004]. Más aún, se ha descripto que aquellos individuos con un historial de MNI tienen un riesgo tres veces mayor de desarrollar un LH EBV+ dentro de los tres años de haber experimentado la enfermedad y este riesgo permanece duplicado de por vida [Hjalgrim y col., 2008; Hjalgrim y col., 2007b]. Estas observaciones sugerirían la necesidad del seguimiento de los pacientes con MNI y la variantes del30 a fin de determinar si presentan una mayor susceptibilidad al desarrollo de LH.

El estudio del número de unidades repetitivas de 33 pb demostró que se encuentran en número variable tanto en MNI como en los linfomas pediátricos asociados a EBV. El número de rep33 detectado en ambas patologías varió en el rango de 3 ½ y 6 ½ repeticiones y fue concordante con lo descripto previamente por nuestro grupo de trabajo, donde no se detectaron diferencias significativas entre el número de rep33 y las patologías estudiadas. Sin embargo, en ambos grupos de pacientes se observó una gran proporción de casos con un elevado número de rep33, lo que derivó en la asociación significativa entre del30 y el alto número de rep33. A su vez, se describió la presencia de la inserción de 15 pb estadísticamente asociada a la presencia de la del30. Ambas asociaciones fueron descriptas anteriormente en un trabajo colaborativo en muestras de linfomas de Argentina y Brasil donde se propuso que la zona repetitiva representa un marco de inestabilidad genómica que favorecería la generación de deleciones e inserciones durante la replicación del virus [Guiretti y col., 2007]. Más aún, se propuso que la generación de variantes delecionadas podría verse favorecida por ciertos procesos celulares como la hipermutación somática o el cambio de clase de las inmunoglobulinas durante la diferenciación de los linfocitos B en el centro germinal de los ganglios linfáticos [Berger y col., 1997a; Guidoboni y col., 2005]. Finalmente, cabe mencionar que la detección de ins15 en la tercera o cuarta unidad de rep33 fortalece la noción de que la variabilidad del C-ter de LMP1 es mayor que lo previamente descripto.

En cuanto a la distribución de las variantes de LMP1 en los distintos compartimentos de los pacientes con MNI y su dinámica a lo largo de la convalecencia, diversos estudios realizados en adultos sanos y con MNI han demostrado que se encontraban infectados con múltiples variantes y que éstas se distribuían en forma dinámica entre la faringe y CMSP [Mainou y col., 2006; Sitki-Green y col., 2003; Sitki-Green y col., 2004]. Sin embargo, en este estudio en pacientes pediátricos cada uno de los niños presentó individualmente la misma variante en ambos compartimentos en la muestra D0 y esta variante se mantuvo como la única variante detectada a lo largo del seguimiento. Esto resultó particularmente llamativo en los casos de los pacientes MNI 1, MNI 6 y MNI 9, en quienes se había demostrado la presencia de dos variantes en ciertas muestras, en algunos tiempos, para las otras regiones estudiadas. Sin embargo, un estudio previo en pacientes adultos con linfomas NK/T nasales EBV+, también describió una única variante de LMP1 en presencia de coinfecciones con múltiples variantes de EBNA1 en la misma muestra [Gutiérrez y col., 1998]. Este hallazgo llevó a los autores a proponer que la detección de múltiples variantes de EBNA1 en presencia de una

única variante de LMP1 podría deberse a que las variantes de EBNA1 fueran generadas *in vivo* y no como consecuencia de una coinfección. Sin embargo, aunque menos probable debido a la elevada variabilidad del gen que codifica para LMP1, no puede descartarse la coinfección con dos virus con distintas variantes de EBNA1 pero con una misma variante de LMP1. Tampoco puede descartarse la presencia de una variante muy minoritaria que no se amplificó por encontrase por debajo del límite de sensibilidad de la técnica. Al igual que para las otras regiones génicas estudiadas, tampoco se detectó ningún caso de coinfección con diferentes variantes de LMP1 en los aislamientos de linfomas. Estas observaciones coinciden con lo publicado por otros autores, quienes describen que los linfomas, particularmente el LH, exhiben un patrón monoclonal de infección viral, el cual persiste a lo largo del curso de la enfermedad [Faumont y col., 2009].

Dada la importancia de la región C-ter de LMP1 en la regulación de los procesos de sobrevida celular, se han realizado numerosos estudios *in vitro* sobre la funcionalidad de las distintas variantes naturales de LMP1 aisladas a partir de muestras tumorales [Faumont y col., 2009; Fielding y col., 2001; Larcher y col., 2003; Mainou y col., 2006; Rothenberger y col., 1997; Vaysberg y col., 2008]. Estos estudios han intentado relacionar las mutaciones detectadas en la región C-ter, principalmente del30, con una mayor capacidad transformante y por ende con una histología más agresiva del tumor. Todos estos trabajos describieron una mayor capacidad transformante de las variantes tumorales con respecto a la variante *wt*, B95.8. Uno de estos estudios, adicionalmente, describió que las sustituciones Gly→Ser en el codón 212 y la sustitución Ser→Thr en el codón 366, también serían responsables de la aumentada capacidad transformante de las variantes aisladas de tumores [Vaysberg y col., 2008]. Paralelamente, otro trabajo demostró que la variante Alaskan poseía una capacidad aumentada para activar la vía NF-κB [Mainou y col., 2006]. Sin embargo, estos trabajos fueron realizados principalmente con variantes naturales aisladas de tumores de la región de Asia y dado que: i) la del30 fue detectada en elevada frecuencia tanto en pacientes con MNI como con linfomas de nuestra región; ii) las sustituciones en 212 y 366 fueron detectadas en todas las muestras analizadas, incluso en aquellas con variantes clasificadas como B95.8 y iii) que la variante Alaskan fue detectada solamente en muestras de linfomas, resultaría de suma importancia realizar estudios funcionales *in vitro* de las variantes circulantes en nuestra región geográfica.

Al realizar el análisis integrado de las variantes de los diferentes genes antes evaluados, el arreglo genómico más frecuente (Nº5) se encontró distribuido en forma equitativa entre ambas patologías. Por su parte, no se encontró una asociación significativa entre todos los polimorfismos estudiados, si bien se observó la asociación parcial entre el EBV2 con del30, un elevado número de rep33 con la variante Zp-V3 y entre EBV1 con la variante Zp-P. Este resultado confirmaría un estudio previo en el cual no se encontró una asociación absoluta entre los polimorfismos de los genes que codifican para LMP1, EBNA1 y EBNA2 en pacientes Europeos [Gutiérrez y col., 2000]. Por otro lado Ai y col. describieron recientemente una asociación significativa entre el EBV1, la subvariante V-val-v1 (de EBNA1) y China1 (de LMP1) en pacientes pediátricos de Asia [Ai y col., 2012]. Sin embargo, esta asociación podría deberse a que cada variante en particular es la de mayor circulación en esa región (cada una con una incidencia cercana al 100% en esa serie) independientemente de la patología estudiada.

Adicionalmente, en este estudio prospectivo se evaluaron los valores de carga viral en el plasma de los pacientes con MNI durante la infección primaria y durante todo el período de convalecencia, con el objetivo de dilucidar si la presencia de alguna variante en particular presentaba una mayor tasa de replicación y por ende se asociaba a una carga viral aumentada. Si bien la carga viral para EBV no representaba un requisito diagnóstico ni de seguimiento en los pacientes con infección primaria, muy recientemente se ha comenzado a demostrar su valor como herramienta diagnóstica ([Berth y col., 2011; Vouloumanou y col., 2012]). La mayoría de los trabajos que se focalizan en el estudio de la carga viral de EBV incluyen pacientes en seguimiento postransplante, ya que en estos pacientes esta determinación se utiliza como herramienta para decidir una conducta clínica vinculada al potencial desarrollo de un PTLD [Gartner y col., 2010; Gulley y col., 2010]. En cambio, existen menos datos de carga viral en pacientes con infección primaria, y la mayoría de ellos refieren a adultos. En estos trabajos, los valores de carga viral son muy variables, desde indetectables hasta 115000 copias/ml de plasma [Bauer y col., 2005; Berth y col., 2011; Ryan y col., 2004]. Por su parte, un estudio realizado sobre muestras de plasma de niños con MNI reveló valores de carga viral que oscilaron entre 0 y 957 copias/ml de plasma [Cheng y col., 2007] durante la etapa inicial de la primoinfección. En línea con este último estudio, los valores de carga viral detectados en este trabajo de tesis variaron entre 0 y 4.948 copias de genoma/ml plasma, lo que reafirmaría la diferencia descripta entre pacientes adultos y pediátricos. Una posible explicación para esta

observación sería que el inóculo viral, es decir la cantidad de partículas virales infecciosas trasmitidas por la saliva, al que puede estar expuesto un niño sería mucho menor que el inóculo al que estaría expuesto un adolescente o adulto joven sexualmente activo [Crawford y col., 2006]. Sin embargo, resta todavía dilucidar cuales serían las características vinculadas a la edad del hospedador que podrían condicionar los eventos iniciales de la infección primaria.

En este trabajo de tesis, solamente 8/15 niños revelaron valores detectables de carga viral durante la etapa aguda, pero en todos los casos muy inferiores a los detectados en patologías asociadas a EBV en pacientes inmunosuprimidos y/o postransplante. Durante la convalecencia los valores de carga viral resultaron siempre negativos. Este hallazgo podría sugerir un eficiente control de la primoinfección por parte del sistema inmunitario del niño inmunocompetente. Además, confirma datos recientes que describen valores de carga viral indetectables en el plasma de los pacientes luego de los 15 días postaparición de los síntomas [Bauer y col., 2005; Berth y col., 2011]. Por su parte, Dune y col. describieron en adultos con MNI que la concurrencia del paciente a la consulta médica frente a la aparición de los primeros signos clínicos es posterior al pico de viremia. En ese momento los parámetros bioquímicos como la linfocitosis típica a expensas del aumento de los Linfocitos T CD8+, la detección de IgM anti-VCA indican que la infección está comenzando a ser eficientemente controlada por el sistema inmunitario [Dunne y col., 2002]. Estos hechos llevaron a otros autores a postular que la sintomatología característica de la MNI es una manifestación de la respuesta inmunitaria del paciente, propia del momento en que el sistema inmunitario ha comenzado a controlar la infección y que provoca en consecuencia el descenso de la carga viral en plasma a valores bajos o indetectables [Hadinoto y col., 2008; Luzuriaga y col., 2010]. En este grupo estudiado no se observó la correlación inversa descripta por otros autores, entre el número de días postinfección y el descenso de la carga viral. De los resultados observados en este trabajo de tesis surge que en tanto los pacientes MNI 3 y MNI 6 concurrieron a la consulta médica dentro de los 7 días de iniciada la sintomatología y presentaron los valores de carga viral más elevados de la serie, los pacientes MNI 2, 7, 8 y 14 también concurrieron dentro del mismo período, pero presentaron valores de carga viral negativos o cercanos al límite de detección de la técnica. Por el contrario, el paciente MNI 5, quien se presentó con 13 días de evolución tuvo un valor de carga viral de 3455 copias de genoma/ml de plasma, uno de los valores más elevados de la serie. Estas observaciones podrían explicarse por las diferencias en determinadas características genéticas inmunológicas

del paciente. Precisamente, en el transcurso de la infección primaria por EBV, se describió una susceptibilidad a desarrollar el síndrome mononucleósico, potencialmente asociada a polimorfismos en el *locus* que codifica para el complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1 en pacientes adultos (HLA-1 por sus siglas en ingles) [Farrell, 2007; Hjalgrim y col., 2010; McAulay y col., 2007]. Resultaría válido suponer que los cambios en estos genes podrían afectar la respuesta inmunitaria frente a la infección por EBV, produciendo estas pequeñas variaciones en los valores de carga viral. En línea con esta teoría, Nakai y col. describieron en una proporción de pacientes pediátricos con MNI, que los niveles aumentados de ciertas citoquinas séricas, como IL-12, IL-1β e TNF-α, se asociaban a una rápida disminución de la carga viral; mientras que en un segundo grupo de niños con valores significativamente menores de estas citoquinas mostraba un patrón de resolución más lento [Nakai y col., 2011]. Estas dos observaciones estarían estrechamente relacionadas dado que las células *natural killers* y los linfocitos T citotóxicos, principales participes del control de la infección primaria por EBV, reconocen péptidos virales presentes en la membrana de las células infectadas en el contexto del HLA-1, pero también dependen de la presencia de las mencionadas citoquinas proinflamatorias para su activación. Se requeriría en el futuro realizar el análisis de tipificación de HLA y de dosaje de citoquinas en estos pacientes a fin de determinar si estas diferencias en el control de la infección primaria son efectivamente debidas a factores inherentes al hospedador o a otros a factores virales.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

- No se observó en niños con infección primaria por EBV una compartimentación de las variantes virales estudiadas.

- Se confirmó que la variante viral Zp-V3, de la región del promotor del gen BZLF1, presenta una asociación estadística con el desarrollo de neoplasias.

- En el promotor del gen BZLF1, a pesar de ser una región con escasa variabilidad, se describió una nueva variante viral.

- Las variantes del gen BKRF1 (EBNA1) halladas con mayor frecuencia en nuestra región coincidieron con las descriptas en adultos en América y en particular con algunas de América del Sur, lo cual sugiere que las mismas se asociarían al origen geográfico del virus y no a su potencial oncogénico.

- Se describió por primera vez la variante Alaskan del gen BNLF1 (LMP1) en neoplasias linfoides y fuera de la región geográfica donde había sido exclusivamente identificada sólo en asociación con carcinoma nasofaríngeo.

- Se detectó una elevada proporción de aislamientos con la variante del30 entre los pacientes con linfomas y MNI, lo cual podría sugerir que esta variante estaría asociada a patologías EBV+, tanto benignas como malignas.

- En los pacientes pediátricos con MNI el control de la viremia se puso de manifiesto transcurrido un mes de la aparición de la sintomatología.

Conclusión final

Este es el primer trabajo que caracteriza las variantes de los genes BZLF1, BKRF1 y BNLF1 de EBV en forma conjunta en pacientes pediátricos con MNI de nuestra región geográfica y estudia su asociación con las neoplasias EBV+. El hallazgo de variantes virales asociadas a patologías tumorales resulta de suma importancia; sin embargo, el desarrollo de linfomas en ausencia de estas variantes, e incluso en ausencia de EBV, permite concluir que la capacidad oncogénica del virus estaría dada por una sumatoria de elementos que involucraría tanto genes virales como factores celulares e incluso ambientales.

La identificación de estos marcadores podría brindar un aporte más a la resolución de una de las preocupaciones actuales en la oncología pediátrica, como es la caracterización de factores pronósticos que permitan incluir a los pacientes en diferentes grupos de riesgo, a fin de ofrecer una terapéutica efectiva con el mínimo de efectos secundarios.

8. REFERENCIAS

8. REFERENCIAS

Ai, J, Xie Z, Liu C, Huang Z, Xu J. 2012. Analysis of EBNA-1 and LMP-1 Variants in Diseases Associated with EBV Infection in Chinese Children. Virol J 9(1):13.

Allan, GJ, Inman GJ, Parker BD, Rowe DT, Farrell PJ. 1992. Cell grouth effects of Epstein-Barr virus Leader protein. Journal of General Virology 73:1547-1551.

Ambinder, RF, Mullen MA, Chang YN, Hayward GS, Hayward SD. 1991. Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. Journal of Virology 65:1466-1478.

Apcher, S, Daskalogianni C, Manoury B, Fahraeus R. 2010. Epstein Barr virus-encoded EBNA1 interference with MHC class I antigen presentation reveals a close correlation between mRNA translation initiation and antigen presentation. PLoS Pathogens 6:e1001151.

Araujo, I, Bittencourt AL, Barbosa HS, Netto EM, Mendonca N, Foss HD, Hummel M, Stein H. 2006. The high frequency of EBV infection in pediatric Hodgkin lymphoma is related to the classical type in Bahia, Brazil. Virchows Arch 449(3):315-319.

Baer, R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS, Satchwell SC, Seguin C, et al. 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. Nature 310(5974):207-211.

Barros, MH, Vera-Lozada G, Soares FA, Niedobitek G, Hassan R. 2011. Tumor microenvironment composition in pediatric classical hodgkin lymphoma is modulated by age and epstein-barr virus infection. Int J Cancer.

Bauer, CC, Aberle SW, Popow-Kraupp T, Kapitan M, Hofmann H, Puchhammer-Stockl E. 2005. Serum Epstein-Barr virus DNA load in primary Epstein-Barr virus infection. J Med Virol 75(1):54-58.

BenAyed-Guerfali, D, Ayadi W, Miladi-Abdennadher I, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. 2011. Characteristics of epstein barr virus variants associated with gastric carcinoma in Southern Tunisia. Virol J 8:500.

Bentz, GL, Whitehurst C, Pagano JS. 2011. Epstein-Barr Virus LMP1 C-terminal Activating Region-3 contributes to LMP1-mediated cellular migration via its interaction with Ubc9. J Virol.

Berger, C, Brousset P, McQuain C, Knecht H. 1997a. Deletion variants within the NF-kappaB activation domain of the LMP1 oncogene in acquired immunodeficiency syndrome-related large cell lymphomas, in prelymphomas and atypical lymphoproliferations. Leuk Lymphoma 26(3-4):239-250.

Berger, C, Day P, Meier G, Zingg W, Bossart W, Nadal D. 2001. Dynamics of Epstein-Barr virus DNA levels in serum during EBV-associated disease. J Med Virol 64(4):505-512.

Berger, C, McQuain C, Sullivan JL, Nadal D, Quesenberry PJ, Knecht H. 1997b. The 30-bp deletion variant of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 prevails in acute infectious mononucleosis. J Infect Dis 176(5):1370-1373.

Berth, M, Vanheule G, Depuydt C, Benoy I. 2011. Serum Epstein-Barr virus (EBV) viral load can be a complementary sensitive test in primary Epstein-Barr virus infection. J Clin Virol 50(2):184-185.

Bhatia, K, Magrath I. 1999. EBNA-1 sequences in endemic and sporadic Burkitt's lymphoma. J Virol 73(8):7096-7097.

Bhatia, K, Raj A, Guitierrez MI, Judde JG, Spangler G, Venkatesh H, Magrath IT. 1996. Variation in the sequence of Epstein Barr virus nuclear antigen 1 in normal peripheral blood lymphocytes and in Burkitt's lymphomas. Oncogene 13(1):177-181.

Brady, G, Macarthur GJ, Farrell PJ. 2008. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. Postgrad Med J 84(993):372-377.

Brauninger, A, Schmitz R, Bechtel D, Renne C, Hansmann ML, Kuppers R. 2006. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. Int J Cancer 118(8):1853-1861.

Bray, F, Haugen M, Moger TA, Tretli S, Aalen OO, Grotmol T. 2008. Age-incidence curves of nasopharyngeal carcinoma worldwide: bimodality in low-risk populations and aetiologic implications. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 17(9):2356-2365.

Carey, M, Kolman J, Katz DA, Gradoville L, Barberis L, Miller G. 1992. Transcriptional synergy by the Epstein-Barr virus transactivator ZEBRA. J Virol 66(8):4803-4813.

Ceccarelli, DF, Frappier L. 2000. Functional analyses of the EBNA1 origin DNA binding protein of Epstein-Barr virus. J Virol 74(11):4939-4948.

Cohen, J, Wang F, Mannick J, Kieff E. 1989. Epstein–Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. Proc Natl Acad Sci U S A 86:9558-9562.

Cohen, JI. 2000. Epstein-Barr virus infection. N Engl J Med 343(7):481-492.

Correa, RM, Fellner MD, Alonio LV, Durand K, Teyssie AR, Picconi MA. 2004. Epstein-barr virus (EBV) in healthy carriers: Distribution of genotypes and 30 bp deletion in latent membrane protein-1 (LMP-1) oncogene. J Med Virol 73(4):583-588.

Correa, RM, Fellner MD, Durand K, Redini L, Alonio V, Yampolsky C, Colobraro A, Sevlever G, Teyssie A, Benetucci J, Picconi MA. 2007. Epstein Barr virus genotypes and LMP-1 variants in HIV-infected patients. J Med Virol 79(4):401-407.

Crawford, DH. 2001. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 356(1408):461-473.

Crawford, DH, Macsween KF, Higgins CD, Thomas R, McAulay K, Williams H, Harrison N, Reid S, Conacher M, Douglas J, Swerdlow AJ. 2006. A cohort study among university students: identification of risk factors for Epstein-Barr virus seroconversion and infectious mononucleosis. Clin Infect Dis 43(3):276-282.

Chabay, P, Burna V, Moar A, Grinstein S. 1999. Prevalencia de la infección por el virus de Epstein-Barr en pacientes pediátricos. Revista del Hospital de Ñiños Buenos Aires 41:88-91.

Chabay, P, De Matteo E, Lorenzetti M, Baron AV, Valva P, Preciado MV. 2009. Low frequency of Epstein Barr virus association and high frequency of p53 overexpression in an Argentinean pediatric T-cell lymphoma series. Pediatr Dev Pathol 12(1):28-34.

Chabay, P, De Matteo E, Merediz A, Preciado MV. 2004. High frequency of Epstein Barr virus latent membrane protein-1 30 bp deletion in a series of pediatric malignancies in Argentina. Arch Virol 149(8):1515-1526.

Chabay, P, Lara J, Lorenzetti M, Cambra P, Acosta Haab G, Aversa L, De Matteo E, Preciado MV. 2011. Epstein Barr virus in relation to apoptosis markers and patients' outcome in pediatric B-cell Non-Hodgkin lymphoma. Cancer Lett 307(2):221-226.

Chabay, PA, Barros MH, Hassan R, De Matteo E, Rey G, Carrico MK, Renault IZ, Preciado MV. 2008. Pediatric Hodgkin lymphoma in 2 South American series: a distinctive epidemiologic pattern and lack of association of Epstein-Barr virus with clinical outcome. J Pediatr Hematol Oncol 30(4):285-291.

Chabay, PA, De Matteo EN, Aversa L, Maglio S, Grinstein S, Preciado MV. 2002. Assessment of Epstein-Barr virus association with pediatric non-hodgkin lymphoma

in immunocompetent and in immunocompromised patients in Argentina. Arch Pathol Lab Med 126(3):331-335.

Chan, KH, Tam JS, Peiris JS, Seto WH, Ng MH. 2001. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infancy. J Clin Virol 21(1):57-62.

Chang, CM, Yu KJ, Mbulaiteye SM, Hildesheim A, Bhatia K. 2009. The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. Virus Res 143(2):209-221.

Chang, KL, Chen YY, Chen WG, Hayashi K, Bacchi C, Bacchi M, Weiss LM. 1999. EBNA-1 gene sequences in Brazilian and American patients with Hodgkin's disease. Blood 94(1):244-250.

Chen, MR, Tsai CH, Wu FF, Kan SH, Yang CS, Chen JY. 1999. The major immunogenic epitopes of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 are encoded by sequence domains which vary among nasopharyngeal carcinoma biopsies and EBV-associated cell lines. J Gen Virol 80 (Pt 2):447-455.

Chen, WG, Chen YY, Bacchi MM, Bacchi CE, Alvarenga M, Weiss LM. 1996. Genotyping of Epstein-Barr virus in Brazilian Burkitt's lymphoma and reactive lymphoid tissue. Type A with a high prevalence of deletions within the latent membrane protein gene. Am J Pathol 148(1):17-23.

Chen, YY, Chang KL, Chen WG, Shibata D, Hayashi K, Weiss LM. 1998. Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen-1 carboxy-terminal gene sequences in Japanese and American patients with gastric carcinoma. Lab Invest 78(7):877-882.

Cheng, CC, Chang LY, Shao PL, Lee PI, Chen JM, Lu CY, Lee CY, Huang LM. 2007. Clinical manifestations and quantitative analysis of virus load in Taiwanese children with Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis. J Microbiol Immunol Infect 40(3):216-221.

Daigle, D, Gradoville L, Tuck D, Schulz V, Wang'ondu R, Ye J, Gorres K, Miller G. 2011. Valproic acid antagonizes the capacity of other histone deacetylase inhibitors to activate the Epstein-barr virus lytic cycle. J Virol 85(11):5628-5643.

Dambaugh, T, Hennessy K, Chamnankit L, Kieff E. 1984. U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. Proc Natl Acad Sci U S A 81(23):7632-7636.

Dawson, CW, Tramountanis G, Eliopoulos AG, Young LS. 2003. Epstein Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. The journal of Biological Chemistry 278:3694-3704.

De Matteo, E, Baron AV, Chabay P, Porta J, Dragosky M, Preciado MV. 2003. Comparison of Epstein-Barr virus presence in Hodgkin lymphoma in pediatric versus adult Argentine patients. Arch Pathol Lab Med 127(10):1325-1329.

Deacon, EM, Pallesen G, Niedobitek G, Crocker J, Brooks L, Rickinson AB, Young LS. 1993. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. J Exp Med 177(2):339-349.

Delecluse, HJ, Feederle R, O'Sullivan B, Taniere P. 2007. Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist. J Clin Pathol 60(12):1358-1364.

Dinand, V, Arya LS. 2006. Epidemiology of childhood Hodgkins disease: is it different in developing countries? Indian Pediatr 43(2):141-147.

Dirnhofer, S, Angeles-Angeles A, Ortiz-Hidalgo C, Reyes E, Gredler E, Krugmann J, Fend F, Quintanilla-Martinez L. 1999. High prevalence of a 30-base pair deletion in the

Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 gene and of strain type B EBV in Mexican classical Hodgkin's disease and reactive lymphoid tissue. Hum Pathol 30(7):781-787.

Do, NV, Ingemar E, Phi PT, Jenny A, Chinh TT, Zeng Y, Hu L. 2008. A major EBNA1 variant from Asian EBV isolates shows enhanced transcriptional activity compared to prototype B95.8. Virus Res 132(1-2):15-24.

Dolan, A, Addison C, Gatherer D, Davison AJ, McGeoch DJ. 2006. The genome of Epstein-Barr virus type 2 strain AG876. Virology 350(1):164-170.

Dunne, PJ, Faint JM, Gudgeon NH, Fletcher JM, Plunkett FJ, Soares MV, Hislop AD, Annels NE, Rickinson AB, Salmon M, Akbar AN. 2002. Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential. Blood 100(3):933-940.

Edwards, RH, Seillier-Moiseiwitsch F, Raab-Traub N. 1999. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. Virology 261(1):79-95.

Edwards, RH, Sitki-Green D, Moore DT, Raab-Traub N. 2004. Potential selection of LMP1 variants in nasopharyngeal carcinoma. J Virol 78(2):868-881.

Enbom, M, Strand A, Falk KI, Linde A. 2001. Detection of Epstein-Barr virus, but not human herpesvirus 8, DNA in cervical secretions from Swedish women by real-time polymerase chain reaction. Sex Transm Dis 28(5):300-306.

Epstein, MA, Achong BG, Barr YM. 1964. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. Lancet 1(7335):702-703.

Fafi-Kremer, S, Morand P, Germi R, Ballout M, Brion JP, Genoulaz O, Nicod S, Stahl JP, Ruigrok RWH, Seigneurin JM. 2005. A Prospective Follow-Up of Epstein-Barr Virus LMP1 Genotypes in Saliva and Blood during Infectious Mononucleosis. The journal of Infectious Diseases 192:2108-2111.

Farrell, P. 2001. Epstein-Barr Virus, The B95.8 strain map. In: Wilson J, May G, editors. Epstein-Barr Virus Protocols. London. p 3-12.

Farrell, PJ. 2007. Role for HLA in susceptibility to infectious mononucleosis. J Clin Invest 117(10):2756-2758.

Fassone, L, Bhatia K, Gutierrez M, Capello D, Gloghini A, Dolcetti R, Vivenza D, Ascoli V, Lo Coco F, Pagani L, Dotti G, Rambaldi A, Raphael M, Tirelli U, Saglio G, Magrath IT, Carbone A, Gaidano G. 2000. Molecular profile of Epstein-Barr virus infection in HHV-8-positive primary effusion lymphoma. Leukemia 14(2):271-277.

Faumont, N, Chanut A, Benard A, Cogne N, Delsol G, Feuillard J, Meggetto F. 2009. Comparative analysis of oncogenic properties and nuclear factor-kappaB activity of latent membrane protein 1 natural variants from Hodgkin's lymphoma's Reed-Sternberg cells and normal B-lymphocytes. Haematologica 94(3):355-363.

Feng, WH, Kraus RJ, Dickerson SJ, Lim HJ, Jones RJ, Yu X, Mertz JE, Kenney SC. 2007. ZEB1 and c-Jun levels contribute to the establishment of highly lytic Epstein-Barr virus infection in gastric AGS cells. J Virol 81(18):10113-10122.

Fielding, CA, Sandvej K, Mehl A, Brennan P, Jones M, Rowe M. 2001. Epstein-Barr virus LMP-1 natural sequence variants differ in their potential to activate cellular signaling pathways. J Virol 75(19):9129-9141.

Fukayama, M, Ushiku T. 2011. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. Pathol Res Pract 207(9):529-537.

Fukuda, M, Longnecker R. 2007. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mediates transformation through constitutive activation of the Ras/PI3-K/Akt Pathway. J Virol 81(17):9299-9306.

Gartner, B, Preiksaitis JK. 2010. EBV viral load detection in clinical virology. J Clin Virol 48(2):82-90.

Gires, O, Kohlhuber F, Kilger E, Baumann M, Kieser A, Kaiser C, Zeidler R, Scheffer B, Ueffing M, Hammerschmidt W. 1999. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. EMBO J 18(11):3064-3073.

Gires, O, Zimber-Strobl U, Gonnella R, Ueffing M, Marshall G, Zeidler R, Pich D, Hammerschmidt W. 1997. Latent membrane protein 1 of Epstein–Barrvirus mimics a constitutively active receptor molecule. EMBO Journal 16:6131-6140.

Greiner, TC, Abou-Elella AA, Smir BN, Orazi A, Hinrichs S, Anderson J, Gross T, Bierman P, Hauke R. 2000. Molecular epidemiology of EBNA-1 substrains of Epstein-Barr virus in posttransplant lymphoproliferative disorders which have infrequent p53 mutations. Leuk Lymphoma 38(5-6):563-576.

Guidoboni, M, Ponzoni M, Caggiari L, Lettini AA, Vago L, De Re V, Gloghini A, Zancai P, Carbone A, Boiocchi M, Dolcetti R. 2005. Latent membrane protein 1 deletion mutants accumulate in reed-sternberg cells of human immunodeficiency virus-related Hodgkin's lymphoma. J Virol 79(4):2643-2649.

Guiretti, DM, Chabay PA, Valva P, Stefanoff CG, Barros MH, De Matteo E, Renault IZ, Preciado MV, Hassan R. 2007. Structural variability of the carboxy-terminus of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 gene in Hodgkin's lymphomas. J Med Virol 79(11):1730-1722.

Gulley, ML, Tang W. 2010. Using Epstein-Barr viral load assays to diagnose, monitor, and prevent posttransplant lymphoproliferative disorder. Clin Microbiol Rev 23(2):350-366.

Gutiérrez, MI, Ibrahim MM, Dale JK, Greiner TC, Straus SE, Bhatia K. 2002. Discrete alterations in the BZLF1 promoter in tumor and non-tumor-associated Epstein-Barr virus. J Natl Cancer Inst 94(23):1757-1763.

Gutiérrez, MI, Kingma DW, Sorbara L, Tran M, Raffeld M, Jaffe ES, Magrath I, Bhatia K. 2000. Association of EBV strains, defined by multiple loci analyses, in non-Hodgkin lymphomas and reactive tissues from HIV positive and HIV negative patients. Leuk Lymphoma 37(3-4):425-429.

Gutiérrez, MI, Raj A, Spangler G, Sharma A, Hussain A, Judde JG, Tsao SW, Yuen PW, Joab I, Magrath IT, Bhatia K. 1997. Sequence variations in EBNA-1 may dictate restriction of tissue distribution of Epstein-Barr virus in normal and tumour cells. J Gen Virol 78 (Pt 7):1663-1670.

Gutiérrez, MI, Spangler G, Kingma D, Raffeld M, Guerrero I, Misad O, Jaffe ES, Magrath IT, Bhatia K. 1998. Epstein-Barr virus in nasal lymphomas contains multiple ongoing mutations in the EBNA-1 gene. Blood 92(2):600-606.

Habeshaw, G, Yao QY, Bell AI, Morton D, Rickinson AB. 1999. Epstein-barr virus nuclear antigen 1 sequences in endemic and sporadic Burkitt's lymphoma reflect virus strains prevalent in different geographic areas. J Virol 73(2):965-975.

Hadinoto, V, Shapiro M, Greenough TC, Sullivan JL, Luzuriaga K, Thorley-Lawson DA. 2008. On the dynamics of acute EBV infection and the pathogenesis of infectious mononucleosis. Blood 111(3):1420-1427.

Hadinoto, V, Shapiro M, Sun CC, Thorley-Lawson DA. 2009. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. PLoS Pathog 5(7):e1000496.

Hahn, P, Novikova E, Scherback L, Janik C, Pavlish O, Arkhipov V, Nicholls J, Muller-Lantzsch N, Gurtsevitch V, Grasser FA. 2001. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. Int J Cancer 91(6):815-821.

Hall, TA. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98.

Hayashi, K, Chen WG, Chen YY, Bacchi MM, Bacchi CE, Alvarenga M, Abreu ES, Chang KL, Weiss LM. 1997. Deletion of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene in United States and Brazilian Hodgkin's disease and reactive lymphoid tissue: high frequency of a 30-bp deletion. Hum Pathol 28(12):1408-1414.

Henle, G, Henle W, Clifford P, Diehl V, Kafuko GW, Kirya BG, Klein G, Morrow RH, Munube GM, Pike P, Tukei PM, Ziegler JL. 1969. Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. J Natl Cancer Inst 43(5):1147-1157.

Higgins, CD, Swerdlow AJ, Macsween KF, Harrison N, Williams H, McAulay K, Thomas R, Reid S, Conacher M, Britton K, Crawford DH. 2007. A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes. J Infect Dis 195(4):474-482.

Higuchi, M, Kieff E, Izumi KM. 2002. The Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus Kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. Journal of Virology 76:445-459.

Hinz, M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, Dorken B, Zenke M, Stein H, Scheidereit C. 2002. Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. J Exp Med 196(5):605-617.

Hippocrate, A, Oussaief L, Joab I. 2011. Possible role of EBV in breast cancer and other unusually EBV-associated cancers. Cancer Lett 305(2):144-149.

Hjalgrim, H, Engels EA. 2008. Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. J Intern Med 264(6):537-548.

Hjalgrim, H, Friborg J, Melbye M. 2007a. The epidemiology of EBV and its association with malignant disease. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, editors. Human Herpes viruses. Cambridge: Cambridge University Press.

Hjalgrim, H, Rostgaard K, Johnson PC, Lake A, Shield L, Little AM, Ekstrom-Smedby K, Adami HO, Glimelius B, Hamilton-Dutoit S, Kane E, Taylor GM, McConnachie A, Ryder LP, Sundstrom C, Andersen PS, Chang ET, Alexander FE, Melbye M, Jarrett RF. 2010. HLA-A alleles and infectious mononucleosis suggest a critical role for cytotoxic T-cell response in EBV-related Hodgkin lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A 107(14):6400-6405.

Hjalgrim, H, Smedby KE, Rostgaard K, Molin D, Hamilton-Dutoit S, Chang ET, Ralfkiaer E, Sundstrom C, Adami HO, Glimelius B, Melbye M. 2007b. Infectious mononucleosis, childhood social environment, and risk of Hodgkin lymphoma. Cancer Res 67(5):2382-2388.

Huen, D, Henderson S, Croom-Carter D. 1995. The Epstein–Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. Oncogene 10:549-560.

Huh, J, Cho K, Heo DS, Kim JE, Kim CW. 1999. Detection of Epstein-Barr virus in Korean peripheral T-cell lymphoma. Am J Hematol 60(3):205-214.

IARC. 1997. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma herpesvirus/herpesvirus 8. Lyon: IARC press.

IARC. 2002. Cancer Incidence in Five Continents. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB, editors. Lyon: IARC press.

IARC. 2008a. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Swerdlow S H CE, Harris N L, Jaffe E S, Pileri S A, Stein H, Thiele J, Vardiman J W, editor. Lyon: IARC press.

IARC. 2008b. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. Lyon: IARC press.

Israele, V, Shirley P, Sixbey JW. 1991. Excretion of the Epstein-Barr virus from the genital tract of men. J Infect Dis 163(6):1341-1343.

Izumi, KM, Farland ED, Riley EA, Rizzo D, Chen Y, Kieff E, Cahir M. 1999. The residues between the two transformation effector sites of Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 are not critical for B-lymphocyte growth transformation. Journal of Virology 73:9908-9916.

Ji, KM, Li CL, Meng G, Han AD, Wu XL. 2008. New BZLF1 sequence variations in EBV-associated undifferentiated nasopharyngeal carcinoma in southern China. Arch Virol 153(10):1949-1953.

Jiang, W, Szekely L, Wendel-Hansen V, Ringertz N, Klein G, Rosen A. 1991. Co-Localization of the retinoblastoma protein and the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-5. Expperimental Cell Research 197:314-318.

Jin, Y, Xie Z, Lu G, Yang S, Shen K. 2010. Characterization of variants in the promoter of BZLF1 gene of EBV in nonmalignant EBV-associated diseases in Chinese children. Virol J 7:92.

Joshi, D, Quadri M, Gangane N, Joshi R. 2009. Association of Epstein Barr virus infection (EBV) with breast cancer in rural Indian women. PLoS One 4(12):e8180.

Jung, CK, Lee KY, Kim Y, Han K, Shim SI, Kim BK, Kang CS. 2001. Epstein-Barr virus infection, drug resistance and prognosis in Korean T- and NK-cell lymphomas. Pathol Int 51(5):355-363.

Junker, AK, Thomas EE, Radcliffe A, Forsyth RB, Davidson AG, Rymo L. 1991. Epstein-Barr virus shedding in breast milk. Am J Med Sci 302(4):220-223.

Kapranos, N, Petrakou E, Anastasiadou C, Kotronias D. 2003. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. Fertil Steril 79 Suppl 3:1566-1570.

Kilger, E, Kieser A, Baumann M, Hammerschmidt W. 1998. Epstein–Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. EMBO Journal 17:1700-17009.

Kitagawa, N, Goto M, Kurozumi K. 2000. Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. EMBO Journal 19:6742-6750.

Klein, E, Kis LL, Klein G. 2007. Epstein-Barr virus infection in humans: from harmless to life endangering virus-lymphocyte interactions. Oncogene 26(9):1297-1305.

Knecht, H, Bachmann E, Joske DJ, Sahli R, Emery-Goodman A, Casanova JL, Zilic M, Bachmann F, Odermatt BF. 1993. Molecular analysis of the LMP (latent membrane protein) oncogene in Hodgkin's disease. Leukemia 7(4):580-585.

Komano, J, Maruo S, Kurozumi K, Oda T, Takada K. 1999. Oncogenic role of Epstein–Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. Journal of Virology 73:9827-9831.

Kulwichit, W, Edwards R, Davenport E. 1998. Expression of the Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 95:11963-11968.

Kuppers, R. 2003. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. Nat Rev Immunol 3(10):801-812.

Larcher, C, Bernhard D, Schaadt E, Adler B, Ausserlechner MJ, Mitterer M, Huemer HP. 2003. Functional analysis of the mutated Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1(69del): implications for a new role of naturally occurring LMP1 variants. Haematologica 88(12):1324-1335.

Levitskaya, J, Coram M, Levitsky V. 1995. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein–Barr virus nuclear antigen-1. Nature 375:685-688.

Li, Q, Spriggs MK, Kovats S, Turk SM, Comeau MR, Nepom B, Hutt-Fletcher LM. 1997. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. J Virol 71(6):4657-4662.

Librado, P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25(11):1451-1452.

Liu, YJ, Arpin C. 1997. Germinal center development. Immunol Rev 156:111-126.

Lole, KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC. 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. J Virol 73(1):152-160.

Longnecker, R. 2000. Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? Adv Cancer Res 79:175-200.

Lorenzetti, MA, Altcheh J, Moroni S, Moscatelli G, Chabay PA, Preciado MV. 2010a. EBNA1 sequences in Argentinean pediatric acute and latent Epstein-Barr virus infection reflect circulation of novel South American variants. J Med Virol 82(10):1730-1738.

Lorenzetti, MA, De Matteo E, Gass H, Martinez Vazquez P, Lara J, Gonzalez P, Preciado MV, Chabay PA. 2010b. Characterization of Epstein Barr virus latency pattern in Argentine breast carcinoma. PLoS One 5(10):e13603.

Lorenzetti, MA, Gutierrez MI, Altcheh J, Moscatelli G, Moroni S, Chabay PA, Preciado MV. 2009. Epstein-Barr virus BZLF1 gene promoter variants in pediatric patients with acute infectious mononucleosis: its comparison with pediatric lymphomas. J Med Virol 81(11):1912-1917.

Loureiro, MM, Morais JC, Milito CB. 2004. Expression of Epstein-Barr virus in patients with Hodgkin´s disease: report of 64 cases from Rio de Janeiro, Brazil. Jornal Brasileiro de Patología e Medicina Laboratorial 40:37-40.

Lu, J, Murakami M, Verma SC, Cai Q, Haldar S, Kaul R, Wasik MA, Middeldorp J, Robertson ES. 2011. Epstein-Barr Virus nuclear antigen 1 (EBNA1) confers resistance to apoptosis in EBV-positive B-lymphoma cells through up-regulation of survivin. Virology 410(1):64-75.

Luzuriaga, K, Sullivan JL. 2010. Infectious mononucleosis. N Engl J Med 362(21):1993-2000.

MacKenzie, J, Gray D, Pinto-Paes R, Barrezueta LF, Armstrong AA, Alexander FA, McGeoch DJ, Jarrett RF. 1999. Analysis of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen

1 subtypes in EBV-associated lymphomas from Brazil and the United Kingdom. J Gen Virol 80 (Pt 10):2741-2745.

Mai, SJ, Ooka T, Li DJ, Zeng MS, Jiang RC, Yu XJ, Zhang RH, Chen SP, Zeng YX. 2007. Functional advantage of NPC-related V-val subtype of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 compared with prototype in epithelial cell line. Oncol Rep 17(1):141-146.

Mainou, BA, Raab-Traub N. 2006. LMP1 strain variants: biological and molecular properties. J Virol 80(13):6458-6468.

Martini, M, Capello D, Serraino D, Navarra A, Pierconti F, Cenci T, Gaidano G, Larocca LM. 2007. Characterization of variants in the promoter of EBV gene BZLF1 in normal donors, HIV-positive patients and in AIDS-related lymphomas. J Infect 54(3):298-306.

Mbulaiteye, SM, Biggar RJ, Bhatia K, Linet MS, Devesa SS. 2009. Sporadic childhood Burkitt lymphoma incidence in the United States during 1992-2005. Pediatr Blood Cancer 53(3):366-370.

McAulay, KA, Higgins CD, Macsween KF, Lake A, Jarrett RF, Robertson FL, Williams H, Crawford DH. 2007. HLA class I polymorphisms are associated with development of infectious mononucleosis upon primary EBV infection. J Clin Invest 117(10):3042-3048.

McDonald, C, Karstegl CE, Kellam P, Farrell PJ. 2010. Regulation of the Epstein-Barr virus Zp promoter in B lymphocytes during reactivation from latency. J Gen Virol 91(Pt 3):622-629.

Miller, IG, Jr., El-Guindy A. 2002. Regulation of Epstein-Barr virus lytic cycle activation in malignant and nonmalignant disease. J Natl Cancer Inst 94(23):1733-1735.

Morrison, JA, Klingelhutz AJ, Raab-Traub N. 2003. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A activates beta-catenin signaling in epithelial cells. J Virol 77(22):12276-12284.

Mueller, N, Evans A, Harris NL, Comstock GW, Jellum E, Magnus K, Orentreich N, Polk BF, Vogelman J. 1989. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. N Engl J Med 320(11):689-695.

Nagy, N, Klein E. 2010. Deficiency of the proapoptotic SAP function in X-linked lymphoproliferative disease aggravates Epstein- Barr virus (EBV) induced mononucleosis and promotes lymphoma development. Immunology Letters 130:13-18.

Naher, H, Gissmann L, Freese UK, Petzoldt D, Helfrich S. 1992. Subclinical Epstein-Barr virus infection of both the male and female genital tract--indication for sexual transmission. J Invest Dermatol 98(5):791-793.

Nakai, H, Kawamura Y, Sugata K, Sugiyama H, Enomoto Y, Asano Y, Ihira M, Ohashi M, Kato T, Yoshikawa T. 2011. Host factors associated with the kinetics of EBV DNA load in patients with primary EBV infection. Microbiol Immunol.

Nanbo, A, Inoue K, Adachi-Takasawa K, Takada K, . 2002. Epstein–Barr virus RNA confers resistance to interferon-a-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. EMBO Journal 21:21954-21965.

Nguyen-Van, D, Ernberg I, Phi PP-T, Tran-Thi C, Hu L. 2008. Epstein-Barr virus genetic variation in Vietnamese patients with nasopharyngeal carcinoma: full-length analysis of LMP1. Virus Genes 37:273-281.

Nilsson, K, Klein G, Henle W, Henle G. 1971. The establishment of lymphoblastoid lines from adult and fetal human lymphoid tissue and its dependence on EBV. Int J Cancer 8(3):443-450.

Nonkwelo, C, Skinner J, Bell A, Rickinson A, Sample J. 1996. Transcription start site downstream of Epstein-Barr virus (EBV) Fp promoter in early passage Burkitt lymphoma cells define a fourth promoter for expresion of the EBV EBNA-1 protein. Journal of Virology 70(1):623-627.

Noorali, S, Pervez S, Moatter T, Soomro IN, Kazmi SU, Nasir MI, Smith JL. 2003. Characterization of T-cell non-Hodgkin's lymphoma and its association with Epstein-Barr virus in Pakistani patients. Leuk Lymphoma 44(5):807-813.

Oschlies, I, Klapper W, Zimmermann M, Krams M, Wacker HH, Burkhardt B, Harder L, Siebert R, Reiter A, Parwaresch R. 2006. Diffuse large B-cell lymphoma in pediatric patients belongs predominantly to the germinal-center type B-cell lymphomas: a clinicopathologic analysis of cases included in the German BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) Multicenter Trial. Blood 107(10):4047-4052.

Packham, G, Brimmell M, Cook D, Sinclair AJ, Farrell PJ. 1993. Strain variation in Epstein-Barr virus immediate early genes. Virology 192(2):541-550.

Page, RDM. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12:357-358.

Palendira, U, Low C, Chan A, Hislop AD, Ho E, Phan TG, Deenick E, Cook MC, Riminton DS, Choo S, Loh R, Alvaro F, Booth C, Gaspar HB, Moretta A, Khanna R, Rickinson AB, Tangye SG. 2011. Molecular pathogenesis of EBV susceptibility in XLP as revealed by analysis of female carriers with heterozygous expression of SAP. PLoS Biol 9(11):e1001187.

Perera, RA, Samaranayake LP, Tsang CS. 2010. Shedding dynamics of Epstein-Barr virus: A type 1 carcinogen. Arch Oral Biol 55(9):639-647.

Posada, D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14(9):817-818.

Preciado, MV, Chabay PA, De Matteo EN, Gismondi MI, Rey G, Zubizarreta P. 2002. Epstein Barr virus associated pediatric nasopharyngeal carcinoma: its correlation with p53 and bcl-2 expression. Med Pediatr Oncol 38(5):345-348.

Precopio, ML, Sullivan JL, Willard C, Somasundaran M, Luzuriaga K. 2003. Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4+ and CD8+ T cells during primary infection. J Immunol 170(5):2590-2598.

Rickinson, AB, Kieff ED. 2007. Epstein Barr virus. In: D M Knipe PMH, editor. Fields Virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p 2655-2700.

Rizvi, MA, Evens AM, Tallman MS, Nelson BP, Rosen ST. 2006. T-cell non-Hodgkin lymphoma. Blood 107(4):1255-1264.

ROHA, editor. 2011. Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino. Resultados 2000-2008. 3rd ed. Buenos Aires: Fundación Kaleidos.

Rothenberger, S, Bachmann E, Berger C, McQuain C, Odermatt BF, Knecht H. 1997. Natural 30 base pair and 69 base pair deletion variants of the LMP1 oncogene do stimulate NF-kappaB-mediated transcription. Oncogene 14(17):2123-2126.

Rowe, M, Kelly GL, Bell AI, Rickinson AB. 2009. Burkitt's lymphoma: the Rosetta Stone deciphering Epstein-Barr virus biology. Semin Cancer Biol 19(6):377-388.

Ryan, JL, Fan H, Swinnen LJ, Schichman SA, Raab-Traub N, Covington M, Elmore S, Gulley ML. 2004. Epstein-Barr Virus (EBV) DNA in plasma is not encapsidated in patients with EBV-related malignancies. Diagn Mol Pathol 13(2):61-68.

Saechan, V, Mori A, Mitarnun W, Settheetham-Ishida W, Ishida T. 2006. Analysis of LMP1 variants of EBV in Southern Thailand: evidence for strain-associated T-cell tropism and pathogenicity. J Clin Virol 36(2):119-125.

Saechan, V, Settheetham-Ishida W, Kimura R, Tiwawech D, Mitarnun W, Ishida T. 2010. Epstein-Barr virus strains defined by the latent membrane protein 1 sequence characterize Thai ethnic groups. J Gen Virol 91(Pt 8):2054-2061.

Sample, J, Young L, Martin B, Chatman T, Kieff E, Rickinson A. 1990. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. J Virol 64(9):4084-4092.

Sandlund, JT, Downing JR, Crist WM. 1996. Non-Hodgkin's lymphoma in childhood. N Engl J Med 334(19):1238-1248.

Sandvej, K, Gratama JW, Munch M, Zhou XG, Bolhuis RL, Andresen BS, Gregersen N, Hamilton-Dutoit S. 1997. Sequence analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of four variants among wild-type EBV isolates. Blood 90(1):323-330.

Sandvej, K, Zhou XG, Hamilton-Dutoit S. 2000. EBNA-1 sequence variation in Danish and Chinese EBV-associated tumours: evidence for geographical polymorphism but not for tumour-specific subtype restriction. J Pathol 191(2):127-131.

Sayos, J, Wu C, Morra M. 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. Nature 395:462-469.

Shair, KH, Bendt KM, Edwards RH, Bedford EC, Nielsen JN, Raab-Traub N. 2007. EBV latent membrane protein 1 activates Akt, NFkappaB, and Stat3 in B cell lymphomas. PLoS Pathog 3(11):e166.

Shimizu, N, Takada K. 1993. Analysis of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus: identification of an anti-immunoglobulin response sequence. J Virol 67(6):3240-3245.

Sitki-Green, D, Covington M, Raab-Traub N. 2003. Compartmentalization and transmission of multiple epstein-barr virus strains in asymptomatic carriers. J Virol 77(3):1840-1847.

Sitki-Green, DL, Edwards RH, Covington MM, Raab-Traub N. 2004. Biology of Epstein-Barr virus during infectious mononucleosis. J Infect Dis 189(3):483-492.

Stewart, S, Dawson CW, Takada K, Curnow J, Moody CA, Sixbey JW, Young LS. 2004. Epstein-Barr virus-encoded LMP2A regulates viral and cellular gene expression by modulation of the NF-kappaB transcription factor pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 101(44):15730-15735.

Swofford, DL. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version v 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Szekely, L, Selivanova G, Magnusson K, Klein G, Wiman K. 1993. EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 90:5455-5459.

Tamura, K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol Biol Evol.

Tangye, SG, Lazetic S, Woollatt E, Sutherland GR, Lanier LL, Philips JH. 1999. Cutting edge: human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. Journal of Immunology 162:6981-6985.

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

Thorley-Lawson, DA, Gross A. 2004. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. N Engl J Med 350(13):1328-1337.

Tiwawech, D, Srivatanakul P, Karalak A, Ishida T. 2008. Association between EBNA2 and LMP1 subtypes of Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma in Thais. J Clin Virol 42(1):1-6.

Tong, JH, Lo KW, Au FW, Huang DP, To KF. 2003. Re: Discrete alterations in the BZLF1 promoter in tumor and non-tumor-associated Epstein-Barr virus. J Natl Cancer Inst 95(13):1008-1009; author reply 1009.

Triantos, D, Boulter AW, Leao JC, Di Alberti L, Porter SR, Scully CM, Birnbaum W, Johnson NW, Teo CG. 1998. Diversity of naturally occurring Epstein-Barr virus revealed by nucleotide sequence polymorphism in hypervariable domains in the BamHI K and N subgenomic regions. J Gen Virol 79 (Pt 11):2809-2817.

Uchida, J, Yasui T, Takaoka-Shichijo Y, Muraoka M, Kulwichit W, Raab-Traub N, Kikutani H. 1999. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. Science 286(5438):300-303.

Uozaki, H, Fukayama M. 2008. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma--viral carcinogenesis through epigenetic mechanisms. Int J Clin Exp Pathol 1(3):198-216.

Vaysberg, M, Hatton O, Lambert SL, Snow AL, Wong B, Krams SM, Martinez OM. 2008. Tumor-derived variants of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induce sustained Erk activation and c-Fos. J Biol Chem 283(52):36573-36585.

Vetsika, EK, Callan M. 2004. Infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus. Expert Rev Mol Med 6(23):1-16.

Vouloumanou, EK, Rafailidis PI, Falagas ME. 2012. Current diagnosis and management of infectious mononucleosis. Curr Opin Hematol 19(1):14-20.

Wadowsky, RM, Laus S, Green M, Webber SA, Rowe D. 2003. Measurement of Epstein-Barr virus DNA loads in whole blood and plasma by TaqMan PCR and in peripheral blood lymphocytes by competitive PCR. J Clin Microbiol 41(11):5245-5249.

Wang, D, Liebowitz D, Kieff E. 1985. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. Cell 43(3 Pt 2):831-840.

Wang, JT, Sheeng TS, Su IJ, Chen JY, Chen MR. 2003. EBNA-1 sequence variations reflect active EBV replication and disease status or quiescent latency in lymphocytes. J Med Virol 69(3):417-425.

Wang, WY, Chien YC, Jan JS, Chueh CM, Lin JC. 2002. Consistent sequence variation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in primary tumor and peripheral blood cells of patients with nasopharyngeal carcinoma. Clin Cancer Res 8(8):2586-2590.

Wang, Y, Liu X, Xing X, Cui Y, Zhao C, Luo B. 2010. Variations of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 gene in gastric carcinomas and nasopharyngeal carcinomas from Northern China. Virus Res 147(2):258-264.

Weiss, LM. 2000. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. Curr Oncol Rep 2(2):199-204.

Wilson, JB, Bell JL, Levine AJ. 1996. Expression of Epstein-Barr nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. EMBO Journal 15:3117-3126.

Young, LS, Murray PG. 2003. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. Oncogene 22(33):5108-5121.

Young, LS, Rickinson AB. 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. Nat Rev Cancer 4(10):757-768.

Yu, X, Wang Z, Mertz JE. 2007. ZEB1 regulates the latent-lytic switch in infection by Epstein-Barr virus. PLoS Pathog 3(12):e194.

Zhang, XS, Wang HH, Hu LF, Li A, Zhang RH, Mai HQ, Xia JC, Chen LZ, Zeng YX. 2004. V-val subtype of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 preferentially exists in biopsies of nasopharyngeal carcinoma. Cancer Lett 211(1):11-18.

Zhou, X, Sandvej K, Li P, Ji X. 2001. Epstein--Barr virus gene polymorphisms in Chinese Hodgkin's disease cases and healthy donors: identification of three distinct virus variants. Journal of General Virology 82:1157-1167.

9. APÉNDICES

9. APÉNDICES

APÉNDICE A

Copia digital del certificado de aprobación del plan de trabajo expedido por el comité de Bioética del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, en el año 2006 previo al comienzo del proyecto.

HOSPITAL DE NIÑOS RICARDO GUTIERREZ
COMITE DE BIOETICA

Gallo 1330 Tel. directo 4962- 2946
Buenos Aires- Argentina Conmutador: 4962-9212/9239 int.282/258

Buenos Aires, 15 de noviembre de 2006

Dra. M. Victoria Preciado
Dr. Jaime Altcheh
Servicio de Anatomía Patológica
Laboratorio de Biología Molecular
Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez
S / D

De nuestra consideración,

Nos dirigimos a Uds , en su carácter de investigador/a principales del protocolo "Caracterización de las variantes circulantes del virus Epstein Barr en pacientes pediátricos" , para informarle que en el día de la fecha, este Comité de Bioética ha aprobado para su realización en este Hospital:

- El protocolo *Caracterización de las variantes circulantes del virus Epstein Barr en pacientes pediátricos.*
- *El Consentimiento Informado*
- *El Asentimiento*

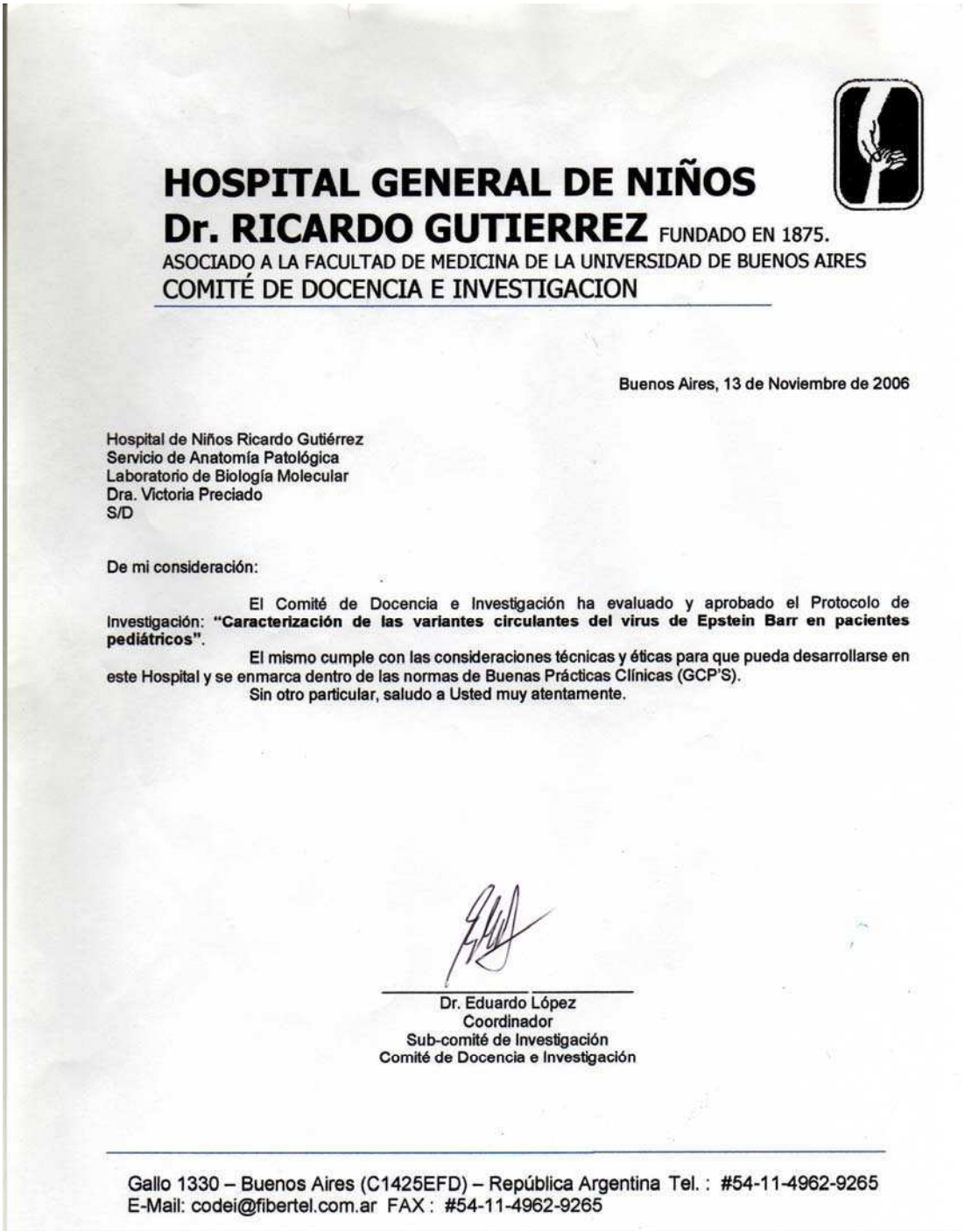
Saludamos a ud. atte.,

Dra. MARIA MABEL GARRA
FARMACEUTICA
M.N. 10616

Dr. MIGUEL DEL VALLE

APÉNDICE B

Copia digital del certificado de aprobación del plan de trabajo expedido por el comité de Docencia e Investigación del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, en el año 2006 previo al comienzo del proyecto.



HOSPITAL GENERAL DE NIÑOS
Dr. RICARDO GUTIERREZ FUNDADO EN 1875.
ASOCIADO A LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
COMITÉ DE DOCENCIA E INVESTIGACION

Buenos Aires, 13 de Noviembre de 2006

Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez
Servicio de Anatomía Patológica
Laboratorio de Biología Molecular
Dra. Victoria Preciado
S/D

De mi consideración:

El Comité de Docencia e Investigación ha evaluado y aprobado el Protocolo de Investigación: **"Caracterización de las variantes circulantes del virus de Epstein Barr en pacientes pediátricos"**.

El mismo cumple con las consideraciones técnicas y éticas para que pueda desarrollarse en este Hospital y se enmarca dentro de las normas de Buenas Prácticas Clínicas (GCP'S).

Sin otro particular, saludo a Usted muy atentamente.

Dr. Eduardo López
Coordinador
Sub-comité de Investigación
Comité de Docencia e Investigación

Gallo 1330 – Buenos Aires (C1425EFD) – República Argentina Tel. : #54-11-4962-9265
E-Mail: codei@fibertel.com.ar FAX : #54-11-4962-9265

APÉNDICE C

Modelo de consentimiento informado firmado voluntariamente por el padre/madre o tutor de los pacientes enrolados en este estudio.

Consentimiento informado

"Caracterización de las variantes circulantes del virus de Epstein Barr en pacientes pediátricos."

Lo invitamos a participar de un estudio para conocer datos acerca de la infección pediátrica con el virus de Epstein Barr y su asociación con la progresión clínica. Dicho estudio se llevará a cabo en el Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

Usted debe decidir si quiere que su hijo/a participe o no del estudio. Lea este consentimiento cuidadosamente y tómese el tiempo que necesite para decidirse. Pregunte a su doctor cualquier duda que tenga sobre el estudio.

La participación de este estudio es voluntaria. Si usted decide que su hijo/a no participe, esto no le traerá ningún perjuicio y su hijo/a seguirá siendo atendido en este hospital igual que antes. Usted será libre de retirarse en cualquier momento del estudio. Cualquier duda que usted tenga del estudio la podrá preguntar a su doctor, a los investigadores responsables, al Comité de Docencia e Investigación o al de Bioética. El estudio así como también las pruebas de laboratorio no tendrá costo ni retribución alguna para el paciente. Oportunamente se le informarán los resultados del estudio.

¿Qué se me pedirá que haga?
Su doctor el preguntará si usted decide que su hijo/a participe en este estudio. En caso de aceptar, deberá concurrir con su hijo/a al Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez para el diagnóstico y seguimiento de su enfermedad al mes y a los 3 meses de la primera visita según le indique el médico tratante.

¿Qué tipo de muestra se analizará?
El análisis se realizará sobre muestras de 6ml de sangre periférica (igual a una cucharada de sopa) y de secreciones faríngeas obtenidas por hisopado.

¿En qué momento se tomará la muestra?
Se utilizará parte de la muestra de sangre que le extraigan a su hijo/a cuando venga a hacerse el diagnóstico y los controles de rutina de su infección. También se tomará con cada muestra de sangre una muestra de secreciones faríngeas obtenidas por hisopado.

¿Cómo se tomarán las muestras?
Se realizará una extracción de sangre de la vena y con un hisopo se tomará por hisopado una muestra de secreciones de la garganta.

¿Qué pasa si decido no participar?
Si usted decide que su hijo/a no participe en este estudio, se le seguirán haciendo las extracciones de sangre para los controles de la enfermedad, sin afectar la atención de su hijo/a en esta institución. No se incluirá la muestra de sangre para este estudio.

¿Para qué se realiza este estudio?
Para conocer más datos acerca de la enfermedad de su hijo/a y posteriormente poder aplicarlos a la atención de su hijo/a y de los otros niños/as que lo requieran. Los resultados obtenidos en el presente estudio no modificarán EN ABSOLUTO el diagnóstico o tratamiento de su enfermedad, solamente se utilizarán como información.

¿Quiénes más participarán del estudio?
Participarán otros niños/as con infección por el virus de Epstein Barr que concurran al Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

¿La información recogida es confidencial?
Si usted consiente en formar parte de este estudio, cualquier registro médico correspondiente podrá ser leído por los investigadores o los Comités de Ética y de Investigación y Docencia para controlar que el mismo sea llevado a cabo correctamente. Mediante la firma del formulario de Consentimiento Informado Escrito, usted está autorizando para que esto se pueda realizar. La información recogida durante el estudio será almacenada en una computadora, pero el nombre del paciente no aparecerá en ninguno de los registros. Sólo su médico conocerá qué información está relacionada con el paciente. Los resultados del estudio pueden ser publicados en la literatura médica, pero la identidad de los pacientes no será revelada.

He leído y entiendo este consentimiento informado. Acepto voluntariamente participar de este estudio. Entiendo que debo concurrir con mi hijo/a al Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez para el diagnóstico y seguimiento de su enfermedad al mes y a los 3 meses de la primera visita según me indique el médico tratante, que se le sacará una muestra de sangre igual a una cucharada de sopa y una muestra con un hisopo de la garganta.

Nombre del paciente

Firma del padre, madre o tutor / Aclaración / Número y Tipo de Documento / Fecha

Firma del médico / Aclaración / Número y Tipo de Documento / Fecha

Firma del testigo / Aclaración / Número y Tipo de Documento / Fecha

APÉNDICE D

Modelo de asentimiento firmado por aquellos pacientes mayores de siete años que decidieron participar voluntariamente en este estudio.

Asentimiento

"Caracterización de las variantes circulantes del virus de Epstein Barr en pacientes pediátricos."

Te invitamos a participar de un trabajo de investigación para estudiar la infección por el virus de Epstein Barr en niños. Este estudio se hace para saber un poco más de la enfermedad que tenés. De este estudio participarán también otros niños y niñas que están infectados por el virus de Epstein Barr y que se atienden en este Hospital.

Si querés, podés participar de este estudio. Si no querés, esto no te traerá ningún problema y te van a seguir atendiendo en este hospital como hasta ahora. Además, podés dejar de participar cuando quieras.

Para este estudio, lo único que tendrás que hacer es venir al Hospital como siempre. Cuando el médico te diga, te van a sacar un poco de sangre del brazo (como una cuchara de sopa) para hacer algunos análisis, y esa misma sangre se va a usar también en el laboratorio para este estudio.

Este estudio es confidencial. Por eso, tu nombre no va a figurar en ningún lado. Los datos serán almacenados en una computadora y solamente el médico que te atiende conocerá tu nombre.

Nombre del paciente

APÉNDICE E

En la tabla E1 se detallan los números de acceso de *GenBank* a las secuencias de nucleótidos de la región promotora del gen BZLF1 correspondientes a las distintas muestras de cada paciente con MNI.

Tabla E1. Número de acceso a secuencias de la región promotora del gen BZLF1 en *GenBank*

Paciente	***Muestra***	***N° de acceso***		
		D0	***D30***	***D90***
MNI 1	CMSP	FJ756491	FJ756493	FJ756495
	SF	FJ756490	FJ756492	FJ756494
MNI 2	CMSP	FJ756497	No env.	No env.
	SF	FJ756496	No env.	No env.
MNI 3	CMSP	FJ756499	No env.	No env.
	SF	FJ756498	No env.	No env.
MNI 4	CMSP	FJ756501	FJ756503	FJ756505
	SF	FJ756500	FJ756502	FJ756504
MNI 5	CMSP	FJ756507	FJ756509	FJ756511
	SF	FJ756506	FJ756508	FJ756510
MNI 6	CMSP	FJ756513	FJ756515	No env.
	SF	FJ756512	FJ756514	No env.
MNI 7	CMSP	FJ756517	FJ756519	FJ756521
	SF	FJ756516	FJ756518	FJ756520
MNI 8	CMSP	FJ756523	FJ756525	FJ756527
	SF	FJ756522	FJ756524	FJ756526
MNI 9	CMSP	FJ756529	No env.	No env.
	SF	FJ756528	No env.	No env.
MNI 10	CMSP	FJ756531	FJ756533	FJ756535
	SF	FJ756530	FJ756532	FJ756534
MNI 11	CMSP	JN986898	JN986900	JN986902
	SF	JN986897	JN986899	JN986901
MNI 12	CMSP	JN986904	JN986906	JN986908
	SF	JN986903	JN986905	JN986907
MNI 13	CMSP	JN986910	JN986912	JN986914
	SF	JN986909	JN986911	JN986913
MNI 14	CMSP	JN986915	JN986917	JN986919
	SF	No env.	JN986916	JN986918
MNI 15	CMSP	JN986921	JN986923	No env.
	SF	JN986920	JN986922	No env.

Abreviaturas: CMSP: células mononucleares de sangre periférica; SF: secreciones faríngeas.
No env.: no enviado a *GenBank*.

En la tabla E2 se detallan los números de acceso de *GenBank* a las secuencias de nucleótidos de la región promotora del gen BZLF1 correspondientes a las distintas muestras de cada paciente con linfomas EBV+.

Tabla E2. Número de acceso a secuencias de la región promotora del gen BZLF1 en *GenBank*

Paciente	***Muestra***	***N° de acceso***
T1	Biopsia GL	FJ756544
T2	Biopsia GL	FJ756545
T3	Biopsia GL	FJ756536
T4	Biopsia GL	FJ756539
T5	Biopsia GL	FJ756543
T6	Biopsia GL	FJ756542
T7	Biopsia GL	FJ756537
T8	Biopsia GL	FJ756540
T9	Biopsia GL	FJ756541
T10	Biopsia GL	FJ756546
T11	Biopsia GL	FJ756548
T12	Biopsia GL	FJ756538
T13	Biopsia GL	FJ756547
T14	Biopsia GL	JN986924
T15	Biopsia GL	JN986925
T16	Biopsia GL	JN986926
T17	Biopsia GL	JN986927
T18	Biopsia GL	JN986928
T19	Biopsia GL	JN986929
T20	Biopsia GL	JN986930

Abreviaturas: GL: ganglio linfático; No env.: no enviado a *GenBank*.

APÉNDICE F

En la tabla F1 se detallan los números de acceso de *GenBank* a las secuencias de nucleótidos del gen BKRF1 correspondiente a la región que codifica el extremo C-ter de EBNA1 para las distintas muestras de cada paciente con MNI.

Tabla F1. Número de acceso a secuencias de la región C-ter del gen BKRF1 en *GenBank*

Paciente	***Muestra***	***N° de acceso***		
		D0	***D30***	***D90***
MNI 1	CMSP	GU475385	GU475387	GU475389
	SF	GU475384	GU475386	GU475388
MNI 2	CMSP	GU475391	No env.	No env.
	SF	GU475390	No env.	No env.
MNI 3	CMSP	GU475393	No env.	No env.
	SF	GU475392	No env.	No env.
MNI 4	CMSP	GU475395	GU475397	GU475399
	SF	GU475394	GU475396	GU475398
MNI 5	CMSP	GU475401	GU475403	GU475405
	SF	GU475400	GU475402	GU475404
MNI 6	CMSP	GU475407	GU475409	GU475411
	SF	GU475406	GU475408	GU475410
MNI 7	CMSP	GU475413	GU475415	GU475417
	SF	GU475412	GU475414	GU475416
MNI 8	CMSP	GU475419	GU475421	GU475423
	SF	GU475418	GU475420	GU475422
MNI 9	CMSP	GU475425	No env.	No env.
	SF	GU475424	No env.	No env.
MNI 10	CMSP	GU475427	GU475429	GU475431
	SF	GU475426	GU475428	GU475430
MNI 11	CMSP	GU475433	GU475435	GU475437
	SF	GU475432	GU475434	GU475436
MNI 12	CMSP	JN986932	JN986934	JN986936
	SF	JN986931	JN986933	JN986935
MNI 13	CMSP	JN986938	JN986940	JN986942
	SF	JN986937	JN986939	JN986941
MNI 14	CMSP	JN986943	JN986945	JN986947
	SF	No env.	JN986944	JN986946
MNI 15	CMSP	JN986949	JN986951	No env.
	SF	JN986948	JN986950	No env.

Abreviaturas: CMSP: células mononucleares de sangre periférica; SF: secreciones faríngeas.

No env.: no enviado a *GenBank.*

En la tabla F2 se detallan los números de acceso de *GenBank* a las secuencias de nucleótidos del gen BKRF1 correspondiente a la región que codifica el extremo C-ter de EBNA1 para las distintas muestras de cada paciente con Linfomas EBV+.

Tabla F2. Número de acceso a secuencias de la región C-ter del gen BKRF1 en *GenBank*

Paciente	***Muestra***	***N° de acceso***
T1	Biopsia GL	GU475438
T2	Biopsia GL	GU475439
T3	Biopsia GL	GU475440
T4	Biopsia GL	GU475441
T5	Biopsia GL	GU475442
T6	Biopsia GL	GU475443
T7	Biopsia GL	GU475444
T8	Biopsia GL	GU475445
T9	Biopsia GL	GU475446
T10	Biopsia GL	GU475447
T11	Biopsia GL	GU475448
T12	Biopsia GL	GU475449
T13	Biopsia GL	GU475450
T14	Biopsia GL	GU475451
T15	Biopsia GL	GU475452
T16	Biopsia GL	GU475453
T17	Biopsia GL	GU475454
T18	Biopsia GL	GU475455
T19	Biopsia GL	GU475456
T20	Biopsia GL	JN986952

Abreviaturas: GL: ganglio linfático; No env.: no enviado a *GenBank*.

APÉNDICE G

En la tabla G1 se detallan los números de acceso de *GenBank* a las secuencias de nucleótidos del gen BNLF1 correspondiente a la región que codifica el extremo C-ter de LMP1 para las distintas muestras de cada paciente con MNI.

Tabla G1. Número de acceso a secuencias de la región C-ter del gen BNLF1 en *GenBank*

Paciente	*Muestra*	*N° de acceso*		
		D0	*D30*	*D90*
MNI 1	CMSP	JN820220	JN820222	JN820224
	SF	JN820221	JN820223	JN820225
MNI 2	CMSP	JN820226	No env.	No env.
	SF	JN820227	No env.	No env.
MNI 3	CMSP	JN820228	No env.	No env.
	SF	JN820229	No env.	No env.
MNI 4	CMSP	JN820230	JN820232	JN820234
	SF	JN820231	JN820233	JN820235
MNI 5	CMSP	JN820236	JN820238	JN820240
	SF	JN820237	JN820239	JN820241
MNI 6	CMSP	JN820242	JN820244	JN820246
	SF	JN820243	JN820245	JN820247
MNI 7	CMSP	JN820248	JN820250	JN820252
	SF	JN820249	JN820251	JN820253
MNI 8	CMSP	JN820254	JN820256	JN820258
	SF	JN820255	JN820257	JN820259
MNI 9	CMSP	JN820260	No env.	No env.
	SF	JN820261	No env.	No env.
MNI 10	CMSP	JN820262	JN820264	JN820266
	SF	JN820263	JN820265	JN820267
MNI 11	CMSP	JN820268	JN820270	JN820272
	SF	JN820269	JN820271	JN820273
MNI 12	CMSP	JN820274	JN820276	JN820278
	SF	JN820275	JN820277	JN820279
MNI 13	CMSP	JN820280	JN820282	JN820284
	SF	JN820281	JN820283	JN820285
MNI 14	CMSP	JN820286	JN820287	JN820289
	SF	No env.	JN820288	JN820290
MNI 15	CMSP	JN820291	JN820293	No env.
	SF	JN820292	JN820294	No env.

Abreviaturas: CMSP: células mononucleares de sangre periférica; SF: secreciones faríngeas.
No env.: no enviado a *GenBank*.

En la tabla G2 se detallan los números de acceso de *GenBank* a las secuencias de nucleótidos del gen BNLF1 correspondiente a la región que codifica el extremo C-ter de LMP1 para las distintas muestras de cada paciente con linfomas EBV+.

Tabla G2. Número de acceso a secuencias de la región C-ter del gen BNLF1 en *GenBank*

Paciente	***Muestra***	***N° de acceso***
T1	Biopsia GL	JN820295
T2	Biopsia GL	JN820296
T3	Biopsia GL	JN820297
T4	Biopsia GL	JN820298
T5	Biopsia GL	JN820299
T6	Biopsia GL	JN820300
T7	Biopsia GL	JN820301
T8	Biopsia GL	JN820302
T9	Biopsia GL	JN820303
T10	Biopsia GL	JN820304
T11	Biopsia GL	JN820305
T12	Biopsia GL	JN820306
T13	Biopsia GL	JN820307
T14	Biopsia GL	JN820308
T15	Biopsia GL	JN820309
T16	Biopsia GL	JN820310
T17	Biopsia GL	JN820311
T18	Biopsia GL	JN820312
T19	Biopsia GL	JN820313
T20	Biopsia GL	JN820314

Abreviaturas: GL: ganglio linfático; No env.: no enviado a *GenBank*

APÉNDICE H

En la tabla H se detallan los patrones de sustituciones características que permiten definir a las variantes de LMP1.

Tabla H: Sustituciones nucleotídicas y de aa utilizadas para clasificar variantes de LMP1

Codón	*Cambio de nucleótido*	*Cambio de aa*	*Variante*						
			China 1	*Med+*	*Med-*	*China 3*	*NC*	*Alaskan*	*China 2*
209	T→C		X			X		X	X
212	G→A	Gly→Ser	X			X			X
227	C→T							X	
229	G→C	Ser→Thr		X	X				
230	A→G		X			X			
232	G→C	Gly→Ala						X	
245	C→A	Pro→His							X
250-298	Repetición de 33 pb			Número variable de rep33 e ins15					
252	G→A	Gly→Asp							X
306	T→A	Leu→Gln					X		
309	G→A	Ser→Asn	X	X	X		X	X	X
312	G→A	Asp→Asn						X	
313	(1) T→G	Ser→Ala						X	
313	(1) T→C	Ser→Pro					X		
320	T→G								X
322	(1) C→A	Gln→Asn	X				X	X	
322	(1) C→G	Gln→Lys		X	X				
322	(2) A→C	Gln→Thr					X		
322	(3) A→T	Gln→Lys	X						
331	(1) G→C	Gly→Gln					X		X
331	(2) G→A	Gly→Gln					X		X
331	(2) G→C	Gly→Ala						X	
334	A→G	Gln→Arg	X	X	X				
338	(1)T→C	Leu→Pro					X	X	X
338	(2) T→C	Leu→ser	X	X	X	X	X	X	X
342	A→T		X	X	X	X	X	X	X
344	G→A	Gly→Asp							X
345	G→A	Gly→Ser						X	
343-352	Deleción de 30 pb		X	X		X			
352	(1) C→A	His→Asn					X		
352	(2) A→G	His→Arg			X				
354	G→A	Gly→Asp						X	
355	G→T	Gly→Val						X	X
358	A→C	His→Pro					X		
361	G→A/C			X	X				
366	G→A/C	Ser→Thr	X	X	X	X			X

Nota: (1): cambio en la primer posición nucleotídica del codón

(2): cambio en la segunda posición nucleotídica del codón

(3): cambio en la tercer posición nucleotídica del codón