

SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS ASOCIADOS AL VIRUS DE EPSTEIN-BARR

José Luis Mate¹, Josep Tomas Navarro², Águeda Hernández³ y Vicenç Ausina³

Servicio de Anatomía Patológica¹, Institut Català d'Oncologia² y Servicio de Microbiología³. Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona

El virus de Epstein-Barr (VEB) es un gammaherpesvirus del género *Lymphocryptovirus*, potencialmente oncogénico y asociado a procesos epitelio-linfoproliferativos. Como en otros herpesvirus, las partículas del VEB están formadas por un core, una cápside, un tegumento o matriz y una envoltura rica en glucoproteínas. El genoma está constituido por una doble cadena de DNA lineal de 174 kb en las partículas virales (figura 1) y en forma de episoma (DNA circular o no integrado) en el interior del núcleo de las células infectadas. El DNA vírico posee dos secciones, una larga (UL) y otra corta (US), flanqueadas cada una de ellas por una región terminal repetitiva denominada TR y zonas de repetición interna (IR) (figura 1). Las regiones U3 y U5 de la sección UL del genoma permiten al virus realizar su replicación en la infección lítica. En cambio, el mantenimiento del episoma y de la replicación en la infección latente se debe a la región oriP de la zona denominada U1 de US.

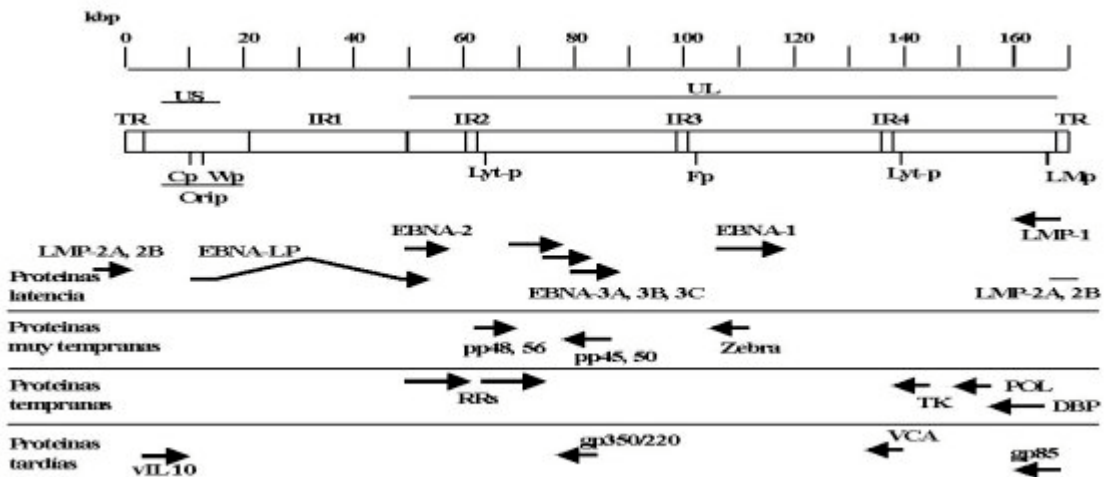


Figura 1. Representación esquemática del genoma del VEB

Más del 90% de la población adulta mundial está infectada por el VEB y el 70% de la misma se infecta antes de los 30 años. Usualmente, la primoinfección ocurre durante la infancia y por lo general es asintomática. Cuando ésta ocurre durante la adolescencia se manifiesta, en la mitad de los casos, como mononucleosis infecciosa. La infección se adquiere generalmente por transmisión oral (saliva), al colonizar las células del epitelio nasofaríngeo donde el virus establece su ciclo lítico de replicación. El virus se une a las células a través de la interacción de la gp350/220 de su envoltura con el receptor celular CD21. Con la producción de nuevos viriones, se infectan las células contiguas. Durante esta fase el VEB infecta a los linfocitos B, proliferando en sangre periférica y nódulos linfáticos. Posteriormente, el VEB es capaz de producir una infección latente, fundamentalmente en los linfocitos B, aunque las células basales del epitelio nasofaríngeo y algunos linfocitos de tipo T también pueden albergar las formas latentes del virus. En el ciclo lítico se produce

replicación, síntesis proteica y génesis de nuevos viriones, mientras que en la fase de latencia se producen sólo algunas proteínas y no se desarrollan viriones.

En ambos ciclos, lítico y latente, se sintetizan gran variedad de proteínas cuyo conocimiento es básico para comprender su papel en la patogenia del virus y su utilidad en las pruebas diagnósticas. Durante la fase latente se produce gran cantidad de RNA nuclear no codificante (EBER1 y 2), seis antígenos nucleares (EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C y LP) y tres proteínas de membrana (LMP1, 2A y 2B). En cambio, en las fases líticas se expresan unas 90 proteínas, entre las que se sintetizan los antígenos precoces (EA) y los antígenos tardíos de la cápside del virus (VCA). Las diferencias entre los genes que codifican las proteínas EBNA 2, 3A y 3C permiten distinguir los dos subtipos del virus, denominados VEB 1 y 2.

La persistencia del VEB en los linfocitos B o tejidos infectados en la fase de latencia se ve favorecida por el limitado número de proteínas que se sintetizan, reduciéndose las posibilidades de reconocimiento por parte de las células T citotóxicas, eludiendo con esta estrategia la respuesta inmune. Además, el virus inhibe los mecanismos de apoptosis en los linfocitos infectados gracias a la proteína vírica codificada por el gen BHFR1 y la acción de la LMP1. De esta manera, el VEB garantiza la supervivencia de las células infectadas y por ende la suya propia. Finalmente, las proteínas codificadas por los genes BCRF1 y BARF1 inhiben la síntesis de alfa y gamma interferones, bloqueando el efecto inhibitor de éstos sobre la replicación de las células infectadas por el virus.

Con la aparición de la inmunidad específica contra el virus, el número de células B infectadas por éste es regulado principalmente por los linfocitos T citotóxicos y se mantiene en aproximadamente unos 100.000 linfocitos B. En algunos individuos, la inmunidad no es suficiente para regular este número de células infectadas, dando lugar a una infección crónica activa por el VEB. En una minoría de pacientes, las células infectadas por este virus proliferan causando procesos linfoproliferativos y neoplasias epiteliales.

SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS

Existen numerosas evidencias epidemiológicas que asocian la infección por el VEB con tumores malignos, particularmente linfomas, algunos de los cuales ocurren en pacientes inmunodeprimidos. Se comprende mejor el papel oncogénico del VEB cuando se comprueba la capacidad que tiene de infectar y transformar a los linfocitos B *in vitro* produciendo su immortalización, de manera que se generan las denominadas líneas celulares linfoblastoides. Se ha podido comprobar que algunos de los productos de latencia participan en la transformación mediada por el virus, aunque no se conocen por completo qué mecanismos moleculares utilizan. Ya se ha comentado el papel de LMP1 en la inhibición de la apoptosis. LMP1 y EBNA2 son además capaces de estimular de forma indirecta la proliferación celular.

Cualquier linfoma se puede asociar al VEB. No obstante, en determinados tipos histológicos su presencia es más constante, por lo que se cree que interviene de algún modo en su etiopatogenia. Es probable que en la mayoría de casos intervenga como un cofactor en las etapas más iniciales de la génesis de los linfomas. En los linfomas en que se demuestra infección por el VEB es factible identificar la presencia de las proteínas de latencia con técnicas de inmunohistoquímica. Los productos de latencia no se expresan de forma constante, de tal manera que se producen determinados patrones que se asocian con mayor frecuencia a procesos linfoproliferativos concretos. Se han caracterizado tres patrones de expresión de productos de latencia (tabla 1). El tipo I se halla en los linfocitos circulantes infectados de individuos sanos y también es característico del linfoma de Burkitt (LB). El patrón de latencia de tipo II es característico del linfoma de Hodgkin (LH) y del carcinoma nasofaríngeo. El tipo III incluye todos los genes de expresión de latencia del virus y se halla en las líneas celulares linfoblastoides y en los procesos linfoproliferativos postrasplante.

Tabla 1. Patrones de latencia del VEB

	Latencia		
	I	II	III
EBER	+	+	+
EBNA1	+	+	+
EBNA2	-	-	+
LMP1	-	+	+
LMP2	-	-	+

Linfoma de Hodgkin

El LH se caracteriza por la proliferación de una minoría de células neoplásicas (células de Reed-Sternberg-Hodgkin, RSH) en un medio celular reactivo que constituye la mayoría del tumor. El porcentaje de casos en que se demuestra la presencia del VEB en el componente neoplásico de los LH es muy variable, oscilando entre el 40-70%. La prevalencia de positividad del VEB en las células de RSH varía según el subtipo histológico y los factores epidemiológicos. La frecuencia más elevada (75%) se encuentra en la celularidad mixta y la incidencia más baja (10-40%) en la esclerosis nodular.

En la población de regiones subdesarrolladas y en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) la infección por el VEB es casi del 100%. El tipo de VEB también varía según las áreas geográficas. En países desarrollados predomina el tipo 1, mientras que en los subdesarrollados predomina el 2. El LH que es positivo para el VEB en el diagnóstico lo es también en la recaída, con persistencia de la misma cepa. Las células RSH infectadas por el virus expresan LMP1 y EBNA1 siendo negativo EBNA2. Es posible que LMP1 intervenga en la activación de las vías de señalización que alteran los mecanismos de apoptosis, tales como NF- κ B. En algunos LH que no contienen el VEB se ha demostrado la existencia de mutaciones en los sistemas inhibidores de NF- κ B, por lo que se obtendría una alteración similar a la inducida por el VEB.

Linfoma de Burkitt

El LB es un linfoma altamente agresivo que se suele presentar en localizaciones extraganglionares o leucemizado. Desde el punto de vista epidemiológico se distinguen tres formas de presentación:

- LB endémico. Aparece en África ecuatorial y Papúa-Nueva Guinea, donde representa la enfermedad maligna más frecuente en la infancia. La mayoría de los casos de LB endémico se asocian al VEB. La mandíbula y otros huesos de la cara son el lugar de presentación en el 50% de los casos.
- LB esporádico. Esta variante no tiene ninguna predilección geográfica, afectando a enfermos de todo el mundo. La incidencia es baja y supone entre el 1-2% de todos los linfomas. Constituye, no obstante, el 30-50% de todos los linfomas en la infancia. La mayoría de casos se presentan en forma de masas abdominales. Tan sólo en un 15-20% de los casos se demuestra la presencia del VEB.
- LB asociado a inmunodeficiencia. En esta variedad, la localización ganglionar es frecuente, así como la infiltración de la médula ósea. Se demuestra el VEB en tejido tumoral en el 25-40% de los casos.

La traslocación genética que implica la activación del oncogen *c-myc* es un hallazgo constante en todas las variedades epidemiológicas y probablemente explica buena parte de las alteraciones celulares de este tipo de linfoma. Las células neoplásicas del LB asociado al VEB sólo expresan EBNA1 y EBER, es decir, un patrón de latencia tipo I. Puede resultar

paradójico comprobar cómo un linfoma tan agresivo como el LB parece no servirse de dos de los productos de latencia con mayor actividad linfoproliferativa, como son LMP1 y EBNA2. Es muy probable que las células del LB no precisen de la colaboración de esos productos del VEB, ya que la acción de oncogén *c-myc* es suficientemente poderosa. Por otro lado, la ausencia de LMP y EBNA en las células tumorales del LB les permite esquivar la acción de los linfocitos T citotóxicos. En las líneas celulares de LB que expresan un patrón de latencia del tipo I se ha podido comprobar una mayor resistencia a la acción de los linfocitos T citotóxicos, mientras que las que expresan un patrón de latencia tipo III son más sensibles a la lisis mediada por los linfocitos T.

Linfomas asociados a una inmunodeficiencia

Tanto los procesos linfoproliferativos asociados al trasplante de órganos como los linfomas que aparecen en la infección por el VIH están estrechamente relacionados con el VEB.

Linfomas asociados a la infección por el VIH

El espectro actual de los linfomas no Hodgkin (LNH) asociados a la infección por el VIH está constituido por linfomas sistémicos y linfomas primarios del sistema nervioso central (LPSNC). Los primeros incluyen el linfoma B difuso de célula grande (LBDCG), el LB, el linfoma primario de cavidades (LPC) y el linfoma plasmablástico de la cavidad oral.

Los linfomas sistémicos que se desarrollan en pacientes infectados por el VIH son predominantemente linfomas de células B de características clínicas agresivas. Es habitual la presentación extraganglionar, el diagnóstico en estadios avanzados y con frecuente presencia de signos de afección sistémica. Los linfomas B difusos de células grandes están constituidos exclusivamente por células blásticas. Se distinguen dentro de esta categoría algunas variedades morfológicas sin que ello tenga implicaciones pronósticas o terapéuticas. En aproximadamente el 90% de casos se demuestra la presencia de productos de la infección del VEB, tales como LMP1.

En el caso del LPC se trata de un linfoma asociado al herpesvirus humano 8 (HHV-8), en el que la presencia de VEB es constante y que se manifiesta en forma de derrames neoplásicos en cavidades serosas sin masas tumorales, aunque ya se han descrito varios casos con manifestación tumoral exclusiva. Las células de los LPC muestran gran pleomorfismo y diferenciación plasmocítica, tanto en su morfología como en el inmunofenotipo. Para realizar el diagnóstico de LPC es imprescindible demostrar la infección del linfoma por el HHV8. La presencia de VEB es también constante. Los linfomas plasmablásticos se localizan principalmente en la cavidad oral. En la mayoría de casos se presentan en forma localizada, aunque pueden diseminarse al abdomen, retroperitoneo y médula ósea. Al igual que el LPC, es muy característica la diferenciación plasmocelular. El VEB está presente en más del 50% de casos.

En la época previa al tratamiento antirretroviral de gran actividad, los LPSNC suponían el 10-20% de los linfomas asociados al sida. Con la generalización de estos tratamientos se ha evidenciado un descenso significativo de este tipo de linfomas. La mayoría de los pacientes se encuentran muy inmunodeprimidos, con cifras de linfocitos CD4 muy bajas (<200 células/mm³). Los LPSNC son tumores limitados al sistema nervioso central que aparecen localizados generalmente en un hemisferio cerebral, aunque también pueden aparecer en el cerebelo, ganglios de la base y tronco cerebral. El tamaño de estos tumores suele ser superior a 3 cm. Se trata de linfomas de células B de célula grande que, de una manera constante, expresan marcadores de infección por el VEB.

Síndromes linfoproliferativos postrasplante

Se conoce como síndrome linfoproliferativo postrasplante (SLPT) a un espectro de

lesiones que abarca desde la proliferación linfoide atípica a un verdadero linfoma, que se produce como consecuencia de la inmunodepresión en receptores de órgano sólido o de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Los SLPT incluyen las siguientes entidades: a) lesiones precoces (*early lesions*): hiperplasia plasmocítica reactiva y SLPT similares a mononucleosis infecciosa; b) SLPT polimórfico; c) SLPT monomórfico; y d) linfoma de Hodgkin. La mayoría de SLPT están asociados al VEB y corresponden a proliferaciones clonales de células B o, con menor frecuencia, policlonales. El patrón de expresión de los productos de latencia es del tipo III, similar al de las líneas celulares linfoblastoides obtenidas *in vitro*. No obstante, se han descrito ocasionalmente patrones de latencia de los tipos I y II.

Las características clínicas de los SLPT son variables y dependen del tipo de inmunodepresión, del órgano trasplantado y del tipo morfológico. En los pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido la incidencia de SLPT es del 1 al 30%, dependiendo del tipo de trasplante y de la edad del paciente. En la población pediátrica sometida a trasplante de hígado, la incidencia es del 10%, con una mortalidad del 60% y con una alta morbilidad que incluye la pérdida del órgano trasplantado.

En aproximadamente el 20% de todos los SLPT no se demuestra ninguna asociación con el VEB. En el contexto del trasplante renal, hasta en la mitad de los SLPT no se demuestra presencia del virus. La mayoría de los linfomas que no albergan el virus se diagnostican cuando han pasado más de cinco años desde el trasplante renal. Curiosamente, estos SLPT no asociados al VEB también se benefician de la disminución de los tratamientos inmunosupresores.

Granulomatosis linfomatoide

Es un síndrome linfoproliferativo heterogéneo angiodestructivo que se localiza habitualmente en pulmón. Está formado por linfocitos B que contienen el VEB entremezclados con células T reactivas. La granulomatosis linfomatoide puede progresar a un LBDCG. Es una enfermedad rara que se suele presentar en adultos, con frecuencia varones. Los pacientes suelen consultar por sintomatología respiratoria acompañada de síntomas sistémicos. Los pacientes inmunodeprimidos tienen un riesgo mayor de padecer este síndrome linfoproliferativo. Las células linfoides neoplásicas contienen el VEB. En función del número de células positivas para este virus por hibridación *in situ* se distinguen tres grados de granulomatosis. Las células neoplásicas suelen expresar LMP1 en la membrana celular.

Linfomas T periféricos y de células T/NK

El 40% de los linfomas T periféricos contiene algunas células infectadas por el VEB, que expresan los EBER y LMP1. Característicamente, en estos linfomas sólo una pequeña proporción de las células neoplásicas está infectada por el virus. El linfoma T/NK extraganglionar de tipo nasal se asocia estrechamente con el VEB. El hecho de que en este tipo de procesos linfoproliferativos se detecte infección clonal y se observe expresión de LMP1 en algunas células neoplásicas sugiere que el VEB puede tener un papel patogénico precoz. Se caracteriza por un infiltrado angiodestructivo con necrosis tisular asociada. Este linfoma tiene una mayor prevalencia en Asia, México, América Central y Sudamérica. Se suele localizar en la cavidad nasal, nasofaringe, paladar, tejidos blandos, tracto gastrointestinal y testículos.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LAS NEOPLASIAS ASOCIADAS AL VEB

La detección del VEB en laboratorio puede abordarse desde distintos enfoques (tabla 2), pero los avances más importantes en los últimos años han sido debidos al análisis molecular de los ácidos nucleicos. En tejidos, la detección molecular de RNA derivados del

VEB mediante hibridación *in situ* se considera la técnica de referencia para determinar si las lesiones histopatológicas contienen el virus. La hibridación *in situ* de EBER y la inmunohistoquímica de LMP1 son las técnicas rutinarias para detectar la infección latente por VEB en los tejidos afectados por SLPT. La carga vírica del VEB en sangre se considera actualmente una técnica de gran valor para la evaluación clínica de los pacientes con riesgo de adquisición de una neoplasia asociada a este virus. A continuación se detallan algunas características metodológicas de las pruebas más útiles para establecer el estado de síndrome linfoproliferativo asociado a la infección por el VEB.

Tabla 2. Técnicas para la detección del VEB.

Técnica	Utilidad
Hibridación <i>in situ</i>	Identificación de RNA EBER o DNA del VEB en tipos celulares específicos con lesiones histológicas.
Ensayo de clonalidad del VEB mediante análisis por <i>southern blot</i>	Evaluación de la clonalidad de las lesiones con respecto a la estructura del DNA del VEB. Diferenciar la infección latente de la replicativa basándose en la estructura del genoma.
Amplificación del DNA del VEB	Detección de DNA viral en tejidos.
Carga vírica del VEB	Cuantificación de DNA del VEB en sangre o fluidos corporales para monitorizar la enfermedad a lo largo del tiempo.
Inmunohistoquímica (LMP1 y 2A, EBNA 1 y 2)	Identificación de las proteínas de expresión del VEB en tipos celulares específicos y con lesiones histológicas.
Microscopía electrónica	Identificación de viriones completos presentes en la infección lítica. No es práctico para uso habitual.
Serología (anticuerpos frente al VCA, EBNA, EA y heterófilos)	Medir la respuesta de anticuerpos a las proteínas víricas. Permite distinguir entre infección aguda y crónica.
Cultivo de VEB o de linfocitos B infectados por VEB	Detección y medición semicuantitativa de los viriones infecciosos. No es práctico para uso rutinario. Prueba compleja, laboriosa y de escaso coste-beneficio.

Hibridación *in situ*

Como se ha comentado con anterioridad, es una técnica de referencia para detectar la infección latente del VEB en los tejidos. También puede aplicarse en tejidos parafinados y preparaciones citológicas. Actualmente, los protocolos para hibridación de los EBER utilizan distintas sondas: oligonucleótidos para DNA, sondas para RNA (ribosondas) y sondas para ácidos nucleicos. Estas sondas pueden estar marcadas con biotina, digoxigenina, fluoresceína, etc. Aunque la transcripción de los EBER es abundante en las células con infección latente, pueden darse resultados falsos negativos por la degradación del RNA. La utilización de controles de hibridación disminuye este problema. En la práctica, la detección de DNA del virus es poco utilizada, excepto en situaciones en las que el RNA esté degradado; en estos casos se emplean sondas dirigidas contra la secuencia *BamHIW*, una región repetida del genoma del virus que permite una mayor sensibilidad en la detección cualitativa del virus.

En general, en todas las células neoplásicas asociadas al VEB, incluyendo carcinomas, sarcomas y linfomas se observa positividad para los EBER, mientras que éstos

están ausentes en las células normales adyacentes. Una vez identificado el tumor en el paciente y su asociación con el virus, los EBER pueden usarse como marcadores de recurrencia de la enfermedad.

Southern blot

El análisis por *southern blot* se utiliza para determinar la clonalidad de los tejidos infectados por el VEB con respecto a la estructura del genoma vírico. La técnica se basa en la presencia de un número variable de secuencias de repetición terminales presentes en el extremo de cada molécula de DNA lineal. En las células infectadas, los extremos TR del genoma se unen para formar el episoma. Para realizar esta prueba, el DNA de la zona de la lesión se digiere con enzimas de restricción. Después de la electroforesis y transferencia, se añade una sonda marcada para detectar los fragmentos que contienen las zonas terminales repetidas. Los patrones de bandas que se observan en la electroforesis pueden ser monoclonales, oligoclonales y policlonales. En los tumores monoclonales se detecta una única banda de elevado peso molecular, mientras que en los policlonales se observan varias bandas. En los pacientes inmunodeprimidos los tumores oligoclonales y policlonales tienen mejor pronóstico.

Serología

La determinación de anticuerpos frente al VEB es de gran utilidad en los pacientes inmunocompetentes para el diagnóstico de la fase aguda y crónica. Se emplean anticuerpos dirigidos contra distintos antígenos expresados durante el ciclo lítico o de latencia para distinguir las diferentes fases de la infección (tabla 3). En los pacientes inmunodeprimidos, la interpretación de los resultados serológicos para el diagnóstico de reactivación es difícil y compleja, debido a la escasa o nula producción de anticuerpos. En los pacientes con tumores asociados al VEB se observa una elevación de los títulos de anticuerpos IgG anti-EA y anti-VCA, con disminución de los títulos anti-EBNA. Sin embargo, este patrón no es uniforme. Así, los pacientes con carcinoma nasofaríngeo, una forma de neoplasia muy frecuente en ciertas regiones de China, poseen títulos elevados frente a varios antígenos víricos, especialmente de IgA anti-VCA. Por ello, se considera que la serología no es útil para el diagnóstico de SLPT y se recomienda el empleo de otras técnicas, como la detección de DNA del VEB mediante carga vírica para evaluar las reactivaciones en pacientes inmunodeprimidos y correlacionar los resultados con las manifestaciones clínicas.

Tabla 3. Marcadores serológicos de la infección por el VEB.

	IgM VCA	IgG anti-VCA	IgG anti-EA	IgG antiEBNA
No infectados	–	–	–	–
Primoinfección	+	+	+/-	–
Infección pasada	–	+	+/-	++
Reactivación	+/-	++	++	+/-

Amplificación del DNA del VEB

La amplificación de zonas conservadas del genoma del VEB para detectar la infección vírica en diversas muestras clínicas como tejidos, sangre, saliva, etc. ha sido empleada desde hace algún tiempo para relacionar esta infección con diversas situaciones clínicas. Sin embargo, se ha observado la presencia de DNA del VEB en linfocitos de individuos sanos, por lo que la detección cualitativa del virus en sangre no permite distinguir entre infección crónica y reactivación. La cuantificación del DNA se muestra una técnica más útil. En tejidos la situación es similar, por ello se utiliza la hibridación *in situ* de los EBER en lugar de la amplificación mediante PCR para detectar las lesiones asociadas al VEB en las

muestras de biopsia. Una excepción significativa a todo esto sería la detección cualitativa del DNA del VEB en líquido cefalorraquídeo en pacientes con sida, que es indicativa del linfoma primario del sistema nervioso central y no requiere la confirmación del diagnóstico con biopsia cerebral. La desaparición del DNA del virus en esta muestra biológica tras el tratamiento se asocia con una buena evolución del linfoma.

PREVENCIÓN DE LOS SLPT

En ausencia de un tratamiento específico para todas las fases de los SLPT, la estrategia óptima en los pacientes con trasplante de órgano sólido o de precursores hematopoyéticos es la prevención. Las siguientes recomendaciones están dirigidas a alcanzar este objetivo. Los pacientes que tienen un elevado riesgo de desarrollar un SLPT deben ser identificados antes del trasplante. Dado que la infección primaria por el VEB es, significativamente, el factor de mayor riesgo para el desarrollo de SLPT, es recomendable conocer el estatus serológico frente al VEB en todos los receptores potenciales de trasplante, especialmente si se trata de trasplante infantil. También se debe identificar a los pacientes seronegativos para el citomegalovirus, ya que la infección primaria por este virus también es un factor de riesgo para el desarrollo de SLPT y un cofactor de reactivación del VEB. Los niños, los receptores de intestino, los de pulmón y los pacientes que reciben elevadas dosis de inmunosupresores, especialmente de OKT3, y los que sufren rechazo del órgano trasplantado son los pacientes con mayor riesgo. Estos pacientes deberían ser monitorizados para detectar la infección por VEB.

Los fármacos antivíricos con actividad frente al VEB como el ganciclovir, preferible al aciclovir, pueden utilizarse como profilaxis para la prevención de los SLPT. Sin embargo, se ha descrito el desarrollo de estos cuadros en pacientes que recibían profilaxis con este fármaco. De igual modo, el papel de los anticuerpos neutralizantes para VEB mediante administración de inmunoglobulinas no está claro, aunque algunos resultados en modelos animales son prometedores.

La monitorización de la carga vírica del VEB (cuantificación del DNA del virus) en pacientes con elevado riesgo para el desarrollo de SLPT es una técnica prometedora y actualmente en evaluación, pero se requieren estudios que definan su relación con los SLPT para esclarecer qué aspectos son predictivos de desarrollo de SLPT y en qué momento se deben instaurar las medidas preventivas.

PAPEL DE LA CARGA VÍRICA DEL VEB EN LA PREVENCIÓN, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LOS SLPT

La determinación de la carga vírica del VEB tiene gran utilidad por sí sola, aunque debe combinarse con parámetros clínicos y otras técnicas de laboratorio adicionales. En los receptores de trasplante, la detección cualitativa del VEB generalmente no se correlaciona con la presencia de SLPT, dado que el virus puede detectarse en la sangre periférica de individuos infectados sanos en bajos niveles. En cambio, los ensayos cuantitativos permiten observar las fluctuaciones de la carga vírica en el desarrollo y regresión de esta enfermedad. Actualmente, la forma más común de determinar la carga vírica del VEB se basa en pruebas de PCR.

Inicialmente estos métodos fueron semicuantitativos y su mayor desventaja radicaba en la escasa estandarización de la metodología y la posibilidad de obtención de resultados falsos negativos por factores de inhibición de la PCR presentes en las muestras biológicas. Posteriormente, los métodos cuantitativos competitivos de PCR mejoraron la determinación de la carga vírica del VEB. La inclusión de calibradores internos para cada reacción permitió identificar los problemas de inhibición. Aunque éstos ensayos de carga vírica son reproducibles y precisos, son laboriosos, requieren una elevada manipulación durante y

después de la PCR y precisan gran número de cálculos para la obtención de los resultados. Este hecho no permite el procesamiento de un elevado número de muestras y dificulta el seguimiento de un gran número de pacientes. En cambio, la PCR cuantitativa en tiempo real, al detectar durante la amplificación la fluorescencia de los productos de PCR, requiere poca manipulación y permite el seguimiento de un mayor número de pacientes y muestras. Los sistemas *Taqman* (Applied Biosystems) y de *LightCycler* (Roche Diagnostics) son los métodos más empleados actualmente.

La gran variedad de técnicas empleadas y las diferentes dianas del genoma del VEB usadas hacen complicada la comparación de los resultados de los estudios. El tipo de ensayo de PCR empleado (por ej. semicuantitativo, cuantitativo competitivo o en tiempo real) y el método usado para la detección de los productos de amplificación (v. g., gel de agarosa, ensayo enzimático, análisis de *southern blot*, etc.) puede influir en el resultado, precisión y reproducibilidad de la determinación de la carga vírica de VEB. Así, mediante PCR en tiempo real se obtienen, generalmente, cargas víricas de VEB más altas que las obtenidas con los métodos semicuantitativos y cuantitativos competitivos. Rowe *et al.* han propuesto, para esta finalidad, la estandarización de los ensayos de PCR y el empleo de la línea celular Namalwa que contiene dos copias de VEB integradas en su genoma.

Otro aspecto muy importante se refiere a la selección de la muestra más adecuada. Actualmente, se utilizan varios tipos de muestras para los ensayos de cuantificación de DNA de VEB. Éstas incluyen la sangre total, células de sangre periférica, suero y plasma. El aislamiento de células sanguíneas es laborioso, requiere bastante cantidad de sangre y el proceso puede dañar las células. En cambio, la utilización de sangre total requiere poco volumen de muestra, siendo un argumento de peso para el seguimiento de niños y pacientes graves. Además, no requiere pasos previos a la extracción del DNA. Los niveles de carga vírica hallados en las células de sangre periférica y en sangre total, son generalmente más elevados que los hallados en plasma. La carga vírica asociada a las células sanguíneas puede persistir a elevados niveles, pero no acompañarse con la detección en plasma, o detectarse a valores bajos. No obstante, la presencia de DNA del VEB en plasma indicaría una reactivación de la infección por lo que no se detectaría en individuos sanos seropositivos para VEB. Recientemente, van Esser *et al.* han demostrado que la monitorización de la carga vírica del VEB en plasma en pacientes con TPH alogénico puede ser de gran utilidad si se emplean métodos estandarizados, al desaparecer los valores de carga vírica en plasma de forma más efectiva que en la fracción celular durante la fase de remisión de los SLPT.

BIBLIOGRAFÍA

- KNOWLES DM. Neoplastic hematopathology. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.
- JAFFE ES, HARRIS NL, STEIN H, VARDIMAN JW. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press, 2001.
- JARRETT RF, KRAJEWSKI AS, ANGUS B, *et al.* The Scotland and Newcastle epidemiological study of Hodgkin's disease: impact of histopathological review and EBV status on incidence estimates. *J Clin Pathol* 2003; 56:811-816.
- PREIKSAITIS JK, KEAY S. Diagnosis and management of posttransplant lymphoproliferative disorder in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2001; 33:S38-S46.

- ROWE DT, SMITH CA, NY CY, *et al.* Use of quantitative competitive PCR to measure Epstein-Barr virus genome load in the peripheral blood of paediatric transplant patients with lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1612-1615.
- STEVENS SC, PRONK I, MIDDELDORP JM. Toward standardization of Epstein-Barr virus DNA load monitoring: unfractionated whole blood as preferred clinical specimen. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1211-1216.
- VAN ESSER JEJ, NIESTERS HGM, THIJEN SFT, *et al.* Molecular quantification of viral load in plasma allows for fast and accurate prediction of response to therapy of Epstein-Barr virus associated lymphoproliferative disease after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Hematol* 2001; 113:814-821.
- YOUNG LS, MURRAY PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003; 22:5108-5121.