

Universidad de El Salvador  
Facultad de Ciencias Agronómicas  
Escuela de Posgrado y Educación Continua



Detección y genotipificación de Virus Epstein-Barr en biopsias  
parafinadas de linfomas Hodgkin infantil, Hospital Nacional de Niños  
Benjamín Bloom

Presentado por:

Carlos Alexander Ortega Pérez

Requisito para optar al grado académico:  
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

San Salvador, noviembre de 2025

Universidad de El Salvador  
Facultad de Ciencias Agronómicas  
Escuela de Posgrado y Educación Continua



Detección y genotipificación de Virus Epstein-Barr en biopsias  
parafinadas de linfomas Hodgkin infantil, Hospital Nacional de Niños  
Benjamín Bloom

Presentado por:

Carlos Alexander Ortega Pérez

Requisito para optar al grado académico:  
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

San Salvador, noviembre de 2025

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rector de la Universidad:

Ing. M. Sc. Juan Rosa Quintanilla

Secretario General de la Universidad:

LIC. Pedro Rosalío Escobar Castaneda

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

Decano de La Facultad:

Ing. MAECE. Nelson Bernabé Granados Alvarado

Secretario de la Facultad:

Ing. M. SC. Edgar Geovany Reyes Melara

Director de la Escuela de Posgrado y Educación Continua:

Ing. PhD. Abel Alexei Argueta Platero

F.

Asesor principal:

M. Sc. PhD. MD. Noé Rigoberto Rivera

F.

## Resumen

El virus de Epstein-Barr (VEB), conocido como el agente causante de la mononucleosis infecciosa, también está asociado con varias neoplasias, incluido el Linfoma de Hodgkin clásico (LHC). Esta relación es más evidente en los países en desarrollo, donde la infección primaria ocurre a una edad temprana y la circulación viral es alta. En Centroamérica, sin embargo, los estudios que exploran esta asociación y caracterizan los genotipos virales siguen siendo limitados, lo que restringe la comprensión de su papel en la etiopatogenia del LHC pediátrico y la posibilidad de diseñar estrategias diagnósticas y terapéuticas adaptadas al contexto regional.

En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo investigar la presencia de VEB en biopsias parafinadas de pacientes pediátricos con LHC tratados en el Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom. Para demostrar la infección latente en las células tumorales, se empleó hibridación in situ (ISH) dirigida a ARN pequeños codificados por VEB (EBERs), considerada el estándar de oro. Además, se realizó genotipificación viral mediante amplificación del gen EBNA3C mediante PCR de punto final, con el objetivo de diferenciar entre genotipos VEB1 y VEB2 y evaluar la diversidad genética presente en las muestras estudiadas.

Los resultados mostraron que el 71,42% de las muestras resultaron positivas para EBERs, confirmando una fuerte asociación entre infección latente por VEB y LHC en esta población pediátrica. El análisis molecular identificó dos casos correspondientes al genotipo VEB1 y un caso al genotipo VEB2, demostrando la coexistencia de ambos genotipos en El Salvador. Este hallazgo se alinea con la literatura internacional, que describe un predominio global del VEB1 pero también reconoce la circulación del VEB2 en contextos específicos, particularmente entre pacientes inmunocomprometidos.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan el papel del VEB en la patogénesis de la LHC pediátrica en regiones con alta endemicidad viral, como Centroamérica. La ISH se reafirma como una herramienta diagnóstica indispensable para detectar infecciones latentes, mientras que la caracterización molecular proporciona información valiosa sobre la diversidad viral y sus posibles implicaciones clínicas. Estos resultados adquieren especial relevancia en el contexto de las inmunoterapias emergentes dirigidas contra antígenos virales, que podrían abrir el camino a tratamientos más personalizados para pacientes con tumores positivos para VEB. Además, destacan la necesidad de ampliar la investigación regional, integrando tamaños de muestra más

grandes y variables clínicas e inmunológicas, para lograr una comprensión más integral de la interacción entre el virus, el huésped y la neoplasia.

**Palabras Claves:** Virus Epstein Barr (VEB), linfoma de Hodgkin, genotipos 1 y 2 de VEB, EBERs (pequeños RNAs codificados por VEB), EBNA3C (Antígeno Nucleares 3C de Epstein Barr).

## Abstract

The Epstein-Barr virus (VEB), known as the causative agent of infectious mononucleosis, is also associated with several neoplasms, including classical Hodgkin lymphoma (cHL). This relationship is more evident in developing countries, where primary infection occurs at an early age and viral circulation is high. In Central America, however, studies exploring this association and characterizing viral genotypes remain limited, restricting the understanding of its role in the etiopathogenesis of pediatric cHL and the possibility of designing diagnostic and therapeutic strategies adapted to the regional context.

In this context, the present study aimed to investigate the presence of VEB in paraffin-embedded biopsies from pediatric patients with cHL treated at the Benjamín Bloom National Children's Hospital. To demonstrate latent infection in tumor cells, in situ hybridization (ISH) targeting VEB-encoded small RNAs (EBERs), considered the gold standard, was employed. In addition, viral genotyping was performed by amplifying the EBNA3C gene through endpoint PCR, with the objective of differentiating between VEB1 and VEB2 genotypes and assessing the genetic diversity present in the studied samples.

The results showed that 71.42% of the samples tested positive for EBERs, confirming a strong association between latent VEB infection and cHL in this pediatric population. Molecular analysis identified two cases corresponding to the VEB1 genotype and one case to the VEB2 genotype, demonstrating the coexistence of both genotypes in El Salvador. This finding aligns with international literature, which describes a global predominance of VEB1 but also acknowledges the circulation of VEB2 in specific contexts, particularly among immunocompromised patients.

Taken together, these findings reinforce the role of VEB in the pathogenesis of pediatric cHL in regions with high viral endemicity, such as Central America. ISH is reaffirmed as an indispensable diagnostic tool for detecting latent infections, while molecular characterization provides valuable information on viral diversity and its potential clinical implications. These results are especially relevant in the context of emerging immunotherapies targeting viral antigens, which could pave the way for more personalized treatments for patients with VEB-positive tumors. Furthermore, they highlight the need to expand regional research by incorporating larger sample sizes and clinical and immunological variables, in order to achieve a more comprehensive understanding of the interaction between the virus, the host, and the neoplasm.

**Key Words:** Epstein Barr Virus (VEB), classic Hodgkin lymphoma (cHL), VEB genotypes 1 and 2, EBERs (small VEB-encoded RNAs), EBNA3C (Epstein Barr Nuclear Antigen 3C).

## **Agradecimientos**

Al Ministerio de Educación a través del Viceministerio de Ciencia y Tecnología por el apoyo a la Maestría en Ciencias en Biología Molecular.

A la Facultad de Ciencias Agronómicas y en particular a la Dirección de la Escuela de Posgrado y Educación Continua por la ejecución y apoyo a la Maestría en Ciencias en Biología Molecular.

Al Departamento de Oncología Pediátrica y departamento de Patología del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom.

A la Red Iberoamericana de Linfomas-Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (RIALCYTED) por el entrenamiento y uso de reactivos para la diagnóstico molecular y genotipificación de VEB en los siguientes eventos: Entrenamiento en Laboratorio de Virología y Cáncer del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, de la ciudad de Buenos Aires, Argentina por la capacitación y acreditación para realización de ISH, genotipificación y uso de equipos para procesamiento de biopsias parafinadas de pacientes pediátricos con LH. De igual forma agradecimientos al Hospital Infantil de México "Federico Gómez" Ciudad de México, por entrenamiento en la Unidad de Investigación en Virología y Cáncer denominado: El amplio espectro de desórdenes del sistema inmune y cáncer asociados al virus de Epstein-Barr.

Al Laboratorio de Virología y Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina por el uso de instalaciones, equipos, reactivos.

## **Dedicatoria**

*A mi esposa Ingrid Pineda y mis hijas Andrea Ortega y Alexandra Ortega, a mi madre y hermanos, a mi padre Ezequiel García Q. E. P. D.*

*Al Ing. M.Sc. Mario Orellana Núñez. Q. E. P. D. por la iniciativa e implementación de la Maestría y Doctorado en Ciencias en Biología Molecular.*

## Tabla de contenidos

1. Introducción .....	1
2. Objetivos .....	2
2.1 Objetivo general:.....	2
2.2 Objetivo 1: .....	2
2.3 Objetivo 2: .....	2
Genotipificar el VEB presente en las biopsias parafinadas de linfomas Hodgkin positivas a EBERs por PCR del gen EBNA3C.....	2
3. Estado del arte .....	3
3.1 Clasificación clínico histopatológica de los linfomas.....	3
3.1.1 Clasificación del Linfoma de Hodgkin .....	3
3.1.2 Clínica del Linfoma Hodgkin.....	4
3.2 Clasificación Linfomas no Hodgkin (LNH) .....	4
3.2.1. Linfoma linfoblástico (LL).....	5
3.2.2 Linfoma de Burkitt.....	5
3.2.3. Linfoma difuso de células grandes B (LDCGB).....	5
3.2.4. Linfoma anaplásico de células grandes (LACG) .....	6
3.3 Infección por VEB .....	6
3.3.1 VEB y Linfoma Hodgkin .....	9
3.4. Patrones de latencia de la infección por VEB.....	10
3.5 EBERs: pequeños RNAs codificados por VEB (del inglés Epstein Barr Encoded RNAs) .....	11
3.6 Genotipos de VEB .....	14
3.7 Diagnóstico de infección por VEB en Linfoma Hodgkin.....	17
4. Materiales y métodos .....	19
4.1 Población .....	19
4.2 Muestra .....	19
4.3. Lugar de realización de las técnicas moleculares: .....	19
4.4. Método de obtención de la muestra biológica: .....	19
4.5. Detección de VEB por Hibridación in Situ .....	20
4.6. Detección de genotipos 1 y 2 de VEB .....	21

4.6.1. Extracción de ADN:.....	21
4.6.2. Detección de genotipos 1 y 2 de VEB por PCR convencional:.....	22
4.7. Materiales y equipo utilizado.....	23
4.7.1. Reactivos para IHS, PCR y electroforesis:.....	23
4.7.2. Materiales para IHS, PCR y electroforesis: .....	24
4.7.3. Equipos: .....	24
4.7.4. Equipo informático: Laptop HP con intel i7, con Windows 10, RAM 16 GB con office 365.....	24
5. Resultados .....	25
5.1. Características histológicas de las muestras estudiadas.....	25
5.2 Determinación de la presencia de VEB en las biopsias estudiadas .....	26
5.3. Genotipificación de VEB.....	31
6. Discusión.....	34
7. Conclusiones .....	38
8. Limitaciones del estudio.....	39
9. Recomendaciones.....	40
10. Referencias .....	41

## Lista de figuras

Figura 1. Patrones de latencia de Virus Epstein Barr .....	11
Figura 2: LHM 1-A (EBERs negativo, HODGKIN positivo).....	27
Figura 3: LHM 1-B (EBERs negativo , HODGKIN positivo).....	27
Figura 4: LHM 2 (EBERs negativo, HODGKIN positivo).....	28
Figura 5: LHM 3 (EBERs positivo, HODGKIN positivo).....	28
Figura 6:LHM 4 (EBERs positivo, HODGKIN positivo).....	29
Figura 7:LHM 5 (EBERs positivo, HODGKIN positivo).....	29
Figura 8:LHM6 (EBERs positivo, HODGKIN positivo).....	30
Figura 9: LHM7A (EBERs positivo, HODGKIN positivo).....	30
Figura 10:LHM7B (EBERs positivo, HODGKIN positivo).....	31
Figura 11: Primera genotipificación de VEB, sin amplificación de muestra de LH EBERs positivas .....	32
Figura 12: Genotipos 1 y 2 en muestras de LH EBERs positivas .....	33

## Lista de cuadros

Cuadro 1: Histología y localización de todas las muestras de LH.....	25
Cuadro 2:Hibridación in situ para pequeños AN virales -EBERs.....	26

## **Lista de abreviaturas**

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

EBERs: pequeños RNAs codificados por VEB (del inglés Epstein Barr Encoded RNAs)

EBNA3C: Antígeno Nuclear de Epstein Barr 3C (del inglés Epstein Barr nuclear antigen 3C)

EBNAs: Antígenos Nucleares de Epstein Barr (del inglés Epstein Barr nuclear antigens)

VEB: Virus de Epstein Barr

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

IgG: inmunoglobulina G

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

min: minutos

seg: segundos

mL: mililitros

mM: milimolar

ng: nanogramos

$\mu$ l: microlitros

$\mu$ M: micromolar

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF/ORFs: marco de lectura abierto (del inglés open reading frame)

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasas (del inglés phosphatidylinositol 3-kinases)

RPM: revoluciones por minuto

RS: Célula de Reed-Sternberg son linfocitos grandes y anormales que en ocasiones contienen más de un núcleo. Estas células se encuentran en linfoma de Hodgkin. Las células de Reed-Sternberg también se llaman células de Hodgkin y Reed-Sternberg

## **1. Introducción**

El Virus Epstein Barr (VEB), agente etiológico de la mononucleosis infecciosa (MNI), se asocia también al desarrollo de neoplasias (Y. Chang et al., 2017). El virus fue reportado por primera vez en 1964 por M.A. Epstein, Y.M. Barr y B.G. Achong, en pacientes africanos con linfoma de Burkitt (Epstein et al., 1963) ; (Epstein & Barr, 1964), es uno de los siete virus oncogénicos actualmente conocidos que infectan humanos, el VEB en particular posee tropismo hacia células B, aunque también puede infectar células epiteliales, y de forma menos habitual, otro tipo de células como linfocitos T y células dendríticas (Y. Chang et al., 2017). Clasificado como carcinógeno del grupo 1 por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), sin embargo, es ubicuo en la mayoría de la población, presentándose una prevalencia alrededor del 95% en la población adulta. Diversos estudios reportan que el virus presenta un patrón bimodal en la edad de primo infección, con una prevalencia que varía de acuerdo con las características sociodemográficas y cambios culturales entre países (Lieberman, 2014). El virus de Epstein-Barr (VEB) se asocia sistemáticamente con una proporción de casos de linfoma de Hodgkin (LH) y se cree que esta asociación es causal, en estos casos, hay una expansión clonal de las células infectadas por el VEB y los productos génicos virales son detectables en las células de Hodgkin y Reed-Sternberg (HRS), las células tumorales en el LH (Higuchi et al., 2018 ; Jarrett et al., 2006). Algunos estudios clínicos han demostrado que LH y linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) VEB positivo pueden mostrar un peor pronóstico que los linfomas VEB negativos (Higuchi et al., 2018), aunque esto aún no está completamente definido, se vuelve importante para oncología demostrar la presencia o no del VEB en estos linfomas.

Hasta la fecha en El Salvador no se realizan estudios moleculares para diagnóstico de infección o genotipificación de VEB en Linfomas Hodgkin, lo cual dificulta el abordaje integral de esta patología. La demostración de la infección por VEB en los LH en niños podría sentar las bases e incentivar estudios orientados a evaluar la participación de VEB en la génesis de estos linfomas a nivel local. Además, al tener el diagnóstico de infección por VEB, se podrá situar a los pacientes en un contexto global de diagnóstico y terapéutico específico respecto al tipo histológico de LH e infección VEB. De igual importancia es la puesta a punto del diagnóstico molecular de infección por VEB en la Universidad de El Salvador, lo que permitiría a corto plazo poder brindar este servicio de manera sistemática para los pacientes con linfoma Hodgkin del Hospital Nacional de

Niños Benjamín Bloom y otros centros públicos asistenciales. En consecuencia, de lo anterior, en el presente estudio de corte transversal se demostró por diagnóstico molecular la presencia del VEB por hibridación in situ (ISH) de EBERs (Epstein–Barr encoding small RNA) y genotipificación basada en la amplificación por PCR de punto final de la región polimórfica del gen EBNA3C demostrando VEB tipo 1 y VEB tipo 2 en biopsias parafinadas de pacientes con diagnóstico de Linfoma de Hodgkin de pacientes del HNNBB.

## **2. Objetivos**

### *2.1 Objetivo general:*

Demostrar por diagnóstico molecular la infección y genotipificación del Virus Epstein-Barr en biopsias parafinadas de linfomas de Hodgkin de pacientes del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom.

### *2.2 Objetivo 1:*

Detectar VEB por hibridación in situ (ISH) de EBER (Epstein–Barr encoding región) en biopsia parafinadas de linfomas Hodgkin de pacientes del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom.

### *2.3 Objetivo 2:*

Genotipificar el VEB presente en las biopsias parafinadas de linfomas Hodgkin positivas a EBERs por PCR del gen EBNA3C.

### 3. Estado del arte

Casi 100 entidades se enumeran entre las neoplasias linfoides que recientemente la Organización Mundial de Salud público en la cuarta edición revisada de la clasificación de neoplasias hematopoyéticas, según esta, los linfomas se dividen en neoplasias linfoides precursoras y neoplasias linfoides maduras, que se separan cada una en neoplasias de origen de células B o T. Las neoplasias linfoides maduras incluyen linfomas no Hodgkin (LNH) y linfomas de Hodgkin (Swerdlow et al., 2020 ; Possomato-Vieira, José S. and Khalil, 2016).

El linfoma de Hodgkin (LH) es una enfermedad maligna del sistema linfático con una incidencia de 2 a 3 casos por 100 000 personas por año. Es la neoplasia más común en adultos jóvenes y tiene dos picos de incidencia, uno en la tercera década de la vida y otro después de los 55 años (Bröckelmann et al., 2018) .

El LH infantil representa el 6% de todos los cánceres y tiene una tasa de incidencia de 12 casos por millón de habitantes al año en el grupo de edad de 0 a 14 años con un predominio masculino típico y biológicamente, el LH es similar, si no idéntico, en niños y adultos, excepto por la incidencia relativa de subtipos histológicos específicos y una respuesta inmune distinta contra las células HRS en el microambiente tumoral (Nagpal et al., 2016).

#### *3.1 Clasificación clínico histopatológica de los linfomas*

##### 3.1.1 Clasificación del Linfoma de Hodgkin

El LH se caracteriza histológicamente por la escasa presencia de células malignas en el tumor (<1%) y la abundancia de células reactivas no malignas acompañantes, como: linfocitos, eosinófilos, neutrófilos, histiocitos y células plasmáticas (Swerdlow et al., 2020) ; Swerdlow et al., 2016).

Aunque la clasificación de los linfomas de Hodgkin (LH) no ha cambiado, la revisión incluye actualizaciones sobre LH nodular con predominio de linfocitos (LHPLN). Además se ha reconocido desde hace mucho tiempo que el NLPHL puede tener patrones de crecimiento variados, incluidos algunos con áreas difusas y / o numerosas células T (Swerdlow et al., 2016).

Linfoma Hodgking Clásico (95% de los casos) desde el punto de vista histológico se subdivide en:

Esclerosis nodular (NS): 70 a 80% en adolescentes y 40 a 50% en menores de 10 años. Celularidad Mixta (MC): 10 a 15% en adolescentes y 30 a 35% en menores de 10 años. Depleción linfocítica (poco frecuente en pediatría). Rico en linfocitos (poco frecuente en pediatría).

Linfoma de Hodgkin nodular de predominio linfocítico (LHnPL 5 a 10% de los casos)

En el caso del LH clásico, las células malignas se denominan células de Hodgkin cuando son mononucleares, células de Reed Sternberg (RS) cuando son multinucleares o, en conjunto, células de Hodgkin Reed-Sternberg (HRS).

En el caso del Linfoma de Hodgking nodular de predominio linfocítico (LHnPL), se denominan células histiocíticas y linfocíticas o células en palomitas de maíz. Actualmente, la evidencia señala que la célula causante del LH es un linfocito B (Steidl et al., 2011).

### 3.1.2 Clínica del Linfoma Hodgkin

La forma de presentación clínica típica del LH sería de forma ejemplarizada la de una niña o niño de 12 años de edad que desarrolla una adenopatía grande, no dolorosa en la región cervical, supraclavicular o axilar acompañada o no de síntomas sistémicos (denominados síntomas B y son: fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso) y de masa mediastínica (8). La masa mediastínica está presente en el 75% de los casos, y en el 30% es “bulky” (masiva); es decir, con un volumen superior a los 200 mm. En estos casos, puede ir acompañada de: tos, disnea, estridor, disfagia y síndrome de vena cava superior. Menos del 3% de las adenopatías en el LH son infradiafragmáticas (Moreno-Laguard et al., 2019).

El LHnPL supone menos del 10% de los casos de LH, se presenta mayoritariamente en varones y con formas localizadas de la enfermedad (Codina & Álvarez, 2016).

### 3.2 Clasificación Linfomas no Hodgkin (LNH)

Se trata de un grupo heterogéneo de enfermedades que incluye a todos los linfomas excepto el LH. La clasificación de los LNH ha cambiado a lo largo del tiempo, debido a los avances en la

histopatología, inmunología, citogenética y biología molecular (Swerdlow et al., 2016), clasificándose de la siguiente manera.

Neoplasias de precursores linfoides como el Linfoma linfoblástico T (15 a 20%) y Linfoma linfoblástico B (3%).

Neoplasias de células B maduras como el Linfoma de Burkitt (35 a 40%), Linfoma difuso de células grandes B o LDCGB (15 a 20%), Linfoma de células B mediastínico primario (1 a 2%).

Neoplasias de células T maduras como el Linfoma anaplásico de células grandes, ALK positivo (15 a 20%).

Los LNH en niños son enfermedades muy agresivas. Pueden debutar con cuadros clínicos extremadamente graves, como son: síndrome de la vena cava superior, compresión de la vía aérea, síndrome de lisis tumoral, insuficiencia respiratoria o cardíaca por derrames masivos, insuficiencia renal por afectación renal directa o de la vía urinaria, síndromes de compresión medular, etc. (Moreno-Laguard et al., 2019).

### 3.2.1. Linfoma linfoblástico (LL)

La mayoría de los niños afectados de LL de precursores T se presentan con una masa adenopática de crecimiento rápido en la región cervical o mediastínica. No es extraño que se acompañe de síntomas de compresión de la vía respiratoria o de la vena cava. Los derrames, pleurales o pericárdicos, son frecuentes y pueden contribuir a la clínica de descompensación respiratoria o cardiovascular. En contraste, los pacientes con LL de precursores B desarrollan formas localizadas de la enfermedad, con afectación de los ganglios periféricos, de los huesos y de la piel.

### 3.2.2 Linfoma de Burkitt

El LB esporádico se presenta como una masa abdominal, causante de un cuadro de abdomen agudo, invaginación intestinal u ocupación abdominal masiva, o bien en forma de masa adenopática en la región parafaríngea.

### 3.2.3. Linfoma difuso de células grandes B (LDCGB)

El LDCGB tiende a afectar la piel y el hueso. La variante mediastínica primaria es característica de mujeres jóvenes.

#### 3.2.4. Linfoma anaplásico de células grandes (LACG)

El LACG suele afectar a la piel con mayor frecuencia que cualquier otro linfoma de la infancia; también, puede extenderse al hueso, partes blandas y ganglios periféricos. A menudo, se acompaña de síntomas y signos sistémicos, como: fiebre, cansancio y anorexia. El 70% de los pacientes debutan con enfermedad diseminada. No es excepcional la afectación del SNC y de la Medula ósea (Moreno-Laguard et al., 2019).

En el caso del LH, este al igual que otros linfomas se ha asociado con la infección del virus de Epstein-Barr (VEB), de manera particular esta infección puede estar presente en el subtipo histológico MC que se observa principalmente en niños pequeños y representa aproximadamente el 20% del LH; mientras que el subtipo NS se observa predominantemente en adolescentes y adultos jóvenes y representa aproximadamente el 75% del LH y aunque la positividad al VEB no es un hallazgo directo de LH, las células tumorales pueden estar infectadas con VEB aproximadamente desde el 30% y hasta el 90% de todos los casos de LH en países desarrollados y en desarrollo, respectivamente (Nagpal et al., 2016).

Para 1971 se obtenían las primeras evidencias de la relación del LH con la infección por VEB mediante la detección de títulos elevados de anticuerpos contra los antígenos del VEB en pacientes con enfermedad de Hodgkin en comparación con pacientes con otros linfomas (Levine et al., 1971), desde ese momento se ha acumulado diversidad de información que demuestra un papel directo o indirecto de VEB en la patogénesis de la enfermedad de Hodgkin, ya sea activando varios mecanismos patogénicos o modulando el proceso de inmunorregulación que apoyaba la malignidad y la reactivación del virus (Nagpal et al., 2016).

### 3.3 *Infección por VEB*

El virus de Epstein-Barr o Herpesvirus humano tipo 4 se clasifica como VEB de tipo 1 y 2 basada en la presencia de polimorfismos en los genes que codifican los antígenos nucleares EBNA3A, EBNA3B y EBNA3C. La clasificación inicial se basó en las diferencias en EBNA-2 identificadas

en aislados de VEB de líneas de células linfoblastoides (LCL), las diferencias biológicas atribuibles a los tipos 1 y 2 del VEB proporcionan la justificación para la clasificación del VEB en estos dos grandes grupos, sin embargo está claro que estas no explican completamente la diversidad natural del VEB (C. M. Chang et al., 2009 ; Arturo-Terranova et al., 2020).

En Europa y Estados Unidos es 10 veces más frecuente el tipo VEB-1, pero están equitativamente distribuidos en otros entornos como África (16). El VEB tipo-2 transforma a las células B menos eficientemente que el VEB tipo-1, y los linfocitos B infectados in vitro, no crecen bien en cultivos con bajas concentraciones VEB tipo-1, a diferencia de VEB tipo-2 que presenta mayor dificultad para infectar líneas celulares. Estas diferencias están determinadas por las regiones codificadoras de los EBNA (Beltramino et al., 2005).

El genoma del VEB es un dsDNA lineal de 170 Kpb que presenta una partícula viral con un diámetro de entre 120 y a 180 nm. El material genético se encuentra envuelto por un centro conformado por la nucleocápside de simetría icosaédrica de 162 capsómeros la cual es adyacente a una porción de tegumento proteico que la separa de la envoltura viral, esta última caracterizada por presentar espículas glicoproteicas importantes para el reconocimiento de receptores y la posterior entrada a la célula hospedadora, el compartimento del tegumento pleomórfico medio se llena con 20-40 proteínas virales diferentes (Z. Li et al., 2020).

El genoma del VEB contiene al menos 86 marcos de lectura abiertos y contiene una región única larga intercalada por cuatro repeticiones internas principales (IR1 a IR4) y repeticiones terminales (TR). Nueve proteínas latentes que incluyen el antígeno nuclear 1 de Epstein-Barr (EBNA1), EBNA2, EBNA3A, -3B, -3C, EBNA-LP y la proteína de membrana latente 1 (LMP1) y LMP2A, -2B están codificadas por genes situados en la región única larga intercalada del genoma, otros ORFs codifican proteínas de la cápside, factores de transcripción y proteínas líticas de diversas funciones (Kwok et al., 2012).

El genoma viral también codifica pequeños ARN no codificantes como los ARNs codificados por VEB (EBER 1 y 2), las transcripciones hacia la derecha de BamHI-A (BART), un ARN nucleolar pequeño (snoARN) y los microARN virales (miRNA : miARN-BART y miARN-BHRF1) se expresan durante la infección por VEB en una variedad de tipos de células y tumores (Pratt et al., 2009 ; Skalsky & Cullen, 2015).

A través de la saliva, VEB llega al epitelio orofaríngeo y glándulas salivares donde infecta a las células epiteliales. Se multiplica, estableciendo procesos líticos. Los viriones infectan a los linfocitos B que transitan en la proximidad o directamente en las criptas tonsilares. La entrada del virus en la célula linfoide es un proceso muy complejo. 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 glucoproteína presente en la envoltura viral, la gp350/220, interactúa en forma específica con el marcador celular CD21, receptor del componente C3d del complemento o receptor tipo 2 del complemento (CR2), presente en la superficie de los linfocitos B, célula para la cual presenta importante tropismo el VEB, de igual forma en el proceso de infección celular otras glicoproteínas de la superficie viral como gp42, gB, gH y gL, están involucradas en interacciones con el receptor CR2 en la superficie de los linfocitos B durante la entrada viral (Tinoco Racero et al., 2014 ; Zuo et al., 2014).

La proteína gp42 es el factor determinante del tropismo requerido solo para la fusión de células B e inhibe la fusión de células epiteliales, lo que indica diferentes mecanismos de infección para estos dos tipos de células (Chen et al., 2018). La mayoría de las células epiteliales carecen de expresión del receptor CR2, lo que hace que la invasión viral sea mucho más compleja que en los linfocitos B. Se han propuesto modelos diferentes para explicar cómo el VEB entra en las células epiteliales: "transferencia de infección", mediada por linfocitos B o células de Langerhans. El VEB utiliza sus propias proteínas durante el proceso de fusión con la membrana celular; y los viriones de la progenie que surgen de las células epiteliales infectadas por VEB atraviesan las membranas laterales hacia las células epiteliales adyacentes (Zuo et al., 2014).

Recientemente se demostró que el receptor de efrina tirosina quinasa A2 (EphA2) como un importante receptor de entrada a las células epiteliales para la infección por VEB, el dominio extracelular de EphA2 se unía específicamente a glicoproteínas gH y gL de VEB. Este resultado proporcionó información importante sobre el mecanismo que utiliza el VEB para infectar células epiteliales y tiene implicaciones importantes para la patogénesis del VEB y puede descubrir nuevos objetivos potenciales que se pueden utilizar para el desarrollo de nuevas estrategias de intervención (Chen et al., 2018).

La entrada del virus a la célula huésped ocurre por endocitosis, posteriormente en el citoplasma se produce un proceso de decapsidación y transporte del ADN al núcleo. En el momento en que esta molécula de ADN alcanza el núcleo adquiere una morfología circular y forma un episoma. Después de la infección, los linfocitos B comienzan el ciclo celular y proliferan continuamente en un proceso denominado transformación o immortalización, dando lugar a líneas de células linfoblastoides immortalizadas, pudiéndose propagar in vitro indefinidamente (Tinoco Racero et al., 2014).

La infección de los linfocitos B por el VEB se caracteriza por un estado de latencia vírica, in vitro, debido a la acción de enzimas celulares del huésped sobre el episoma y se producen in vitro una serie de moléculas como se describió anteriormente, destacando las siguientes: proteínas de membrana de infección latente (LMP1 y LMP2), antígenos nucleares (EBNA), dos pequeños fragmentos de ARN no codificantes (EBER), así como otras moléculas de ARN que pudieran codificar proteínas (BART). La proliferación y expansión de los linfocitos B infectados junto con las células T reactivas dan lugar al crecimiento del tejido linfoide.

### 3.3.1 VEB y Linfoma Hodgkin

El cáncer se caracteriza por proliferación celular incontrolada, con genes anormales expresados en las células cancerosas que participan directamente en la regulación del ciclo celular, las disfunciones en el ciclo celular dan acceso a las células para obtener características de crecimiento incontrolado, principalmente hiperproliferación y una baja tasa de apoptosis, lo que finalmente conduce a la oncogénesis. El linfoma de Hodgkin (LH) se asocia a la infección con VEB en aproximadamente 40% de los casos en Europa occidental y Estados Unidos y hasta en un 80% en los países en vías de desarrollo (Beltramino et al., 2005).

Después de infectar la célula el VEB puede llevar una serie de replicación lítica (ciclo lítico) o dar lugar a la expresión diferencial de genes latentes (ciclo latente). En determinadas condiciones, la infección por VEB puede conducir al desarrollo de cáncer, y este proceso está estrechamente relacionado con el ciclo de vida del VEB (es decir, sus etapas latente y lítica). De hecho, la viremia por VEB está presente en el 14% de las poblaciones sanas y la infección es asintomática y permanece latente durante un largo período persistiendo el virus como episomas en las células B infectadas sin causar la enfermedad en el 90% de los adultos. Por el contrario, los portadores de VEB que experimentan una infección lítica por VEB con frecuencia desarrollan la enfermedad relacionada con la infección, incluidos cánceres. El ciclo de replicación lítica comienza cuando se

inducen los factores de transcripción tempranos (TF); los promotores virales activados por los TF facilitan la formación del complejo de iniciación, que está compuesto por seis productos génicos virales: BMRF1, BSLF1, BBLF4, BBLF2 / 3, BALF5 y BALF2. Una vez que las células infectadas con VEB entran en el ciclo lítico, los antígenos líticos se expresan abundantemente y desencadenan la proliferación celular de linfocitos B (Song et al., 2019).

Se sabe que los cánceres asociados al VEB tienen un perfil de mutaciones distinto en comparación con los cánceres negativos al VEB, el impacto clínico de la infección por VEB en el cáncer difieren según el tipo de tumor; en el linfoma Hodgkin VEB positivo, el pronóstico es malo en pacientes de edad avanzada, pero no en pacientes más jóvenes (Ko, 2015).

#### *3.4. Patrones de latencia de la infección por VEB*

En el Linfoma de Hodgkin VEB positivo el antígeno nuclear de VEB 1 (EBNA1) es esencial para la replicación del genoma episomal en células en replicación. Aún se debate si EBNA1 también tiene funciones oncogénicas. En las células HRS, características de Linfoma Hodgkin, además de EBNA1, están expresándose las dos proteínas latentes de la membrana 1 y 2a (LMP1 y LMP2a, respectivamente) de VEB en un patrón que se llama latencia II (ver figura 1). LMP1 imita al receptor CD40 activo y es un oncogén clásico, por otro lado, LMP2a imita un BCR activo. En consecuencia, dos señales principales de supervivencia para las células B en el centro germinal son proporcionada por VEB; además se ha demostrado que el VEB puede rescatar las células B del centro germinal deficientes en BCR de la apoptosis, lo que demuestra el papel importante del virus en la transformación de dichas células B. En consonancia con estas características de expresión todos los casos de Linfoma Hodgkin clásico en el que las células HRS portaban mutaciones resultaron ser VEB positivo (Seifert et al., 2019).

VEB estaría involucrado en el desarrollo de al menos una proporción de los LH según varios estudios y los análisis epidemiológicos describen que el riesgo de desarrollar LH es entre dos y tres veces superior dentro de los dos años posteriores a sufrir mononucleosis infecciosa por VEB. El análisis retrospectivo del título elevado de anticuerpos VEB en muestras de suero de pacientes con LH, demostró que dicho hallazgo precedía el desarrollo del LH. Otros estudios detectaron la expresión de EBERs, EBNA1, LMP1 y LMP2A, patrón de latencia II mencionado anteriormente, en las células de RS 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 NF $\kappa$ B y AKT/PI3K (Alejandro, 2012).

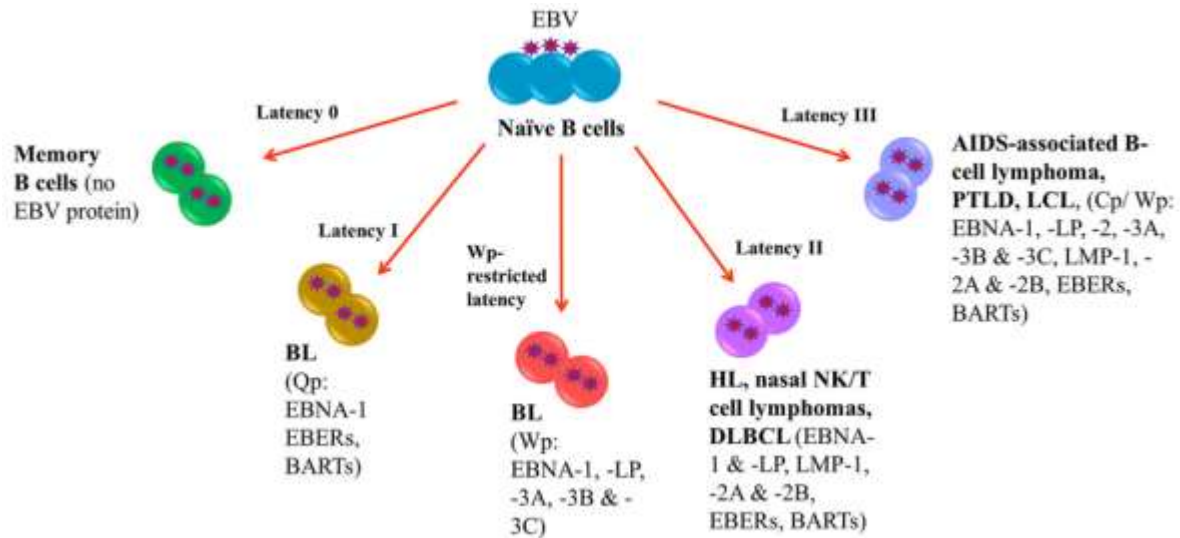


Figura 1. Patrones de latencia de Virus Epstein Barr

En color violeta perfil de expresión en latencia II en linfoma Hodgkin, linfoma nasal de células NK / T y DLBCL, en la que se expresan EBNA-1, EBNA-LP, proteína de membrana latente (LMP) -1, -2A y -2B, EBER y BART. Tomado y modificado de Hui, Kwai Fung et al. “Viral-Targeted Strategies Against VEB-Associated Lymphoproliferative Diseases” (Hui et al., 2019).

### 3.5 EBERs: pequeños RNAs codificados por VEB (del inglés Epstein Barr Encoded RNAs)

Los ARN codificados por el VEB, conocidos como EBER, son ARN no codificantes que se expresan de manera abundante en células con infección latente por este virus. Los genes EBER1 y EBER2, contiguos en el genoma del VEB, son transcritos por la ARN polimerasa III y se expresan de manera constitutiva durante la latencia. EBER1, el ARN no codificante más abundante del virus, se localiza principalmente en el nucleoplasma y su presencia ha sido confirmada en células B de memoria de portadores sanos mediante técnicas moleculares y de citometría. Pese a su elevada expresión, la eliminación de EBER1 en la cepa B95-8 no modificó la capacidad transformante del VEB ni su persistencia en modelos de ratón humanizado, lo que inicialmente dificultó asignarle una función celular directa (Farrell & Farrell, 2025).

Evidencia posterior mostró que EBER1 puede suplir la función del ARN TMER4 del herpesvirus murino 68, restaurando la migración de células B infectadas desde los ganglios linfáticos hacia la circulación en ratones infectados. Esto señaló un papel fisiológico de EBER1 en condiciones inmunocompetentes, no observable en cultivos celulares. EBER1 interactúa con proteínas celulares como La y RPL22, esta última con un parálogo funcional, L22L1, cuyo control traduccional depende de RPL22. La desregulación de esta vía afecta procesos hematopoyéticos, incluido el desarrollo de linfocitos T  $\alpha\beta$  mediado por mecanismos dependientes de p53 y del estrés del retículo endoplasmático. Aunque estos efectos involucran principalmente células T, se ha demostrado que EBER1 es liberado en exosomas por células B infectadas, pudiendo activar TLR3 en células receptoras. Esto ha llevado a proponer que la función principal de EBER1 podría ejercerse extracelularmente, modulando localmente la actividad de linfocitos T y facilitando mecanismos de evasión inmunitaria del VEB, tanto en infecciones persistentes como en patologías asociadas al virus (Farrell & Farrell, 2025; Iwakiri, 2014).

EBER2, expresado constitutivamente en todas las fases de latencia del EBV, es el segundo ARN no codificante más abundante del virus. Los estudios iniciales que utilizaron mutantes virales mostraron resultados discordantes: mientras que la inactivación de EBER2 en la cepa B95-8 no afectó la inmortalización ni el crecimiento de las LCL, experimentos equivalentes con Akata EBV sí evidenciaron un papel en la proliferación celular. Actualmente se reconoce que estas discrepancias se explican por la señalización intensamente activadora de LMP1 en B95-8, que oculta los efectos de EBER2. Un indicio relevante sobre su función in vivo surgió de investigaciones en carcinoma nasofaríngeo (NPC) en población cantonesa, donde se asoció un polimorfismo de EBER2 con el NPC, sugiriendo una contribución al crecimiento o supervivencia celular (Farrell & Farrell, 2025).

Hoy se sabe que EBER2 participa en un complejo ribonucleoproteico nuclear que modula de manera específica la expresión génica mediante la interacción con PU.1 y otros factores de transcripción. Inicialmente se observó que influía en la transcripción de LMP2 del EBV al unirse a las repeticiones terminales virales; sin embargo, estudios posteriores revelaron que también incrementa la expresión del gen celular UCHL1. El apareamiento de bases entre una región de EBER2 y el extremo 5' del ARNm naciente de UCHL1 libera de la pausa funcional a la polimerasa y potencia su transcripción. UCHL1 es una desubiquitinasa que eleva los niveles de ciclina B1 y Aurora B, proteínas clave en el control del ciclo celular. La variante M81 de EBER2, predominante en cepas chinas asociadas al NPC, muestra una mayor afinidad por el ARNm de UCHL1,

produciendo niveles aproximadamente cinco veces superiores de Aurora B también llamada Quinasa Aurora B, una enzima crucial en la división celular (mitosis y meiosis) que asegura que los cromosomas se separen correctamente, regulando el punto de control del huso y la citocinesis; su desregulación está asociada con el cáncer y la inestabilidad cromosómica. En conjunto, la evidencia indica que EBER2 favorece la progresión del ciclo celular y la proliferación de las células infectadas por EBV, con una actividad particularmente acentuada en variantes virales asociadas al carcinoma nasofaríngeo (Farrell & Farrell, 2025; Fok et al., 2006b; Iwakiri, 2014).

Investigaciones han demostrado que los EBER pueden conferir fenotipos malignos a células linfoides e inducir la producción de diversas citocinas que favorecen el crecimiento de células tumorales infectadas. Asimismo, se ha comprobado que los EBER se unen al gen inducible por ácido retinoico (RIG-I), activando su vía de señalización. De manera adicional, promueven la expresión de interleucina-10 (IL-10), un factor de crecimiento autocrino clave en el linfoma de Burkitt, a través de la activación de la ruta RIG-I/IRF3, lo que sugiere que la modulación de la inmunidad innata mediada por EBER desempeña un papel importante en la oncogénesis asociada al VEB. Más recientemente, se ha reportado que células infectadas por el VEB liberan EBER al medio extracelular, donde son reconocidos por el receptor tipo Toll 3 (TLR3), desencadenando la producción de interferón tipo I, citocinas inflamatorias y la activación de la respuesta inmunitaria. Además, la detección de EBER1 en el suero de pacientes con infecciones activas por el VEB sugiere que la activación de la señalización de TLR3 mediada por EBER1 podría ser un mecanismo clave en la patogénesis de dichas infecciones (Iwakiri, 2014).

Los EBER se expresan en la mononucleosis infecciosa, una enfermedad causada por el VEB, y en muchas otras enfermedades asociadas al VEB. En algunos tumores, la expresión de los EBER es exorbitantemente alta, y los EBER se consideran marcadores fiables para la detección del VEB. En el linfoma de Hodgkin, la detección de los EBER mediante ISH es un método sensible para detectar la infección por VEB en muestras clínicas. En las biopsias de LB de Malawi, los EBER se detectan en la mayoría de las células de una población tumoral mediante ISH, mientras que, en otras, estas transcripciones están presentes solo en una subpoblación de células. En los LB africanos, la detección de los EBER mediante ISH no es un marcador fiable (Iwakiri, 2014; Samanta & Takada, 2010).

Los EBERs se encuentran principalmente en el núcleo, como se ha demostrado mediante la tinción nuclear intensa con EBER por ISH, limitándose al núcleo, lo que sugiere que su contribución a la latencia viral es puramente nuclear (Fok et al., 2006a).

Sin embargo, también se ha demostrado que EBER1 se libera de las células infectadas con VEB y activa la señalización del TLR3. También se ha demostrado que los sueros de pacientes con infecciones activas por VEB como mononucleosis infecciosa y VEB-LH contenían una gran cantidad de EBER1, que era suficiente para activar la señalización de TLR3, lo que posteriormente resultaba en la inducción de IFN tipo I y citocinas proinflamatorias. Además, las células detriticas tratadas con EBER1 pueden inducir una respuesta inmune primaria, lo que sugiere que durante la infección activa, la estimulación de TLR3 mediada por EBER1 es responsable de la activación inmune por VEB (Iwakiri et al., 2009).

Por lo que a pesar de la localización nuclear de los EBER utilizando ISH de baja resolución en múltiples estudios, los EBER además deberían localizarse no solo en el núcleo sino también en el citoplasma, ya que se sabe que los EBER forman complejos con varias proteínas citoplasmáticas (Fok et al., 2006b; Samanta & Takada, 2010).

En linfoma Hodgkin VEB positivo, EBER1 suprime la transcripción de p21 cip1 / waf1 y confiere resistencia a la apoptosis inducida por fármacos en líneas celulares HL mediante la regulación a la baja de p53, EGR1 y STAT1, y las líneas celulares de Linfoma Hodgkin EBER1 positivas eran más resistentes a la apoptosis inducida por inhibidores de histona desacetilasa o inhibidores de la proteasoma. Biológicamente, esta actividad anti-apoptótica podría ser importante en el rescate de células de Reed-Sternberg y en el mantenimiento de la fase latente. Los LH VEB positivos tenían una expresión más débil de p21 cip1 / waf1. Clínicamente, la supresión de p21 cip1 / waf1 en Linfoma Hodgkin VEB positivo predice un peor pronóstico, y la posibilidad de una mayor resistencia a la apoptosis inducida por fármacos podría tener implicaciones terapéuticas y en los comportamientos clínicos de los HL (Liu et al., 2010).

### *3.6 Genotipos de VEB*

El virus de Epstein-Barr (VEB) se clasifica en dos tipos principales: VEB tipo 1 (VEB-1) y VEB tipo 2 (VEB-2), también denominados tipo A y tipo B, según las variantes alélicas presentes en los genes EBNA2 y EBNA-3A, -3B y -3C y tal como se señaló anteriormente una diferencia clínica

relevante entre ambos es que el VEB-1 posee una mayor capacidad para transformar linfocitos B en líneas celulares linfoblastoides (LCL), en comparación con el VEB-2. La distribución geográfica de estos genotipos muestra que el tipo 1 es el más común a nivel mundial, predominando en Europa, Asia y América del Norte y del Sur.

En contraste, el tipo 2 se encuentra con mayor frecuencia en Alaska, Papúa Nueva Guinea y África Central, donde incluso se han reportado infecciones mixtas por ambos genotipos, así como variantes recombinantes intertípicas que combinan EBNA2 tipo 1 con EBNA3 tipo 2. Posteriormente, el análisis de la secuencia completa del gen LMP1 permitió redefinir esta clasificación en más de seis cepas distintas, entre estas: Alaskan (AL), China1, China2, B95.8 (Med+), Med- y Argentine, y otras, lo que pone de manifiesto la influencia que pueden tener las secuencias parciales en los sistemas de clasificación viral. Si bien la tipificación basada en la distinción entre VEB-1 y VEB-2 continúa siendo la más utilizada, debe considerarse la existencia de eventos de recombinación en el genoma del virus.

También se ha planteado la hipótesis de que el VEB-2 podría derivar de recombinaciones que involucran los genes EBNA2 y EBNA3, ya sea entre cepas de VEB-1 y linfocriptovirus estrechamente relacionados, o mediante la selección positiva de variantes génicas específicas. Por esta razón, los estudios de clasificación del VEB no deberían limitarse al análisis de unos pocos genes o fragmentos parciales de secuencias virales, sino que requieren la secuenciación completa del genoma, con especial énfasis en los procesos de recombinación (Smatti et al., 2018; Zanella et al., 2019).

Análisis recientes de secuencias obtenidas a partir de aislados virales de portadores sanos y de muestras tumorales muestran que cerca de dos tercios provienen de tumores como el carcinoma nasofaríngeo (NPC), cáncer gástrico, linfoma de Burkitt y linfoma de Hodgkin, mientras que el resto corresponde a tejidos no malignos, entre ellos líneas celulares linfoblastoides inmortalizadas (LCL) espontáneamente, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y saliva. Estos estudios revelaron variaciones complejas en las cepas del VEB dentro de la clasificación tipo 1/tipo 2 y, al analizarlas por región geográfica, se observó una separación marcada de las cepas asiáticas. De manera complementaria, un análisis comparativo de genomas completos identificó polimorfismos compartidos por cepas derivadas de tumores, pero ausentes en los aislados de individuos sanos. Sumado a ello, la cepa M818 aislada de un NPC mostró mayor afinidad por células epiteliales y una actividad lítica incrementada, lo que sugiere que ciertas variaciones

genómicas podrían estar asociadas con un aumento en la patogenicidad viral. Asimismo, se han descrito polimorfismos que generan sustituciones de aminoácidos en epítomos reconocidos por células T. Sin embargo, aún no se ha esclarecido si estas variaciones representan un efecto de la deriva genética, una selección positiva vinculada a funciones proteicas específicas o un proceso de presión inmunológica asociado a la diversidad de moléculas MHC predominantes en distintas poblaciones geográficas (Mautner, 2018; Zealiyas et al., 2023).

Tanto los genotipos de VEB tipo 1 como los de tipo 2 pueden presentar una intensa replicación lítica espontánea. Este proceso, de gran complejidad molecular, depende de la interacción con múltiples proteínas celulares y podría favorecer la oncogénesis a través de distintos mecanismos. (Mautner, 2018; Zealiyas et al., 2023).

La replicación lítica activa incrementa la producción viral y, en consecuencia, amplía el número de células infectadas con potencial de transformación. Por otro lado, una replicación lítica abortiva caracterizada por la expresión parcial de proteínas líticas tempranas con capacidad transformadora, pero sin inducir muerte celular también podría contribuir al desarrollo tumoral. De hecho, estudios observacionales han demostrado una asociación entre la replicación lítica y la carcinogénesis, mostrando que títulos elevados de anticuerpos frente a proteínas líticas del VEB en sangre periférica constituyen un marcador epidemiológico robusto y predictor del riesgo de carcinoma nasofaríngeo (H. Li et al., 2025).

El EBV-1 muestra una alta eficiencia en la transformación de linfocitos B en líneas celulares linfoblastoides (LCL) inmortalizadas in vitro, mientras que el EBV-2 presenta una mayor tendencia a infectar células T en cultivo que a las células B (Huang et al., 2023).

El VEB tipo 1 se caracteriza por su elevada capacidad de transformar células B y se encuentra principalmente asociado a neoplasias malignas como el linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaríngeo y el linfoma de Hodgkin. En contraste, el VEB tipo 2 presenta una menor eficiencia transformadora, aunque su prevalencia es mayor en regiones como África, lo que podría relacionarse con procesos de adaptación evolutiva. Además, las diferencias genéticas entre ambos tipos influyen en su potencial de reactivación, lo que repercute en la presentación clínica de la enfermedad y en la variabilidad geográfica observada (Huang et al., 2023; Shannon-Lowe et al., 2017).

### *3.7 Diagnóstico de infección por VEB en Linfoma Hodgkin*

Como se mencionó anteriormente el VEB causa mononucleosis infecciosa y también se asocia con una amplia variedad de neoplasias malignas que incluyen linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD), carcinoma nasofaríngeo (NPC) y carcinoma gástrico. La prevalencia de cánceres relacionados con el VEB, que se estima que afecta hasta al 1% de los seres humanos en todo el mundo, justifica un mayor enfoque en los ensayos de laboratorio para detectar y caracterizar la infección. Dentro de una neoplasia determinada, la presencia constante de VEB implica que el virus podría contribuir a la patogénesis o al mantenimiento del proceso clonal. Además, la ubicación física del ADN viral dentro de cada célula maligna de un tumor dado implica que el virus es un biomarcador que puede usarse para evaluar el grado de diseminación del tumor y para monitorear la carga de la enfermedad en respuesta a la terapia (Gulley & Tang, 2008).

De igual forma las mejoras en la terapia dirigida por el VEB resaltan la importancia de la detección de laboratorio y el potencial de dirigirse a productos génicos virales o sus vías posteriores que impulsan la proliferación celular, inhiben la apoptosis o evitan la respuesta inmune, por lo que el VEB es un marcador tumoral de gran utilidad (Gulley & Tang, 2008).

Si una célula infectada sufre una transformación maligna, cada célula hija neoplásica hereda la misma estructura episomal viral única, lo que hace que la estructura genómica del VEB sea un marcador de la clonalidad del tumor. En el análisis de transferencia Southern del fragmento de repetición terminal viral, una neoplasia monoclonal se muestra como una sola banda. La leucoplasia pilosa oral y otras infecciones líticas presentan una escalera de bandas más pequeñas que corresponden a los genomas virales lineales policlonales (Gulley & Tang, 2008).

En linfoma de Hodgkin VEB positivo, como ya se señaló se observa una latencia de tipo II caracterizada por la expresión viral de EBNA1, LMP1, LMP2, EBER, BART. Hay dos tipos principales de VEB y otras en estudio; la variación de cepas enfatiza la necesidad de apuntar a un segmento de gen viral conservado (o preferiblemente a múltiples segmentos) cuando se diseña un ensayo de laboratorio para detectar el ADN del VEB. Los estudios pilotos del linfoma en pacientes SIDA identificaron variantes de secuencia interferente en los genes LMP1, LMP2 y BZLF1, mientras que las regiones BamH1W, EBER1 y EBNA1 estaban muy conservadas (Gulley & Tang, 2008).

El criterio fundamental para establecer la asociación del VEB con el LH es la presencia de transcritos como EBER1 y antígenos virales en las células RS (Alejandro, 2012).

Es importante señalar que los transcritos denominados colectivamente EBER, que se expresan a niveles tan altos (alrededor de un millón de copias por célula infectada de forma latente) se consideran el mejor marcador natural de infección latente. La hibridación in situ dirigida a uno o ambos EBER es el ensayo estándar de oro para determinar si la biopsia de un tumor está relacionada con el VEB. Sistemas comerciales para EBER por hibridación in situ facilita la implementación en laboratorios clínicos (por ejemplo, Ventana [Tucson, AZ], Leica [Bannockburn, IL], Dako [Glostrup, Dinamarca], Invitrogen [Carlsbad, CA], Biogenex [San Ramon, CA]). La positividad a VEB es del 40% en linfoma de Hodgkin todos los subtipos, sin embargo, en el Linfoma de Hodgkin, celularidad mixta es del 70%, Linfoma de Hodgkin, esclerosis nodular 20%, Linfoma de Hodgkin con depleción de linfocitos 50%, Linfoma de Hodgkin, relacionado con el SIDA es mayor del 95% (Gulley & Tang, 2008).

La hibridación es la formación de moléculas híbridas de ácido nucleico con secuencias de nucleótidos complementarias en las formas ADN: ADN, ADN: ARN o ARN: ARN. La hibridación in situ es una técnica muy sensible que permite la detección y localización de moléculas específicas de ADN o ARN en células aisladas conservadas morfológicamente, cortes de tejido histológico o preparaciones de cromosomas. La ISH tiene una amplia gama de aplicaciones y se ha utilizado para (a) localizar la infección viral, (b) identificar sitios de expresión génica, (c) analizar la transcripción del ARNm y la distribución tisular, y (d) mapear secuencias de genes en cromosomas. Los pasos principales involucrados en la hibridación in situ son los siguientes: preparación y marcaje de sondas, fijación de tejidos, permeabilización, hibridación y detección de señales. EBERs puede ser determinado por hibridación in situ utilizando una sonda de oligonucleótidos EBER conjugada con fluoresceína y la fracción de IgG purificada de un anticuerpo anti-fluoresceína monoclonal, concluyendo que la hibridación in situ para la identificación del VEB es el estándar de oro (Gulley & Tang, 2008 ; Nouri-Aria, 2008).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite la detección del genotipo viral representa un ensayo importante en el diagnóstico del virus (Ambinder & Mann, 1994). En niños la detección del ADN del VEB mediante PCR es una herramienta útil adjunto de diagnóstico y de determinación de cepas. La detección de virus libres de células en suero o el plasma de pacientes no inmunodeprimidos por PCR es sensible y específico para la infección primaria de igual forma

los VEB de tipo 1 y 2 basada en la presencia de polimorfismos en los genes que codifican los antígenos nucleares EBNA3A, EBNA3B y EBNA3C puede ser determinado por PCR. El monitoreo de la carga viral de VEB por qPCR son útiles para diagnóstico y seguimiento en los trastornos linfoproliferativos y las neoplasias malignas asociadas con el VEB (Junker, 2005).

## **4. Materiales y métodos**

### *4.1 Población*

- La población estudiada fueron biopsias parafinadas de casos de linfomas Hodgkin diagnosticados durante 2017 en el Servicio de Patología del HNNBB.

### *4.2 Muestra*

- Se investigo un total de 7 casos de LH diagnosticados, sin embargo, se procesaron un total 9 de biopsias parafinadas, ya que en 2 de los 7 casos estudiados de LH se logró obtener biopsias parafinadas por duplicado.

### *4.3. Lugar de realización de las técnicas moleculares:*

- Laboratorio Virología y Microbiología Molecular-Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador, El Salvador.
- Laboratorio de Virología y Cáncer del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, de la ciudad de Buenos Aires, Argentina.

### *4.4. Método de obtención de la muestra biológica:*

Tanto para ISH como para genotipificación las biopsias parafinadas de linfomas Hodgkin fueron sometidas a un proceso de desparafinación, por método manual basado en el método reportado por Pate y colaboradores (Patel et al., 2016) y otros métodos similares en el que se desparafina con xilol, se hidrata con etanol y se somete el tejido a digestión enzimática.

La secuencia de desparafinado manual utilizado con tiempo y números de procesos fue la siguiente: Xilol (2 veces por 5 minutos), Etanol 100% (2 veces por 3 minutos), Etanol 96% (1 vez por 3 minutos), Agua destilada (3 veces por 3 minutos).

#### 4.5. Detección de VEB por Hibridación *in Situ*

La hibridación *in situ* (ISH, por sus siglas en inglés) es una técnica de biología molecular que nos permite detectar de manera específica, secuencias de ADN o RNA en células o secciones de tejido. Se emplearon sondas de RNA complementarias a EBERs conjugadas a una molécula antigénica fluoresceína o FITC (Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato), que hibrida a la secuencia blanco de interés.

Para amplificar la señal de detección, fue necesario emplear un anticuerpo secundario contra el antígeno acoplado a la sonda, conjugado a fosfatasa alcalina (FA) y un sustrato que produce una reacción colorimétrica, por lo que se observara un precipitado de color café oscuro a nivel del núcleo.

Al poner en contacto con el tejido, la sonda marcada junto con el anticuerpo secundario acoplado a FA y el sustrato de la FA, podemos visualizar las células positivas a la secuencia de interés. Para este proceso se utilizó el kit PNA ISH Detection de DAKO con sondas de oligonucleótidos específicas para EBERs, marcadas con FITC y detectadas mediante anticuerpo anti-FITC conjugado con fosfatasa alcalina, además se utilizaron secciones de 2 micras de tejido parafinado fijado en láminas portaobjeto.

Partiendo de la biopsia desparafinada se implementó el siguiente flujo de trabajo: desparafinado, pretratamiento, hibridación, lavado, detección, tinción y montaje, lectura.

Para el pretratamiento se ejecutó el siguiente flujo de trabajo: Poner los vidrios en cámara húmeda, Preparar una dilución 1/10 de proteinasa K (1 gota de proteinasa en 450µl de TBS). Agregar 150µl de proteinasa K diluida sobre los cortes. Incubar 20 minutos. Sumergir los vidrios en H<sub>2</sub>O destilada dos veces durante 3 min. Sumergir los vidrios en ET-OH 96% durante 10 segundos. Dejar secar los vidrios al aire durante 5 min.

Para la hibridación se llevó a cabo con el siguiente flujo de trabajo: Agregar 1 gota de sonda específica sobre un cubre objetos y luego colocar el cubreobjetos sobre el tejido. En vidrios separados agregar las sondas control positiva y negativa. Colocar los vidrios en cámara húmeda. Colocar la cámara húmeda en baño a 55°C durante 1½ hs.

Lavado: Diluir la solución de lavado astringente 1/60 en H<sub>2</sub>O con 50 ml de vol. final en un Coplin. Precalear la solución de lavado a 55°C en el baño. Remover los cubre objetos. Sumergir vidrios en solución de lavado precalentada 25 min. a 55°C con agitación. Sumergir los vidrios en TBS durante 10 segundos.

Para la detección se empleó el siguiente flujo de trabajo: Colocar los vidrios en cámara húmeda. Agregar 2 gotas de anti-FIT/CAP (vial N°5) a cada corte. Incubar durante 30 min. Remover el anticuerpo. Sumergir los vidrios en TBS dos veces por 3 min. Sumergir los vidrios en H<sub>2</sub>O destilada dos veces por 1 min. Colocar los vidrios en cámara húmeda. Agregar 2-5 gotas de substrato (vial 6), e incubar 60 min. Descartar el substrato y sumergir en H<sub>2</sub>O corriente durante 5 min.

La tinción y montaje se realizó utilizando hematoxilina-eosina durante 5-10 segundos y luego se montó con Dako Cytomation Glycergel incluido en el kit de ISH.

Finalmente, la lectura y análisis de láminas ISH se llevó a cabo con un microscopio de fluorescencia AXIO - ZEISS Scope A1-modelo de investigación. Las imágenes se digitalizarán con el software Snap camera u otro similar.

Determinación de genotipos 1 y 2 de VEB detectado por positividad a EBERs en las biopsias parafinadas de linfoma Hodgkin.

#### *4.6. Detección de genotipos 1 y 2 de VEB*

##### *4.6.1. Extracción de ADN:*

Previo a la extracción fue necesario realizar el proceso desparafinación de la biopsia como se describió para ISH, posteriormente se procedió al proceso de extracción del ADN utilizando el kit comercial kit de extracción QIAamp DNA mini kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando 4 secciones de tejido de 20 µm de espesor de cada una de las muestras

positivas a EBERs. El ADN extraído se conservará a -20°. Sin embargo, la cantidad obtenida no fue la idónea por lo que fue necesario utilizar el kit de extracción RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation (Invitrogen), alternativamente se planifico utilizara el PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), pero finalmente no fue necesario.

Control de calidad del ADN extraído: Se realizaron mediciones de concentración y análisis de calidad por espectrofotometría

#### *4.6.2. Detección de genotipos 1 y 2 de VEB por PCR convencional:*

Se realizo utilizando cebadores específicos de cepas para las secuencias de exones del gen EBNA-3C del VEB utilizados por Sample et al (Sample et al., 1990) comunes a las cepas de tipo 1 y 2 : 5'-AGA AGG GGA GCG TGT GTT GT-3 ' y 5'-GGC TCG TTT TTG ACG TCG GC a pesar de ser comunes éntrelos genotipos, los sitios de cebado flanqueaban regiones de variación específica de tipo, de modo que los fragmentos resultantes eran de diferentes tamaños: 153 pb y 246 pb para el tipo 1 y 2.

Para la reacción de la PCR convencional se empleó un volumen final de 20 µL, con las concentraciones finales siguientes:

Utilizando buffer Green GoTaq 1X, 1,5 mM MgCl, 0,3 mM dNTP's, 0,5 µM de cada cebador, 1 U de platinum Taq polimerasa y agregando 1 µL (~50 ng/uL) de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador eppendorf, usando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos y 72°C por 1 min; con una extensión final de 7 min a 72°C.

En el proceso de genotipificación se utilizaron controles positivos ya estandarizados para validar la amplificación del fragmento del gen viral EBNA3C utilizado para genotipificar VEB.

El control positivo fue ADN de VEB tipo 1 y 2 provisto por el Laboratorio de Virología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez a partir de línea celular B95-8 de VEB, como control negativo solo agua.

La secuencia de primers EBNA3C utilizada fue la siguiente F-AGAAGGGGAGCGTGTGTTGT y R-GGCTCGTTTTGACGTCGGC. Para la evaluación de presencia de inhibidores de la PCR y la degradación del ADN: se empleó como control interno la amplificación por PCR una región del gen que codifica para β-globina humana, a fin de comprobar la integridad del ADN extraído,

evaluar la presencia de inhibidores de la PCR o la degradación del ADN, para ello se realizó la amplificación de un fragmento de 110 pb del gen  $\beta$ -globina, usando los cebadores; 5'-GAA GAG GAG CCA AGG ACA GGT AC 3' y 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'.

La reacción de la PCR convencional fue realizada de manera simultánea con la muestra de linfoma con iguales condiciones (volumen final de 20  $\mu$ L utilizando concentraciones finales: buffer Green GoTaq 1X, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM dNTP's, 0,5  $\mu$ M de cada cebador, 1 U de platinum Taq polimerasa (BioTaq, Bioline) y agregando 1  $\mu$ L (~50 ng/uL) de ADN. Para la amplificación fue utilizado el termociclador eppendorf Cyclers, usando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos y 72°C por 1 min; con una extensión final de 7 min a 72°C).

El producto amplificado fue visualizado en un gel de agarosa al 1.8%. El gel se visualizará mediante un transiluminador UV.

#### *4.7. Materiales y equipo utilizado*

##### *4.7.1. Reactivos para IHS, PCR y electroforesis:*

Se utilizo el kit PNA ISH Detection de DAKO, MgCl<sub>2</sub> Xilol, Etanol 99% y 95%, Agua MQ, proteinasa K 10x (Marca: Dako Cytomation, No. Ref. K5201), hematoxilina, solución de montaje (Glycerol-Gelatin, Marca: Sigma, No. Cat. GG1-15ML), kits de extracción de ADN de sangre, fluidos y tejidos, primers oligonucleótidos para PCR, agua doblemente destilada (Agua miliQ), Platinum Taq ADN polimerasa, buffer para amplificación 10x PCR (15 mM MgCl<sub>2</sub>), 4dNTP mix 2.5 mM, agarosa de bajo peso molecular, Gel red para visualización de bandas de DNA, buffer de electroforesis para geles de ADN a 10x, buffer de carga para ADN y marcador de peso molecular (pares de bases) para ADN: 100bp DNA.

#### 4.7.2. Materiales para IHS, PCR y electroforesis:

Se utilizaron 3 cajas Coplin horizontales para tinción de laminillas con tapa de vidrio (Coplin Glass Horizontal Staining Jar with Glass Cover – BA001), 4 jarras Copling verticales, 1 cámara húmeda grande (de plástico con tapa), laminillas cargadas y cubreobjetos, micropipetas de variable volumen 0,5-2  $\mu$ l, 2-20  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l, 200-1000  $\mu$ l, 1000-5000  $\mu$ l, puntas con filtro para pipetas de variable volumen 2  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l, puntas sin filtro para pipetas de variable volumen 2  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l, 1000-5000  $\mu$ l, tubos para PCR con tapa, tubos con tapa de 1.5 a 2 ml y pluma hidrofóbica.

4.7.3. Equipos: Baño de maría, microscopio de fluorescencia AXIO - ZEISS Scope A1, termociclador Eppendorf para PCR a tiempo final, minicentrifugas de 12000 a 14000 RPM para tubos de 1.5 a 2 ml, equipo de electroforesis (fuente y carcasas para electroforesis), espectrofotómetro Eppendorf para cuantificar ácidos nucleicos, transiluminador para geles de agarosa, termomixes para tubos de 1.5 a 2 ml, cámara de flujo laminar, congelador a menos  $-80^{\circ}$ , congelador a  $-20^{\circ}$ , hieleras para transportar muestras y baño de maría con agitación.

4.7.4. Equipo informático: Laptop HP con intel i7, con Windows 10, RAM 16 GB con office 365.

## 5. Resultados

### 5.1. Características histológicas de las muestras estudiadas

Para el desarrollo de este proyecto de tesis, se utilizaron 8 muestras de ganglio con diagnóstico histopatológico de linfoma de Hodgkin, dos de las muestras se estudiaron por duplicado, una de las muestras se consideró inapropiada para continuar con los demás análisis. Debido a que no se tenía acceso a más datos clínicos patológicos de los pacientes, o si su estado era inmunosuprimido o inmunocompetente no se determinó el estadio clínico los linfomas.

Se utilizó hibridación in situ (ISH) para determinar los pequeños RNAs del virus de Epstein Barr (EBERs) sobre biopsias fijadas parafinadas de pacientes pediátricos con Linfoma Hodgkin, se ligaron EBERs con sondas de oligonucleótidos específicas marcadas con FITC, que luego se detectaron mediante incubación con anticuerpo anti-FITC conjugado con fosfatasa alcalina, lo que permitió determinar la presencia de VEB, pero además los tipos histológico ver tabla 1.

Cuadro 1: Histología y localización de todas las muestras de LH

Numero de muestra de LH(LHM)	Tipo histológico	Localización
LHM 1-A	Celularidad mixta	Ganglionar
LHM 1-B	Celularidad mixta	Ganglionar
LHM 2	Celularidad mixta	Ganglionar
LHM 3	Esclerosis nodular	Ganglionar
LHM 4	Celularidad mixta	Ganglionar
LHM 5	Celularidad mixta	Ganglionar
LHM 6	Celularidad mixta	Ganglionar
LHM 7-A	Celularidad mixta	Ganglionar
LHM 7-B	Celularidad mixta	Ganglionar
LHM 8	Tejido adiposo fibroso (muestra inapropiada)	Sin determinar

Resultado de estudio histológicos de la biopsia posterior al ISH, se observó 6 muestras con celularidad mixta, 1 con esclerosis nodular, y una muestra se catalogó como inapropiada.

## 5.2 Determinación de la presencia de VEB en las biopsias estudiadas

La hibridación in situ (ISH) es la técnica importante patrón para determinar la presencia de VEB en linfomas. Se observó tinción específica para los transcritos EBERs en el núcleo de las células tumorales en un porcentaje variable, representando las biopsias positivas a EBERs (Presencia de VEB) el 71.42% (N:5) y las negativas el 28.58%(N:3). Excluyendo la muestra inapropiada, el 100% de muestras se confirmó el diagnóstico de linfoma Hodgkin (ver tabla 2). Además, se logró determinar la presencia en los Linfomas Hodgkin la expresión de EBERs (demostrando la presencia de pequeños RNAs codificados por VEB (del inglés Epstein Barr Encoded RNAs) evidenciada por la marcación específica restringida al núcleo de las células tumorales y ausencia de la misma en los linfocitos, se pudieron observar células Reed Stenberg característica de LH y en una de las muestras se logró visualizar Popcorn cell o células en palomita de maíz positiva a EBERs que son células tumorales que también pueden observarse en LH (Ver figuras 2-8)

Cuadro 2:Hibridación in situ para pequeños AN virales -EBERs.

Numero de muestra de LH	Resultado EBERs, presencia de VEB	Linfoma Hodgkin
LHM 1-A	Negativo	Positivo
LHM 1-B	Negativo	Positivo
LHM 2	Negativo	Positivo
LHM 3	Positivo	Positivo
LHM 4	Positivo	Positivo
LHM 5	Positivo	Positivo
LHM 6	Positivo	Positivo
LHM 7-A	Positivo	Positivo
LHM 7-B	Positivo	Positivo
LHM 8	Sin determinar (Muestra inapropiada)	Sin determinar Muestra inapropiada

Resultado de hibridación in situ para pequeños ARN virales EBERs. Todas las muestras positivas a LH, 5 muestras positivas a ISH para VEB. Una muestra inapropiada.

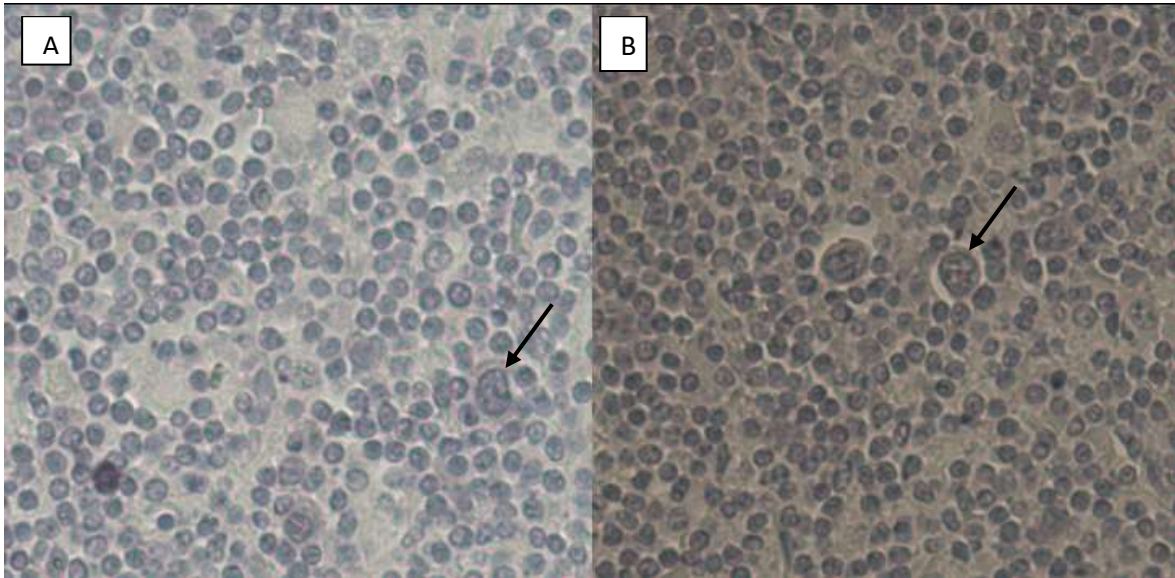


Figura 2: LHM 1-A (EBERs negativo, HODGKIN positivo)

A) 40X. Linfoma Hodgkin sin expresión de EBERs demostrada por ausencia de marcación específica restringida al núcleo de células tumorales y linfocitos adyacentes. B) 40X. En la segunda imagen se puede con mayor claridad la ausencia de marcación específica de células Hodgkin, sin expresión de EBERs.

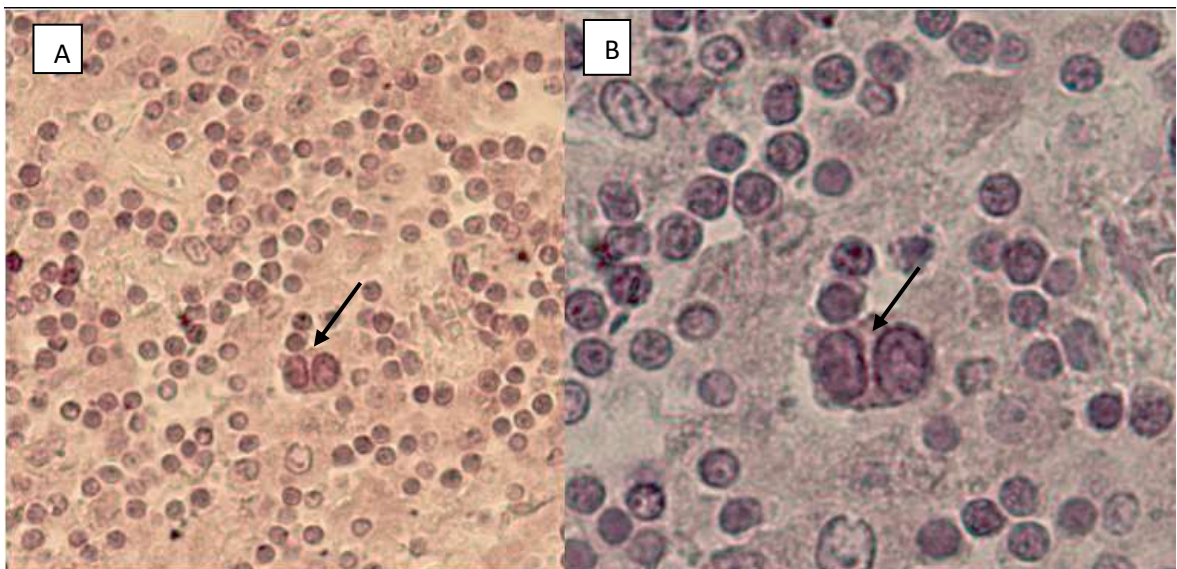


Figura 3: LHM 1-B (EBERs negativo, HODGKIN positivo)

A) 40X. Linfoma Hodgkin sin expresión de EBERs demostrada por la ausencia de marcación específica restringida al núcleo de células tumorales y linfocitos adyacentes. B) 100X. En la segunda imagen se puede observar se observa con mayor claridad célula de Reed-Sternberg característica de linfoma Hodgkin EBERs negativa.

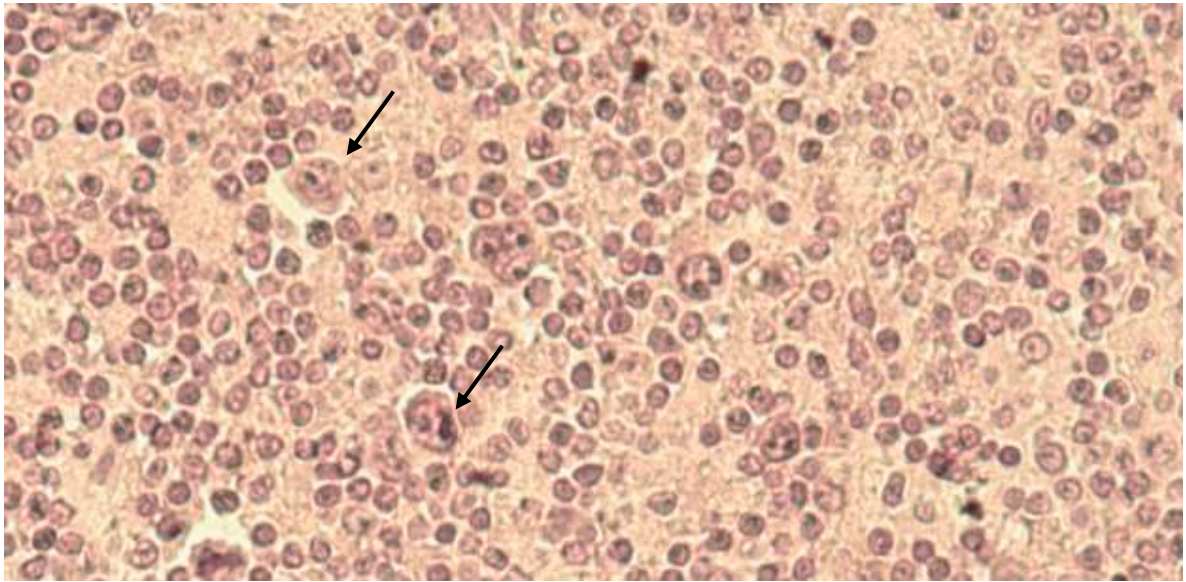


Figura 4: LHM 2 (EBERs negativo, HODGKIN positivo)

40X. Linfoma Hodgkin sin expresión de EBERs demostrada por la ausencia de marcación específica restringida al núcleo de las células tumorales y ausencia de la misma en los linfocitos adyacentes.

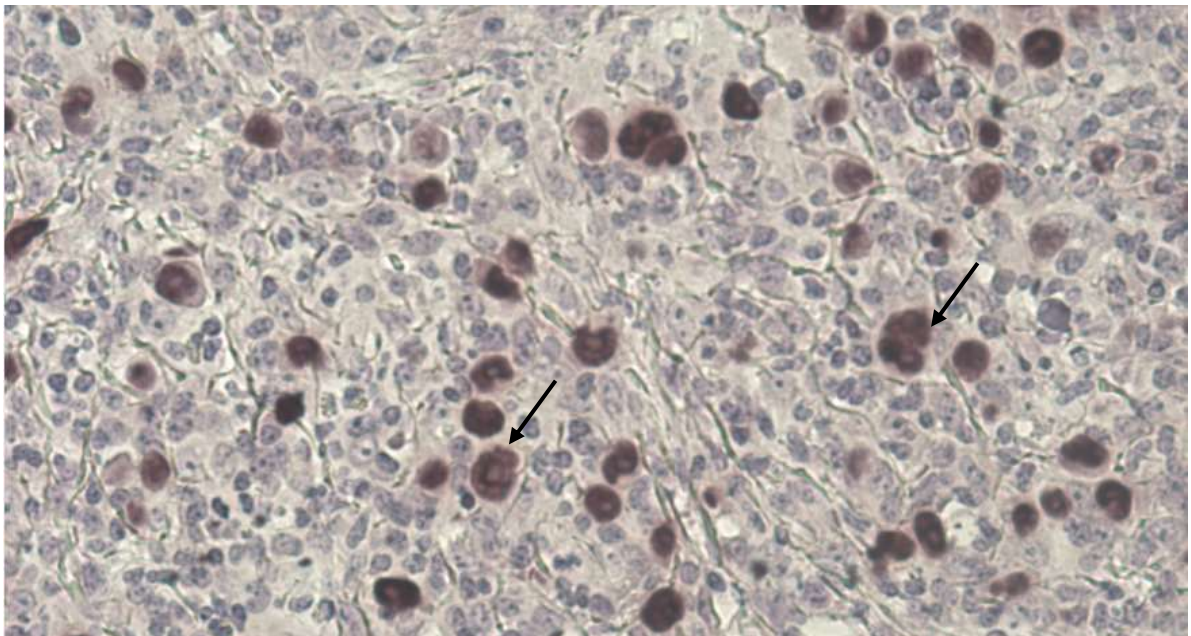


Figura 5: LHM 3 (EBERs positivo, HODGKIN positivo)

40X. Linfoma Hodgkin con expresión de EBERs demostrada por la marcación específica restringida al núcleo de las células tumorales y ausencia de la misma en los linfocitos, demostrando la presencia de pequeños RNAs codificados por VEB.

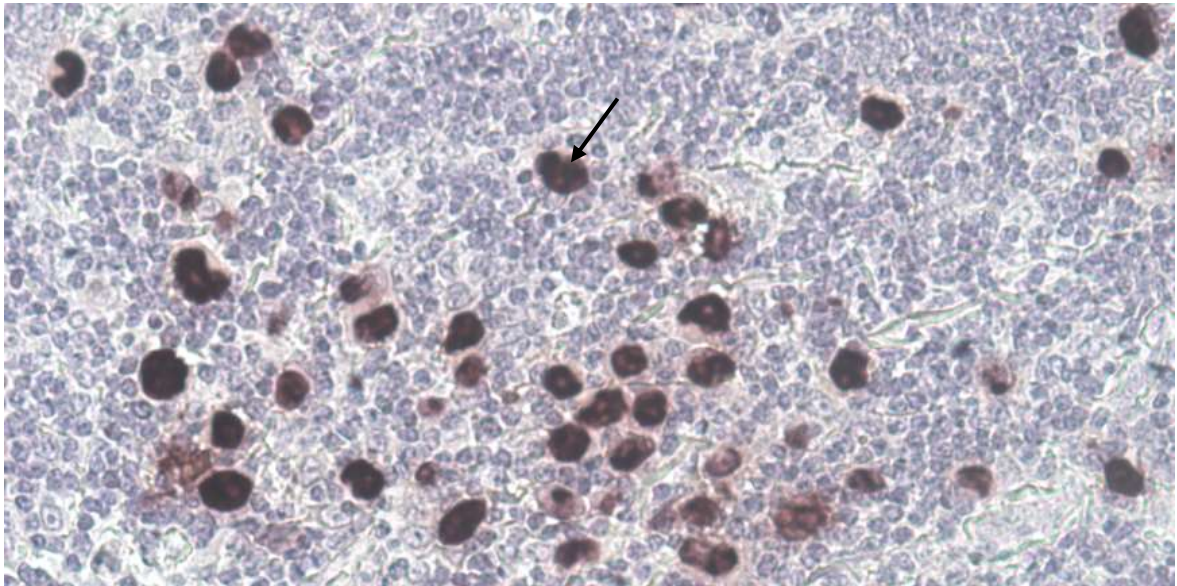


Figura 6:LHM 4 (EBERs positivo, HODGKIN positivo)

40X. Linfoma Hodgkin con expresión de EBERs demostrada por la marcación específica restringida al núcleo de las células tumorales y ausencia de la misma en los linfocitos, demostrando la presencia de pequeños RNAs codificados por VEB.

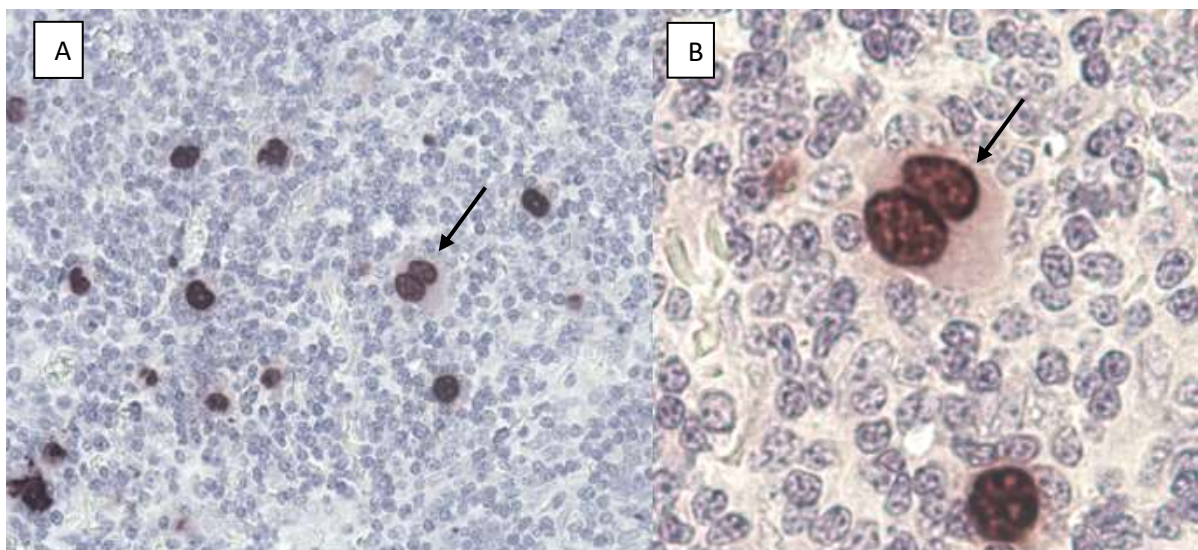


Figura 7:LHM 5 (EBERs positivo, HODGKIN positivo)

A)40X. Linfoma Hodgkin con expresión de EBERs demostrada por la marcación específica restringida al núcleo de las células tumorales y ausencia de la misma en los linfocitos, al centro célula Reed Stenberg característica demostrando la presencia de pequeños RNAs codificados por VEB. B) 100X al centro célula Reed Stenberg característica demostrando la presencia de pequeños RNAs codificados por VEB.

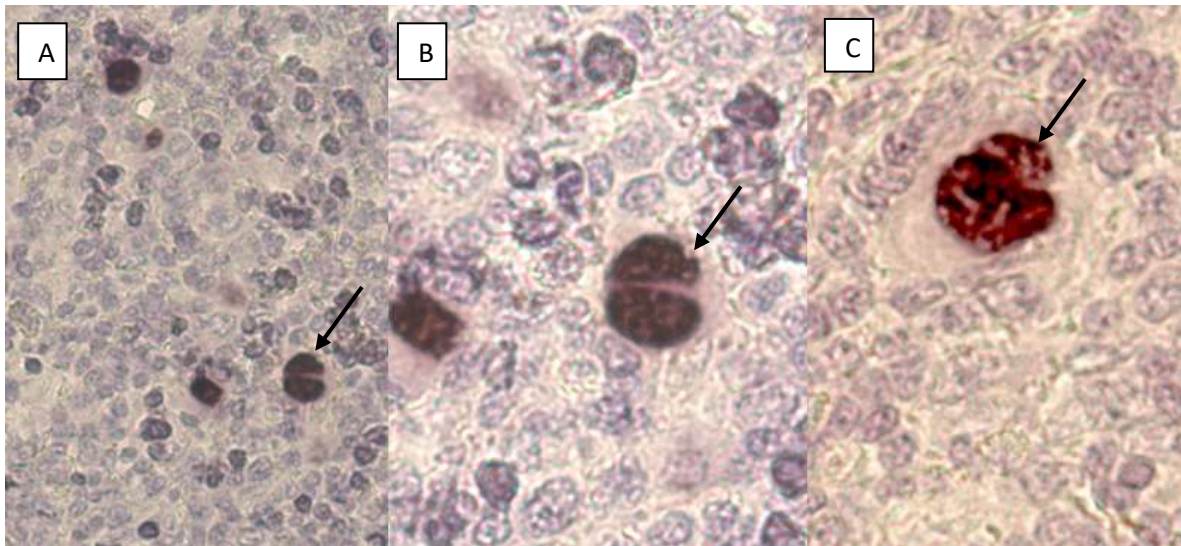


Figura 8:LHM6 (EBERs positivo, HODGKIN positivo)

A)40X. Linfoma Hodgkin con expresión de EBERs demostrada por la marcación específica restringida al núcleo de las células tumorales y ausencia de la misma en los linfocitos, al centro célula Reed Stemberg característica demostrando la presencia de pequeños RNAs codificados por VEB. B) 100X célula Reed Stemberg demostrando la presencia de pequeños RNAs codificados por VEB. C) 100X. Inusual Popcorn cell positiva a EBERs (células en palomita de maíz característica de un subtipo de linfoma LH).

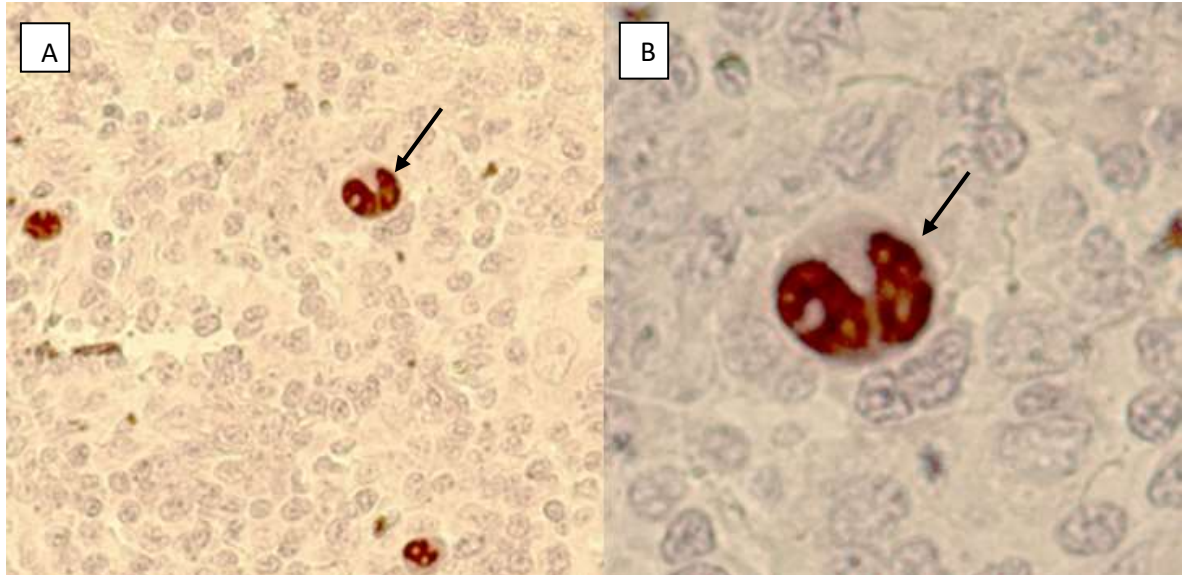


Figura 9: LHM7A (EBERs positivo, HODGKIN positivo)

A) 40X. Linfoma Hodgkin con expresión de EBERs demostrada por la marcación específica restringida al núcleo de las células tumorales y ausencia de la misma en los linfocitos, al centro célula Reed Stemberg característica demostrando la presencia de pequeños RNAs codificados por VEB. B) 100X al centro célula Reed Stemberg característica demostrando la presencia de pequeños RNAs codificados por VEB.

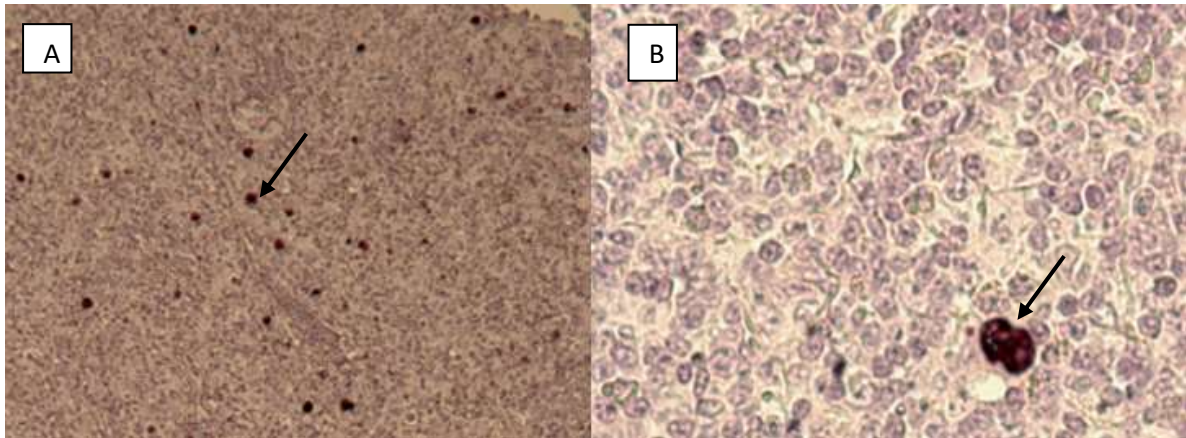


Figura 10:LHM7B (EBERs positivo, HODGKIN positivo)

A) 10X. Linfoma Hodgkin con expresión de EBERs demostrada por la marcación específica restringida al núcleo de las células tumorales y ausencia de la misma en los linfocitos. B) 40X célula Reed Sternberg característica demostrando la presencia de pequeños RNAs codificados por VEB.

### 5.3. Genotipificación de VEB

Como se señaló anteriormente se realizó la tipificación del virus de Epstein Barr (VEB) presente en seis muestras de tejido de Linfoma de Hodgkin EBERs positivos, en un primer ensayo se estudiaron 3 casos partiendo de 2 secciones de tejido fijado en formol e incluido en parafina y de 5  $\mu$ m de espesor. Se extrajo el ADN genómico total con el kit de extracción QIAamp DNA mini kit (Qiagen). Posteriormente se amplificó por PCR una región del gen que codifica para  $\beta$ -globina humana, a fin de comprobar la integridad del ADN extraído, y en paralelo una región polimórfica del gen viral EBNA3C con el objeto de tipificar el virus presente en las células tumorales. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1,8% (Figura 11).

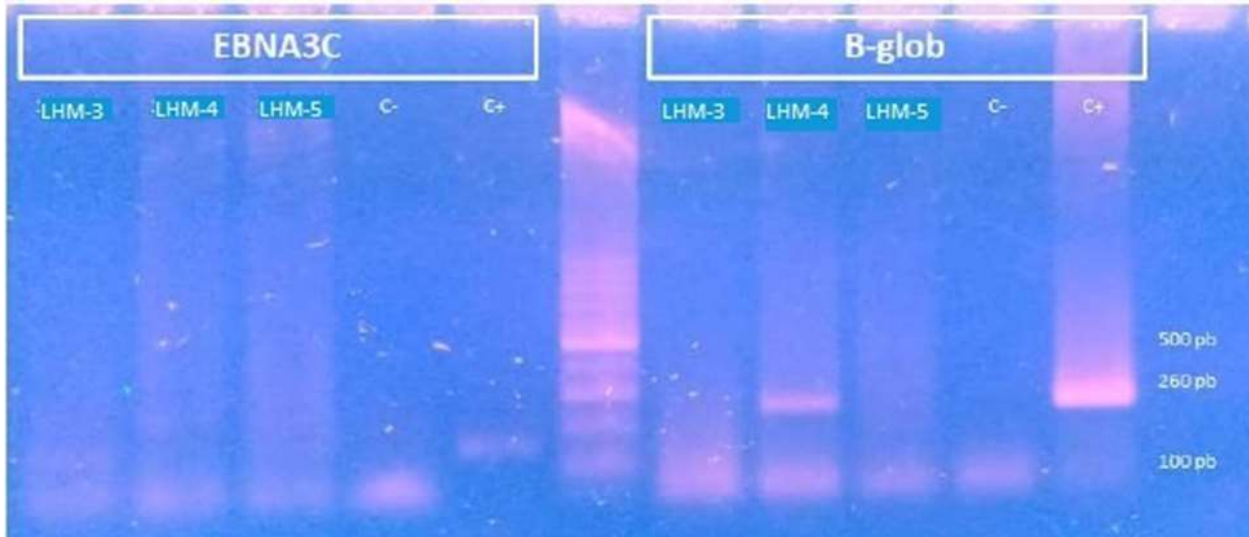


Figura 11: Primera genotipificación de VEB, sin amplificación de muestra de LH EBERs positivas Electroforesis en gel de agarosa 1.8% de productos amplificados por PCR para B-globina humana y EBNA3C viral.

En el caso del gen de B-globina humana, sólo se observó una banda de amplificación en una de las muestras (LHM-4). Por el contrario, en el caso de las muestras LHM-3 y LHM-5, no se observó la banda de amplificación esperada. Este último hecho, resalta que la cantidad y/o calidad del ADN extraído a partir de 2 secciones de 5  $\mu\text{m}$  de espesor de tejido fijado e incluido en parafina no resultó adecuada para la amplificación por PCR. En forma consecuente, no se logró amplificar el fragmento del gen viral EBNA3C en ninguno de los 3 casos estudiados. A fin de ensayar si el factor limitante para esta técnica fue la cantidad de ADN extraído, se repitió la extracción de ADN a partir de 4 secciones de tejido de 20  $\mu\text{m}$  de espesor, cada uno, con el kit de extracción RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation (Invitrogen). Se realizó nuevamente la PCR de tipificación viral, basada en la amplificación de la región polimórfica del gen EBNA3C y los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 1,8% (Figura 12). En este ensayo se observó amplificación específica en 3 casos: i) el caso LHM-5 produjo un amplicón de 153 pb, correspondiente a VEB1, ii) el caso LHM-3 produjo un amplicón de 246 pb, correspondiente a VEB2 y, iii) el caso LHM-4 produjo un amplicón de 153 pb. Los 3 casos restantes no produjeron amplicones correspondientes al gen EBNA3C. Este último hecho puede deberse a que el ADN se encuentra degradado producto de la fijación con formol y el proceso de inclusión en parafina.



Figura 12: Genotipos 1 y 2 en muestras de LH EBERs positivas

Electroforesis en gel de agarosa 1.8% de productos amplificados por PCR para EBNA3C viral. Muestra LHM-5 produjo un amplicón de 153 pb, correspondiente a VEB1, muestra LHM-3 produjo un amplicón de 246 pb, correspondiente a VEB2 y, muestra LHM-4 produjo un amplicón de 153 pb correspondiente a VEB1.

## 6. Discusión

El linfoma de Hodgkin clásico (LHC) en la población pediátrica presenta una asociación significativa con la infección latente por el virus de Epstein-Barr (VEB), especialmente en contextos de alta endemicidad viral, como los países de ingresos bajos y medios. En el presente estudio, se detectó expresión nuclear de los pequeños transcritos EBERs en el 71.42% de las muestras analizadas, lo que refuerza la relación estrecha entre la infección por VEB y la patogénesis del LHC en niños y población en general en entornos como EL Salvador (Shannon-Lowe & Rickinson, 2019; Smatti et al., 2018).

La técnica de hibridación in situ (ISH), utilizada para identificar la expresión de EBER1 y EBER2, en el caso particular del presente estudio permitió detectar EBER1 en células tumorales presentes en biopsias de LH parafinados, demostrando que a pesar de ser una técnica no reciente continúa siendo el método diagnóstico de referencia o Gold estándar para evidenciar la infección latente del virus en células tumorales. Su alta especificidad permitió una localización clara de la infección en por el Virus Epstein Barr el núcleo de las células Hodgkin y de Reed-Sternberg Hodgkin, lo que la convierte en una herramienta indispensable tanto para el diagnóstico como para la investigación epidemiológica (Begić et al., 2022; Haleem Abusalah, 2024).

Las altas tasas de positividad observadas en estudios realizados en América Latina y otras regiones con características socioeconómicas similares a las de El Salvador y la región de Centro América se han vinculado con una exposición temprana al virus, condiciones de hacinamiento y menor acceso a servicios de salud, lo que facilita la infección primaria por VEB durante la infancia (Murata et al., 2021; Shannon-Lowe & Rickinson, 2019). Este patrón epidemiológico contrasta con lo observado en países industrializados, donde la infección suele adquirirse en etapas más tardías de la vida como adolescencia y adultez, observándose que asociación entre VEB y LHC es menos frecuente (Shannon-Lowe & Rickinson, 2019; Smatti et al., 2018).

En el plano molecular, se ha demostrado que la infección por VEB promueve la activación de vías oncogénicas en las células hospedadoras, como NF- $\kappa$ B y JAK/STAT, a través de la expresión de proteínas virales latentes como LMP1 producto de la infección latente tipo II (Murata et al., 2021; Yu & Robertson, 2023).

En el caso del Linfoma Hodgkin VEB positivo se caracteriza por un perfil de expresión de latencia II, observándose proteínas EBNA-1, EBNA-LP, proteína de membrana latente (LMP) -1, -2A y -2B, EBER y BART (Hui et al., 2019). A pesar que en el presente estudio no se evaluaron todos los marcadores característicos de latencia II en LH, el criterio fundamental para establecer la asociación del VEB con el LH es la presencia de transcriptos como EBER1 y antígenos virales en las células RS (Alejandro, 2012).

Es importante señalar que los transcriptos EBER, se expresan a niveles tan altos (alrededor de un millón de copias por célula infectada de forma latente) se consideran el mejor marcador natural de infección latente. Aunque en diversos estudios la positividad a VEB es del 40% en linfoma de Hodgkin todos los subtipos, en el Linfoma de Hodgkin, celularidad mixta es del 70%, Linfoma de Hodgkin, esclerosis nodular 20% (Gulley & Tang, 2008), coincidiendo con los presentes resultados ya que de los 5 casos LH positivos, 4 correspondieron a Linfoma de Hodgkin, celularidad mixta y un caso a Linfoma de Hodgkin, esclerosis nodular, lo cual demuestra la fuerte asociación y reproducibilidad entre la técnica utilizada para diagnosticar la positividad de VEB en la presente investigación y los resultados de otros estudios en regiones y poblaciones con características similares a las de la población infantil estudiada, por lo que a pesar que el estudio solo se enfocó en la detección de EBERs, su presencia demostró que es un marcador confiable de infección latente tipo II, típicamente observada en linfomas VEB-positivos (Shannon-Lowe & Rickinson, 2019; Yu & Robertson, 2023).

Pero quizá igual o más importante que la utilidad de utilizar EBERs para demostrar la presencia de VEB en LH; es las implicaciones de los EBERs en el desarrollo del cáncer y su pronóstico, ya que como se señaló anteriormente estos pequeños ARNs de manera particular, EBERs1 suprime la transcripción de p21 cip1 / waf1 y confiere resistencia a la apoptosis inducida por fármacos en líneas celulares HL mediante la regulación a la baja de p53, EGR1 y STAT1 contribuyendo a la inmortalidad celular, observándose este fenómeno en líneas celulares de Linfoma Hodgkin EBERs1 positivas, las cuales eran más resistentes a la apoptosis inducida por inhibidores de histona desacetilasa o inhibidores de la proteasoma. Biológicamente, esta actividad anti-apoptótica podría ser importante en el rescate de células de Reed-Sternberg y en el mantenimiento de la fase latente (H. Li et al., 2025; Samanta & Takada).

Adicionalmente al aporte que EBERs realiza en la oncogénesis también los LH VEB positivos tenían una expresión más débil de p21 cip1 / waf1 y clínicamente, la supresión de p21 cip1 / waf1

en Linfoma Hodgkin VEB positivo predice un peor pronóstico, y la posibilidad de una mayor resistencia a la apoptosis inducida por fármacos, contexto que podría tener implicaciones terapéuticas y en los comportamientos clínicos de los HL(H. Li et al., 2025; Samanta & Takada, 2010; Shannon-Lowe et al., 2017 ; Liu et al., 2010)

Es importante sin embargo señalar que el significado pronóstico de la positividad a VEB en linfomas pediátricos aún no está claramente establecido, en algunos estudios se sugiere que podría asociarse con una mejor respuesta inmunológica al tratamiento, mientras que otros señalan una mayor agresividad clínica en pacientes inmunocomprometidos, aunque estas diferencias podrían explicarse por el impacto del contexto inmunológico del huésped y el subtipo histológico del linfoma (Mautner, 2018; Zhang et al., 2023).

Finalmente, el conocimiento de la presencia de VEB en LH y otros tumores linfoides tiene actualmente implicaciones terapéuticas crecientes, ya que se están desarrollando inmunoterapias dirigidas contra antígenos virales como EBNA1 y LMP1, lo que abre la posibilidad de tratamientos más específicos para pacientes con tumores VEB-positivos (Zhang et al., 2023). En este sentido, la incorporación sistemática de ISH para VEB en el abordaje diagnóstico de LH en El Salvador podría tener un impacto importante en valor pronóstico y terapéutico adicional.

Adicionalmente la identificación molecular de los genotipos del virus de Epstein-Barr (VEB) mediante la amplificación del gen EBNA3C constituye una herramienta eficaz para distinguir entre VEB1 y VEB2, los dos principales genotipos del virus. En este estudio por primera vez en El Salvador, se identificaron dos muestras (LHM-5 y LHM-4) con un amplicón de 153 pb, lo que corresponde al genotipo VEB1, y una muestra (LHM-3) con un amplicón de 246 pb, característico de VEB2.

Diversos estudios globales reportan una alta prevalencia de VEB1 en regiones como América Latina, Asia y Europa, mientras que VEB2 se detecta con mayor frecuencia en poblaciones de África y en personas inmunocomprometidas, pero otros estudios han demostrado que la coexistencia de ambos genotipos en poblaciones con características similares a nuestra población no solo es posible sino también frecuente (Zealiyas et al., 2023; Zhang et al., 2023).

Es muy importante también enfatizar que el gen EBNA3C utilizado en el estudio para genotipificación, ha sido ampliamente usado para estudios de genotipificación en investigaciones en Europa, Asia, Norte y Sur América debido a las regiones altamente polimórficas del gen

EBNA3C, lo que permite una discriminación precisa entre los tipos virales (Begić et al., 2022; Zanella et al., 2019). Pero estas diferencias moleculares no solo tienen implicaciones taxonómicas, sino también clínicas, dado que se ha descrito que VEB1 posee una mayor capacidad transformante sobre linfocitos B, mientras que VEB2, aunque menos transformante, puede prevalecer en pacientes inmunosuprimidos, como aquellos con VIH o sometidos a trasplante (Mautner, 2018; Zealiyas et al., 2023).

Por lo tanto, la presencia simultánea demostrada de ambos genotipos en este análisis resalta la importancia de monitorear las variaciones genéticas del virus, ya que podrían estar asociadas a diferencias en la capacidad patogénica y en la presentación clínica de las enfermedades relacionadas con VEB.

Por último, en el contexto centroamericano, aún existe una escasez de estudios que caractericen los genotipos del VEB en poblaciones locales, a pesar de la alta carga de enfermedades oncológicas asociadas al virus, como el linfoma de Hodgkin y otros linfomas no Hodgkin. Esta limitación representa una oportunidad para futuras investigaciones que permitan establecer perfiles moleculares regionales del VEB, analizar su asociación con factores clínicos e inmunológicos, y contribuir a una mejor comprensión de su papel en la etiopatogenia de enfermedades virales y neoplásicas. Además, conocer la distribución de genotipos en Centroamérica podría facilitar el desarrollo de estrategias diagnósticas más adaptadas a la realidad epidemiológica de la región.

En definitiva, la diversidad genotípica observada en este análisis subraya la relevancia de incorporar técnicas de biología molecular en los estudios clínicos y epidemiológicos sobre VEB, particularmente en regiones como Centroamérica donde los datos aún son limitados pero necesarios para una vigilancia efectiva y una atención médica más personalizada.

## 7. Conclusiones

- A pesar del tamaño de la muestra se confirmó presencia del virus de Epstein-Barr (VEB) en los casos pediátricos de linfoma de Hodgkin clásico (LHC) estudiados, con un 71.42% de positividad para EBERs, lo que evidencia una asociación significativa entre la infección latente por VEB y el desarrollo de esta neoplasia en regiones con alta circulación viral como Centroamérica.
- La técnica de hibridación in situ (ISH) demostró ser un método confiable y preciso para detectar la infección latente por VEB en tejidos tumorales, consolidándose como un recurso indispensable en el diagnóstico y en estudios epidemiológicos.
- La presencia simultánea de los genotipos VEB1 y VEB2 en la población analizada, coincide con los patrones reportados en otras regiones de Latinoamérica, lo que indica diversidad viral en el contexto local.
- Estos hallazgos tienen relevancia clínica y terapéutica, especialmente con el avance de inmunoterapias dirigidas contra antígenos virales, lo que resalta la importancia de integrar el análisis de VEB en el manejo de linfomas pediátricos.

## **8. Limitaciones del estudio**

- La cantidad limitada de muestras analizadas puede restringir la extrapolación de los resultados a toda la población pediátrica afectada por LHC en la región.
- La carencia de información clínica detallada sobre la condición inmunológica y evolución de los pacientes dificulta la evaluación de la relación entre la infección por VEB y el pronóstico.
- El diseño transversal del estudio impide establecer una relación causal definitiva entre la infección viral y el desarrollo del linfoma.
- No se llevaron a cabo análisis adicionales de proteínas virales, como LMP1 o EBNA1, que podrían aportar información valiosa sobre el comportamiento del virus en las células malignas.

## **9. Recomendaciones**

- En futuros estudios sería importante ampliar el número de casos y abarcar distintas localidades centroamericanas para obtener datos más representativos y sólidos sobre la epidemiología del VEB.
- Es importante incorporar variables clínicas e inmunológicas en futuros estudios para profundizar en la comprensión del impacto de VEB en la evolución de la enfermedad.
- Se recomienda incluir técnicas moleculares complementarias que permitan evaluar la expresión de proteínas virales y otros marcadores que contribuyan a entender mejor la oncogénesis viral.
- Fortalecer los sistemas de vigilancia regional para el virus de Epstein-Barr en pacientes pediátricos con neoplasias hematológicas, con el fin de mejorar la vigilancia y manejo clínico.
- Promover investigaciones que exploren la interacción entre factores sociales, genéticos y biológicos en el desarrollo del LHC asociado a VEB, con el objetivo de optimizar estrategias preventivas y terapéuticas.

## 10. Referencias

- Alejandro, M. (2012). *Caracterización de variantes del virus de Epstein Barr en la infección aguda en pacientes pediátricos y su comparación con linfomas pediátricos EBV +*.
- Ambinder, R. F., & Mann, R. B. (1994). Detection and characterization of Epstein-Barr virus in clinical specimens. *American Journal of Pathology*, *145*(2), 239–252.
- Arturo-Terranova, D., Giraldo-Ocampo, S., & Castillo, A. (2020). Caracterización molecular de las variantes del virus de Epstein-Barr detectadas en la cavidad oral de adolescentes de Cali, Colombia. *Biomédica*, *40*(Supl. 1), 76–88. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4917>
- Begić, V., Korać, P., Gašparov, S., Rozman, M., Simicic, P., & Zidovec-Lepej, S. (2022). Molecular Characterisation of Epstein–Barr Virus in Classical Hodgkin Lymphoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(24). <https://doi.org/10.3390/ijms232415635>
- Beltramino, M., Calmet, R., & Gatica Valdes, M. (2005). Virus de Epstein-Barr y su relación con el desarrollo de enfermedades linfoproliferativas. *Hematología (B. Aires)*, *8*, 39–54.
- Bröckelmann, P. J., Eichenauer, D. A., Jakob, T., Follmann, M., Engert, A., & Skoetz, N. (2018). Clinical practice guideline: Hodgkin lymphoma in adults—diagnosis, treatment, and follow-up. *Deutsches Arzteblatt International*, *115*(31–32), 535–540. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0535>
- Chang, C. M., Yu, K. J., Mbulaiteye, S. M., 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 Research*, *143*(2), 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.07.005>
- Chang, Y., Moore, P. S., & Weiss, R. A. (2017). Human oncogenic viruses: Nature and discovery. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *372*(1732). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0264>
- Chen, J., Sathiyamoorthy, K., Zhang, X., Schaller, S., Perez White, B. E., Jardetzky, T. S., & Longnecker, R. (2018). Ephrin receptor A2 is a functional entry receptor for Epstein-Barr virus. *Nature Microbiology*, *3*(2), 172–180. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0081-7>
- Codina, J. S. D. T., & Álvarez, C. S. (2016). Linfoma de Hodgkin y no Hodgkin. *Pediatría Integral*, 390–400.

- Epstein, M. A., Achong, B. G., Barr, Y. M., Nat ; Morgan, C., Rose, H. M., Holden, M., Jones, E. P., Hummeler, K., Berkaloff, A., & Holt, S. (1963). Cancer Inst. Monogr. (in the press). *exp. Med.* 1954, 100, 195. *J. J. Cell. Biol.*, 19(cm), 337.
- Epstein, M. A., & Barr, Y. M. (1964). Cultivation in Vitro of Human Lymphoblasts From Burkitt'S Malignant Lymphoma. *The Lancet*, 283(7327), 252–253.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(64\)92354-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(64)92354-2)
- Farrell, P. J., & Farrell, P. J. (2025). *Epstein – Barr virus functional RNAs as part of its immune evasion strategy : a role for EBER1 ? December.*  
<https://doi.org/10.1098/rsob.250088/2811425/rsob.250088.pdf>
- Fok, V., Friend, K., & Steitz, J. A. (2006a). Epstein-Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *Journal of Cell Biology*, 173(3), 319–325. <https://doi.org/10.1083/jcb.200601026>
- Fok, V., Friend, K., & Steitz, J. A. (2006b). Epstein-Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *Journal of Cell Biology*, 173(3), 319–325. <https://doi.org/10.1083/jcb.200601026>
- Gulley, M. L., & Tang, W. (2008). Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *Journal of Molecular Diagnostics*, 10(4), 279–292.  
<https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.080023>
- Haleem Abusalah, et al. (2024). Recent Advances in Diagnostic Approaches for Epstein–Barr Virus. *Journal Pathogens*, 10(10), 1–17.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/pathogens9030226>
- Higuchi, H., Yamakawa, N., Imadome, K. I., Yahata, T., Kotaki, R., Ogata, J., Kakizaki, M., Fujita, K., Lu, J., Yokoyama, K., Okuyama, K., Sato, A., Takamatsu, M., Kurosaki, N., Alba, S. M., Azhim, A., Horie, R., Watanabe, T., Kitamura, T., ... Kotani, A. (2018). Role of exosomes as a proinflammatory mediator in the development of EBV-associated lymphoma. *Blood*, 131(23), 2552–2567. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-794529>
- Huang, W., Bai, L., & Tang, H. (2023). Epstein-Barr virus infection: the micro and macro worlds. *Virology Journal*, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02187-9>
- Hui, K. F., Yiu, S. P. T., Tam, K. P., & Chiang, A. K. S. (2019). Viral-targeted strategies against

- EBV-associated lymphoproliferative diseases. *Frontiers in Oncology*, 9(FEB), 1–18.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00081>
- Iwakiri, D. (2014). Epstein-Barr virus-encoded RNAs: Key molecules in viral pathogenesis. *Cancers*, 6(3), 1615–1630. <https://doi.org/10.3390/cancers6031615>
- Iwakiri, D., Zhou, L., Samanta, M., Matsumoto, M., Ebihara, T., Seya, T., Imai, S., Fujieda, M., Kawa, K., & Takada, K. (2009). Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from toll-like receptor 3. *Journal of Experimental Medicine*, 206(10), 2091–2099. <https://doi.org/10.1084/jem.20081761>
- Jarrett, R. F., Stark, G. L., White, J., Angus, B., Alexander, F. E., Krajewski, A. S., Freeland, J., Taylor, G. M., & Taylor, P. R. A. (2006). Impact of tumor EBV status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma [4]. *Blood*, 107(3), 1241. [https://doi.org/10.1016/S0006-4971\(20\)68456-7](https://doi.org/10.1016/S0006-4971(20)68456-7)
- Junker, A. K. (2005). Epstein-Barr virus. *Pediatrics in Review*, 26(3), 79–85.  
<https://doi.org/10.1542/pir.26-3-79>
- Ko, Y. H. (2015). Editorial: EBV and human cancer. *Experimental and Molecular Medicine*, 47(1), e130–3. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.109>
- Kwok, H., Tong, A. H. Y., Lin, C. H., Lok, S., Farrell, P. J., Kwong, D. L. W., & Chiang, A. K. S. (2012). Genomic sequencing and comparative analysis of Epstein-Barr virus genome isolated from primary nasopharyngeal carcinoma biopsy. *PLoS ONE*, 7(5), 1–10.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036939>
- Levine, P. H., Ablashi, D. V., Berard, C. W., Carbone, P. P., Waggoner, D. E., & Malan, L. (1971). Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Cancer*, 27(2), 416–421. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197102\)27:2<416::AID-CNCR2820270227>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197102)27:2<416::AID-CNCR2820270227>3.0.CO;2-W)
- Li, H., Lee, C. Y., & Delecluse, H. J. (2025). Epstein–Barr virus lytic replication and cancer. *Current Opinion in Virology*, 70, 101438. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2024.101438>
- Li, Z., Zhang, X., Dong, L., Pang, J., Xu, M., Zhong, Q., Zeng, M. S., & Yu, X. (2020). CryoEM structure of the tegumented capsid of Epstein-Barr virus. *Cell Research*, 30(10), 873–884.  
<https://doi.org/10.1038/s41422-020-0363-0>

- Lieberman, P. M. (2014). Virology. Epstein-Barr virus turns 50. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6177), 1323–1325. <https://doi.org/10.1126/science.1252786>
- Liu, T. Y., Wu, S. J., Huang, M. H., Lo, F. Y., Tsai, M. H., Tsai, C. H., Hsu, S. M., & Lin, C. W. (2010). EBV-positive Hodgkin lymphoma is associated with suppression of p21cip1/waf1 and a worse prognosis. *Molecular Cancer*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-32>
- Mautner, J. (2018). Clinical implications of Epstein-Barr virus strain diversity. *Journal of Immunological Sciences*, 2(3), 51–55. <https://doi.org/10.29245/2578-3009/2018/3.1145>
- Moreno-Laguard, Y., Laguna-Salvia, L., Larquin-Comet, J. I., León-Ramentol, C. C., Hernandez-Soler, Y. F., & González-Basulto, M. J. (2019). Criterios diagnósticos y nuevas opciones terapéuticas para los pacientes con diagnóstico de linfoma no Hodgkin. *Archivo Médico de Camagüey*, 23(3), 415–426.
- Murata, T., Sugimoto, A., Inagaki, T., Yanagi, Y., Watanabe, T., Sato, Y., & Kimura, H. (2021). Molecular basis of Epstein-Barr virus latency establishment and lytic reactivation. *Viruses*, 13(12), 1–20. <https://doi.org/10.3390/v13122344>
- Nagpal, P., Akl, M. R., Ayoub, N. M., Tomiyama, T., Cousins, T., Tai, B., Carroll, N., Nyrenda, T., Bhattacharyya, P., Harris, M. B., Goy, A., Pecora, A., & Suh, S. S. (2016). Pediatric Hodgkin lymphoma- biomarkers, drugs, and clinical trials for translational science and medicine. *Oncotarget*, 7(41), 67551–67573. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11509>
- Nouri-Aria, K. T. (2008). In situ Hybridization. *Methods in Molecular Medicine*, 138(1), 331–347. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-366-0\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-366-0_27)
- Patel, P. G., Selvarajah, S., Boursalieu, S., How, N. E., Ejdelman, J., Guerard, K. P., Bartlett, J. M., Lapointe, J., Park, P. C., Okello, J. B. A., & Berman, D. M. (2016). Preparation of formalin-fixed paraffin-embedded tissue cores for both RNA and DNA extraction. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(114), 1–10. <https://doi.org/10.3791/54299>
- Possomato-Vieira, José S. and Khalil, R. A. K. (2016). Update on the classification of T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. *Physiology & Behavior*, 176(12), 139–148. <https://doi.org/10.1080/17474086.2019.1647777>.Update
- Pratt, Z. L., Kuzembayeva, M., Sengupta, S., & Sugden, B. (2009). The microRNAs of Epstein-

- Barr Virus are expressed at dramatically differing levels among cell lines. *Virology*, 386(2), 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.01.006>
- Samanta, M., & Takada, K. (2010). Modulation of innate immunity system by Epstein-Barr virus-encoded non-coding RNA and oncogenesis. *Cancer Science*, 101(1), 29–35. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01377.x>
- Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E., Rickinson, A., & Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *Journal of Virology*, 64(9), 4084–4092. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.9.4084-4092.1990>
- Seifert, M., Scholtysik, R., & Küppers, R. (2019). Origin and pathogenesis of B cell lymphomas. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1956). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9151-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9151-8_1)
- Shannon-Lowe, C., & Rickinson, A. (2019). The Global Landscape of EBV-Associated Tumors. *Frontiers in Oncology*, 9(August), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00713>
- Shannon-Lowe, C., Rickinson, A. B., & Bell, A. I. (2017). Epstein-barr virus-associated lymphomas. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1732). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0271>
- Skalsky, R. L., & Cullen, B. R. (2015). EBV Noncoding RNAs. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 391, 181–217. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_6)
- Smatti, M. K., Al-Sadeq, D. W., Ali, N. H., Pintus, G., Abou-Saleh, H., & Nasrallah, G. K. (2018). Epstein-barr virus epidemiology, serology, and genetic variability of LMP-1 oncogene among healthy population: An update. *Frontiers in Oncology*, 8(JUN). <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00211>
- Song, H., Lim, Y., Im, H., Bae, J. M., Kang, G. H., Ahn, J., Baek, D., Kim, T. Y., Yoon, S. S., & Koh, Y. (2019). Interpretation of EBV infection in pan-cancer genome considering viral life cycle: LiEB (Life cycle of Epstein-Barr virus). *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39706-0>
- Steidl, C., Connors, J. M., & Gascoyne, R. D. (2011). Molecular pathogenesis of hodgkin's lymphoma: Increasing evidence of the importance of the microenvironment. *Journal of Clinical Oncology*, 29(14), 1812–1826. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.8401>

- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D., & Jaffe, E. S. (2020). *La revisión de 2016 de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de las neoplasias linfoides* □. *127(20)*, 2020.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Lee Harris, N., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D., & Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, *127(20)*, 2375–2390. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>
- Tinoco Racero, I., Caro Gómez, N., Rodríguez Leal, C., & López Tinoco, E. (2014). Infecciones por el virus de Epstein-Barr y citomegalovirus. *Medicine (Spain)*, *11(50)*, 2954–2964. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(14\)70722-X](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70722-X)
- Yu, H., & Robertson, E. S. (2023). Epstein–Barr Virus History and Pathogenesis. *Viruses*, *15(3)*. <https://doi.org/10.3390/v15030714>
- Zanella, L., Riquelme, I., Buchegger, K., Abanto, M., Ili, C., & Brebi, P. (2019). A reliable Epstein-Barr Virus classification based on phylogenomic and population analyses. *Scientific Reports*, *9(1)*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45986-3>
- Zealiyas, K., Teshome, S., Haile, A. F., Weigel, C., Alemu, A., Amogne, W., Yimer, G., Abebe, T., Berhe, N., Ahmed, E. H., & Baiocchi, R. A. (2023). Genotype characterization of Epstein–Barr virus among adults living with human immunodeficiency virus in Ethiopia. *Frontiers in Microbiology*, *14*(October). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1270824>
- Zhang, Y., Lyu, H., Guo, R., Cao, X., Feng, J., Jin, X., Lu, W., & Zhao, M. (2023). Epstein–Barr virus–associated cellular immunotherapy. *Cytotherapy*, *25(9)*, 903–912. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2023.04.003>
- Zuo, L.-L., Zhu, M.-J., Du, S.-J., Lu, J.-H., & Li, G.-Y. (2014). [The entry of Epstein-Barr virus into B lymphocytes and epithelial cells during infection]. *Bing Du Xue Bao = Chinese Journal of Virology*, *30(4)*, 476–482.