



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

RELACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS EPSTEIN-
BAR COMO MARCADOR PREDICTIVO EN LA ENFERMEDAD
LINFOPROLIFERATIVA POSTRASPLANTE HEPÁTICO

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALIDAD EN

INFECTOLOGÍA

PRESENTA

DR. JORGE ISRAEL HERNANDEZ BLANQUEL

TUTOR

DRA. MARGARITA NAVA FRÍAS

ASESORES

DR. JOSÉ ARELLANO GALINDO

DR. JESUS CASASOLA FORES

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2010

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

65 AÑOS DE EXCELENCIA EN PEDIATRÍA
Salud para las Nuevas Generaciones



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**RELACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL VIRUS EPSTEIN-BAR COMO
MARCADOR PREDICTIVO EN LA ENFERMEDAD
LINFOPROLIFERATIVA POSTRASPLANTE HEPÁTICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA

PRESENTA

Dr. JORGE ISRAEL HERNÁNDEZ BLANQUEL

TUTOR DE TESIS

Dra. MARGARITA NAVA FRÍAS
Jefe Departamento de Infectología Pediátrica
Hospital Infantil de México Federico Gómez
ASESORES DE TESIS

Dr. JOSÉ ARELLANO GALINDO
Investigador de Ciencias Médicas
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr. JESUS CASASOLA FLORES
Jefe Departamento de Virología
Hospital Infantil de México Federico Gómez

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2010

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios que me ha permitido ser parte de sus herramientas en el cuidado de lo más preciado de su reino... los niños...

Agradezco a mi familia, que si bien es pequeña, su apoyo y fuerza equivalen a cien ejércitos implacables e invencibles.

Al abrir esta hoja sientan suyo este triunfo obtenido porque son parte fundamental de éste.

Agradezco a mi tutora y mis asesores, su luz en este proyecto ha sido la mejor guía que pude haber encontrado en mi camino.

Agradezco a vos mujer, si a vos... las palabras no dichas, las obras inacabadas y el destiempo, no deben existir... gracias por todo tu apoyo...

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	2
MARCO CONCEPTUAL	3
JUSTIFICACIÓN	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
OBJETIVO	14
LIMITACIONES DE ESTUDIO	15
RESULTADOS	16
TABLAS Y GRAFICAS	17
DISCUCIÓN	26
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFIA	31

“Relación de la carga viral del virus Epstein-Barr como marcador predictivo en la Enfermedad Linfoproliferativa Postrasplante Hepático”

ANTECEDENTES

Las enfermedades linfoproliferativas (ELPT) son un grupo heterogéneo de trastornos linfoides que pueden desarrollarse en pacientes sometidos a trasplantes de órganos sólidos. La incidencia oscila entre un 2 en adultos y 10 % en niños y alcanzan una mortalidad de entre el 40 y el 70 %.La amplia gama de presentaciones clínicas van desde un Síndrome de Mononucleosis y Linfadenopatía, masas hasta Disfunción Orgánica Múltiple. Los riesgos identificados en pacientes pediátricos post trasplantados son, las edades tempranas, el uso de Tacrolimus, la carga viral alta y una respuesta inmune celular baja concomitante.

OBJETIVOS: Describir la relación entre la carga viral de VEB como marcador predictivo de la presencia de ELPT y las características clínicas de los pacientes postrasplantados de hígado en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” en el periodo enero del 2005 a enero a 2008.

METODOS: Descriptivo, Retrolectivo y Observacional de una Serie de Casos.

RESULTADOS: De enero 2005 a enero 2008 se realizaron 9 trasplantes hepáticos, 3 fueron por serología para EBV D-/R+ (alto riesgo por serología), de los cuales uno desarrollo ELPT a las 100 semanas postrasplante con carga viral de 1450 genomas/mL de plasma. El tiempo de reactivación de la infección por EBV en promedio para los 9 pacientes fue de 3.3 semanas postrasplante. Siete pacientes pertenecieron al grupo etario < 5 años (alto riesgo por edad) de los cuales 4 desarrollaron ELPT con cargas virales > 800 genomas/mL de plasma. Cinco de nueve pacientes desarrollaron ELPT diagnosticada por biopsia hepática e inmunohistoquímica. Todos los pacientes

presentaron elevación de enzimas hepáticas en más de 4 veces su valor basal, 2 pacientes presentaron linfocitos atípicos en el momento del diagnóstico de ELPT y 3 monocitosis. Dos pacientes presentaron clínica de mononucleosis-like y 3 fueron asintomáticos en el momento del diagnóstico de ELPT con cargas virales de >900 genomas/mL. El paciente número 9 presentó dos eventos de ELPT con diagnóstico agregado de rechazo celular agudo por biopsia en su segundo evento de ELPT y cargas virales elevadas.

CONCLUSIONES:

- Para la población estudiada, de acuerdo a los resultados obtenidos, cargas virales ≥ 800 genomas/mL acompañados de elevación en los valores de enzimas hepáticas de hasta cuatro veces o más de sus cifras normales se vieron relacionados con el desarrollo de ELPT.
- Proponemos un seguimiento mensual de la carga viral de VEB, enzimas hepáticas y de la cuenta de linfocitos, esto independientemente de la presencia de manifestaciones clínicas, durante el primer año postrasplante, ya que dependiendo del grado de elevación de estos marcadores biológicos se puede anticipar la aparición de ELPT, lo que permitirá iniciar en forma oportuna la adecuada modulación de la inmunosupresión.

INTRODUCCIÓN.

La enfermedad linfoproliferativa Postrasplante secundaria a infección por Virus Epstein-Barr (VEB-ELPT) sigue siendo una de las principales complicaciones tras el trasplante de órganos sólidos en pacientes de alto riesgo. A pesar de que los factores de riesgo que predisponen a los pacientes a desarrollar VEB-ELPT han sido bien identificados, las limitaciones en nuestro conocimiento de su patogénesis, las variables de los criterios para establecer el diagnóstico, y la falta de estudios aleatorizados para abordar la prevención y el tratamiento de VEB-ELPT, obstaculizan la óptima gestión de esta complicación postrasplante. ELPT ocurre más comúnmente en pacientes pediátricos que en adultos. La mayor incidencia en los niños se asocia a al alto índice de seronegatividad de los receptores en esta población, considerando que la reactivación en pacientes de trasplante de órgano sólido es exógena. En los adultos, las tasas oscilan de la siguiente manera: entre 1% -3% en los trasplantes de riñón e hígado, del 1% -6% en los trasplantes cardiacos, del 2% -6% en los trasplantes de corazón-pulmón, 4% -10% en los trasplantes de pulmón, y en hasta un 20% en el trasplantes de intestino. El porcentaje de afección de ELPT en trasplante hepático en niños asciende al 20%.¹

ANTECEDENTES

Más del 90% de la población mundial está infectada por el VEB. Estos virus comparten un tropismo hacia los linfocitos B, y tienen una tendencia a la oncogenicidad. Causa una enfermedad leve autolimitante durante la infección primaria y persiste de por vida en latencia infectando a las células B.

Estas células pueden perdurar como líneas celulares linfoblastoides inmortales *in vitro*. En pacientes inmunosuprimidos, los linfocitos B infectados por VEB puede progresar rápidamente, resultando en una enfermedad linfoproliferativa monoclonal o policlonal.

Las enfermedades linfoproliferativas (ELPT) son un grupo heterogéneo de trastornos linfoides que pueden desarrollarse en pacientes sometidos a trasplantes de órganos sólidos. La incidencia oscila entre un 2 en adultos y 10% en niños y alcanzan una mortalidad de entre el 40 y el 70%.²

Los riesgos identificados en pacientes pediátricos post trasplantados son, las edades tempranas, el uso de Tacrolimus, la carga viral alta y una respuesta inmune celular baja concomitante. La amplia gama de presentaciones clínicas son: Síndrome de Mononucleosis y Linfadenopatía, fiebre, hepatomegalia, esplenomegalia, dolor abdominal, ascitis, falla renal, obstrucción urinaria, anemia hemolítica, hemorragia gastrointestinal, odinofagia, disfagia, nódulos subcutáneos, pérdida de peso, falla orgánica múltiple.³

MARCO CONCEPTUAL

El término Enfermedad Linfoproliferativa Postrasplante (ELPT) inducida por virus de Epstein-Barr-(VEB) describe un grupo heterogéneo de enfermedades linfoproliferativas asociadas con infecciones por VEB en receptores de órganos sólidos y de médula ósea⁴. Los tumores linfoides fueron descritas por primera vez en los pacientes trasplantados en 1968 y fueron llamados " sarcomas de las células retículo"; un subgrupo de estos se denomina "pseudolinfomas" debido a que existe la posibilidad de someterse a la regresión. Frizzera reconoció por primera vez la variable apariencia histológica de estos tumores, y en 1981 presentó una clasificación patológica para dar cabida a esta heterogenicidad histológica⁵.

Clínicamente, estos trastornos pueden diferir notablemente en las tasas de crecimiento, y los pacientes pueden manifestar una serie de presentaciones que van desde la difusión de la participación local, nodales y para extranodal, incluido el propio órgano de aloinjerto. La incidencia de ELPT oscila entre 0,8 a 20% y varía con el tipo de trasplante de órgano sólido, la edad de los pacientes trasplantados, los centros de trasplante, y el tipo de inmunosupresión. Un diagnóstico de ELPT puede relacionarse con tasas de mortalidad que van hasta un 50-80%⁶.

La definición del curso clínico, factores de riesgo, y los resultados terapéuticos de ELPT se han visto gravemente limitados debido a la falta de: 1) una definición estándar de ELPT, incluidos los parámetros clínicos e histológicos, 2) conocimiento a cerca de los mecanismos de transformación y proliferación de las células infectadas por EBV y 4) ensayos aleatorizados multicéntricos que demuestren la eficacia de las nuevas estrategias terapéuticas y profilácticas.

La clasificación más utilizada es la clasificación patológica de la Organización Mundial de la Salud (OMS), ésta divide a la enfermedad en tres categorías: 1. lesiones tempranas, 2.

ELPT polimórfico, y 3. ELPT monomórfico. Las lesiones tempranas se caracterizan por Hiperplasia plasmática reactiva, los ELPT Polimórfico pueden ser policlonales o monoclonales y se caracteriza por la destrucción de la arquitectura linfoide, necrosis, y atipia nuclear, mientras que el ELPT monomórfico, la mayoría de los casos (> 80%) se derivan de células B, similar al linfoma no Hodgkin en pacientes inmunocompetentes. El subtipo más común es el linfoma de células B grandes difuso, pero el linfoma de de Burkitt / Burkitt's-parecido y el mieloma de células plasmáticas son también vistos. Rara vez se producen variantes de células T, que incluyen linfomas periféricos de células T y, en raras ocasiones, otros tipos poco frecuentes, incluidas las gamma / delta linfoma de células T y las variantes de células NK. Y la enfermedad de Hodgkin-parecido linfoma es muy inusual ⁷.

La mayoría de los casos de ELPT se asocian con infección por el VEB. Este virus establece una infección asintomática de la célula B cuando existe supresión de la célula T. Tienen mayor riesgo los receptores seronegativos que reciben órgano de donante seropositivo para VEB ⁸.

El VEB es un gammaherpesvirus con potente actividad transformadora de la célula B. Infecta a la mayoría de la población adulta y, tras producirse la infección primaria, el individuo se convierte de por vida en un portador del virus. Se transmite por vía oral, de manera que puede detectarse en las secreciones orofaríngeas de pacientes con mononucleosis infecciosa, de sujetos inmunodeprimidos y, a baja concentración, en individuos sanos seropositivos. En las fases iniciales de la infección primaria, el VEB infecta los linfocitos B, aunque no se conoce dónde se produce esta infección y si en ello están involucradas las células epiteliales. El VEB expresa una serie de proteínas en los linfocitos B infectados que van a conducir a la proliferación celular. Generalmente el virus no replica en los linfocitos B, pero establece una infección latente en el 10% de células,

que posteriormente proliferan como líneas celulares linfoblastoides inmortales. La infección de la célula B se inicia con la unión de una glicoproteína de la membrana viral (gp 350/220) a la molécula CD21 del linfocito, lo que va a activar la tirosin kinasa *lck* y movilizar el calcio. Esto conduce a un aumento en la síntesis de RNAm, transformación blástica, adhesión celular, expresión de CD23 (un marcador de superficie característico de las células B activadas) y producción de IL-6. Posteriormente el genoma viral es incorporado al núcleo. A continuación se producen una serie de eventos que van a llevar a la expresión de una serie de proteínas virales en la superficie celular⁹. En sujetos sanos se produce una respuesta de las células T frente al VEB que va a conseguir que disminuya el porcentaje de células B infectadas desde un 10% en la infección aguda a sólo 1×10^5 o 1×10^6 en la convalecencia. Con el tratamiento inmunosupresor, al perderse el control por parte de las células T, puede desarrollarse el linfoma.

De forma intermitente, las células B infectadas entran en fase lítica, en la cual se lisan y liberan virus que posteriormente pueden infectar a nuevas células B o ser liberadas a la saliva y ser fuente de contagio para otros individuos.

Las células B infectadas presentan una expresión limitada de genes latentes virales. Se han descrito cuatro tipos de expresión de genes latentes. En los inmunocomprometidos con ELPT, de los aproximadamente 100 genes virales que normalmente se expresan durante la replicación, sólo 12 se expresan en las células infectadas: dos pequeños no-poliadenilados RNAs (EBV-encoded RNAs o EBERs 1 y 2), 6 antígenos nucleares (EBV nuclear antigens o EBNA 1, 2, 3A, 3B,

3C y EBNA-LP), tres proteínas latentes de membrana (LMPs 1, 2A y 2B) y BARF (highly spliced BAMH1 A rightward frame transcripts)¹⁰. Este tipo de latencia se llama latencia III. Esos genes tienen un papel importante en la colonización del pool de células B, en el establecimiento de la infección persistente y en la patogénesis de los tumores asociados

al virus. Evitando la expresión completa de los genes durante la latencia, el VEB reduce el número de proteínas virales que pueden ser reconocidas por las células T citotóxicas y elude la respuesta inmune del huésped ¹¹, de manera que las lesiones linfoproliferativas asociadas al VEB se consideran como el resultado de la proliferación de células B latentemente infectadas expresando genes de latencia tipo III, en ausencia de vigilancia CD8+ T citotóxica específica para VEB. Sin embargo, aunque de manera poco frecuente, se han descrito otros tipos de patrones de latencia del VEB en ELPT, como latencia tipo I. En el momento actual no está claro si la fase de replicación o fase lítica de la infección tiene importancia en la patogénesis de la ELPT asociada al VEB. No obstante, la detección tanto de productos virales asociados con el estado lítico como DNA de VEB libre y la alta sensibilidad y especificidad de esta prueba en el diagnóstico de la ELPT sugiere que la infección lítica puede ser algo más que un simple espectador en la ELPT ¹⁰. Además, las proteínas virales pueden interactuar o exhibir cierta homología con una amplia variedad de moléculas antiapoptóticas, citoquinas y traductores de señal que promueven la infección, immortalización, transformación y oncogénesis de las células B asociadas VEB. Por ejemplo, actuando sobre células B de ratones transgénicos para que expresen EBNA1 se han conseguido desarrollar linfomas, sugiriéndose que EBNA1 puede tener un papel directo en la oncogénesis. Se sabe también que el oncogen c-MYC parece ser una diana importante del EBNA2 ¹². LMP1, la proteína esencial para la transformación de la célula B inducida por el VEB, es un clásico oncogen en los estudios de transformación de fibroblastos en ratones. LMP2 asimismo actúa como oncogen. La reintroducción de EBERs en células Akata VEB-negativas restaura su capacidad de crecimiento y tumorigenicidad en ratones SCID y resistencia a inductores apoptóticos, hallazgos idénticos a los observados en las células VEB-positivas.

Por otra parte, el VEB codifica una serie de interesantes proteínas homólogas a las proteínas humanas que pueden ser importantes para la modulación del sistema inmune. La proteína viral BCRF1 muestra un 84% de homología con la secuencia de la IL-10 humana y, de forma similar a la IL-10, inhibe la síntesis de interferón (IFN)- por las células sanguíneas mononucleares periféricas *in vitro*²⁵. Otra proteína asociada al VEB llamada BARP1 puede bloquear la acción de IFN- α . Teniendo en cuenta que IFN- α e IFN- γ inhiben el crecimiento de las células infectadas por VEB, ambas proteínas pueden ayudar al virus a evadir el sistema inmune del huésped. Además BARP-1 tiene cierta homología con la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM1), así como con el receptor del factor estimulante de colonias humano (CSF) pudiendo producir inmunosupresión al antagonizar CSF1 o al ocupar los receptores de ICAM1. Otra proteína viral BHRF1 presenta homología parcial con el protooncogene humano BCL-2, aumenta la supervivencia de la célula infectada, permite que se acumulen mutaciones oncogénicas y que se produzcan altas cantidades de viriones mediante inhibición de la apoptosis. Pocos casos de ELPT no se asocian con infección por VEB y comprenden un subgrupo distinto de ELPT: tienden a ocurrir más tarde (mediana 50 meses postrasplante), tienen una histología más maligna y son más agresivos (supervivencia media 1 mes). Algunos estudios recientes hablan de un aumento en la incidencia de este tipo de ELPT ^{10, 11, 12}.

El potencial oncogénico de VEB se refiere a su capacidad de transformar e inmortalizar los linfocitos B, lo que lleva a la posibilidad de incontrolada proliferación de estas células transformadoras en personas inmunodeficientes.

Los síndromes clínicos que se derivan de la proliferación descontrolada de linfocitos constituyen trastornos linfoproliferativos post-trasplante¹³.

La infección primaria por VEB en receptores de trasplante seronegativos se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar ELPT¹⁴.

El mayor riesgo se produce en los receptores seronegativos que reciben un órgano de un donante seropositivo (D + /-R). En contraste, ELPT asociados a VEB ocurre con poca frecuencia en pacientes que son seropositivos antes de VEB trasplante.

El uso de anticuerpos específicos anti-terapias de células T (por ejemplo, OKT3) también se asocia con un mayor riesgo de desarrollar ELPT. El uso de agentes inmunosupresores más potentes podrán llevar un mayor riesgo de ELPT¹⁵.

Por estas razones, los juicios de los regímenes inmunosupresores se deben supervisar de forma prospectiva la presencia de VEB enfermedad, en particular en los receptores seronegativos.

En 1984, Starzl y cols.⁶⁰ describieron la reversibilidad de la ELPT mediante la reducción de la inmunosupresión. La reducción, e incluso la suspensión si es factible, de los fármacos inmunosupresores es la estrategia inicial más importante, lo cual puede llevar a la regresión de la ELPT en 23 a 50% de los pacientes²⁹. Esta estrategia es eficiente en la ELPT asociada a VEB que ocurre dentro del primer año postrasplante, pero tiene escaso valor en la ELPT que ocurre posteriormente o en la ELPT VEB-negativa o de origen en células T³⁰. Sin embargo, la reducción de la inmunosupresión se asocia con riesgo de rechazo, lo cual puede ser admitido en el trasplante renal, pero no en otros órganos, como el trasplante hepático. Esta actitud terapéutica es admitida por la mayoría de los autores como la aproximación inicial a la forma polimórfica de la enfermedad; sin embargo, el manejo inicial de la forma monomórfica es más controvertido. Aunque se ha documentado la resolución de lesiones monomórficas con este tratamiento, ello ocurre de forma menos frecuente, por lo que se debe asociar a otras pautas de tratamiento. Son precisos más estudios para definir qué hallazgos clínicos, histológicos y moleculares pueden predecir cuáles son los pacientes que van a responder a reducción de la inmunosupresión. En 36 casos de ELPT, Cesarman y cols.³¹ demostraron que mutaciones del gen *BCL6* en

linfocitos transformados se asociaban con una baja probabilidad de respuesta a la reducción de la inmunosupresión. Rapamicina y everolimus pueden ser fármacos útiles tanto en el tratamiento como en la prevención de ELPT. Everolimus ha demostrado efecto antiproliferativo sobre cultivos de linfocitos B transformados por el VEB^{32, 33} y rapamicina inhibe eficazmente el crecimiento de linfomas B asociados a VEB en ratones³⁴. Dado que la enfermedad por citomegalovirus parece ser un cofactor en el desarrollo de ELPT y que el ganciclovir tiene actividad frente al VEB *in vitro*³⁵, algunos autores proponen el uso de este fármaco. Comparaciones históricas de la incidencia de ELPT en pacientes que han recibido o no profilaxis con aciclovir o ganciclovir, tanto durante el inmediato postrasplante como durante el tratamiento con sueros antilinfocitarios durante el tratamiento del rechazo agudo, sugieren que el uso profiláctico de ambos fármacos puede ser beneficioso³⁶. El papel de la administración pasiva de anticuerpos neutralizantes para VEB a través del uso de inmunoglobulinas intravenosas no está claro, aunque los resultados en modelos animales de ELPT son prometedores.

Es conveniente aclarar las diversas entidades clínicas de la afección de VEB, según la Sociedad Americana de Trasplantes, para su estudio más preciso:

La infección por VEB: La presencia de la infección pasada por VEB es definido como la ausencia de anticuerpos de clase IgG mediante serología. La infección Activa, por VEB se define por la presencia de un nivel detectable de carga viral de VEB, medida por un ensayo de amplificación de ácido nucleico. La infección asintomática también pueden ser identificada en especímenes linfoides histopatológicamente ricos de células infectadas.

VEB enfermedad: VEB enfermedad se define por la presencia activa de la infección por VEB con síntomas o signos atribuible al virus. El espectro de manifestaciones clínicas de VEB en receptores de trasplante incluye síndrome viral inespecífico, mononucleosis, trastornos linfoproliferativas y los linfomas malignos.

Desorden Linfoproliferativos post-trasplante: El estándar de oro para el diagnóstico de ELPT es el examen histopatológico ¹³.

Las muestras de los tejidos deben ser interpretados por hematopatologos o un patólogo que esté familiarizado con las características histopatológicas de ELPT, usando un sistema de clasificación^{1, 19}. El ELPT se caracteriza por borramiento y la destrucción de la arquitectura por un proceso linfoproliferativo ¹.

Además de la clasificación morfológica, la ELPT en tejidos debe ser examinada para detectar la presencia de VEB por hibridación *in situ*.

Además podrán incluir la caracterización de células de origen (B, T, nula, mixta), subpoblación de células B (por ejemplo, CD20).

La evaluación de los pacientes con ELPT debería incluir también evaluación radiográfica para documentar la extensión de la enfermedad (por ejemplo, la tomografía computarizada) ^{13,16}. Algunos expertos recomiendan realizar biopsia de médula ósea.

La vigilancia de Laboratorio, se debe obtener Serología para la infección por VEB previo al trasplante de todos los receptores y los donantes. Después de trasplante, la serología puede ser menos fiable. En consecuencia, basado en ensayos de ácido nucleico como la reacción en cadena de polimeriza (PCR) son valiosos en la identificación de la presencia activa de la infección por VEB después del trasplante^{13, 16}.

No existe consenso con respecto a la más adecuada vigilancia de laboratorio.

Pretrasplante: Serología VEB debe obtenerse antes de trasplante en todos los receptores.

La serología de los donadores es importante para establecer los perfiles de riesgo (es decir, D + /-R) para VEB receptores seronegativos.

Mientras que algunos expertos recomiendan la ejecución de sólo el VEB VCA y EBNA anticuerpos IgG, mientras que otros recomiendan la obtención de un panel completo

serológicos. Los niños menores de 1 año de edad se supone que son seronegativos, pero puede tener resultados positivos debido a la presencia de anticuerpos maternos.

Carga viral: Los estudios de la sensibilidad y la especificidad de VEB cuantitativos de la carga viral para el diagnóstico precoz de ELPT y la infección sintomática por VEB son limitadas ²⁰. La carga viral de VEB tiene un buen valor predictivo negativo en el rango de 96.1-100% en receptores de trasplante de órganos sólidos. Sin embargo, la especificidad de alta carga viral para el diagnóstico de ELPT es pobre, con valores predictivos positivos en el rango de 28-64.7% después del trasplante de órganos sólidos. Las poblaciones pediátricas han sido objeto de muchos estudios de carga viral de VEB postrasplante de órganos sólidos. El valor predictivo negativo de la baja la carga viral en adultos receptores de trasplante de órganos sólidos, en particular en aquellos quienes tienen enfermedad local o derivada del donador ha sido incierto ²¹. La carga viral de VEB es poco probable que sea útil en la presentación de las células T o VEB negativo ELPT.

Debido a la presencia de altas cargas virales a menudo es anticipada a la presentación clínica de ELPT existe un creciente base de datos para apoyar la importancia cuantitativa de la carga viral de VEB en el seguimiento de prevención de ELPT (^{22, 23, 24}). Las tendencias actuales es dar más valor a las medidas individuales, en particular, en las presentaciones de alto riesgo donde las intervenciones anticipadas pueden estar garantizadas. Sin embargo, este ensayo tiene una carencia de estandarización. Las pruebas para asegurar la estandarización de la cuantificación entre ensayos y la mayoría de los centros usando el mismo ensayo son necesarias. La técnica de ensayo óptimo, el sitio de muestreo (linfocitos vs sangre total vs plasma) y el tiempo de muestreo no se han determinado aún. Aunque la evidencia preliminar sugiere que una muestra de sangre total no fraccionada es preferible a una muestra de plasmas para la vigilancia de la carga viral de VEB, esto requiere de más validación. Pacientes de alto riesgo pueden requerir

frecuentes muestreos desde el VEB duplica la carga viral en tiempo, tan corto como 56 han sido documentados. Datos sobre la historia natural la carga viral de VEB en receptores de trasplante en ausencia de intervención son limitados. Esto impide una definición clara de "puntos gatillo" que son predictivos del desarrollo de ELPT y la intervención preventiva en la que debería tener lugar.

Basándose en las pruebas actuales, la utilidad de ensayos de carga viral cuantitativos de VEB para la vigilancia o el diagnóstico es incierto (CII) ^{13, 23}.

El seguimiento de la carga de DNA del VEB en los linfocitos de sangre periférica (PBLs) de los pacientes trasplantados por PCR competitivo (cPCR) ha demostrado ser útil en el diagnóstico y tratamiento de la infección por VEB y enfermedad linfoproliferativa asociada. Aunque la carga viral también se ha medido por PCR en tiempo real en plasma y la sangre total la comparabilidad de los resultados de la carga viral en los distintos tipos de muestras, determinada por diferentes métodos PCR, aun no está claro ²⁵.

Existen diversos estudios para facilitar la selección de todo lo anterior, los resultados de la PCR se clasifican en una carga de cuatro grupos: grupo I, 50 genomas/ml plasma; grupo II, 50-799 genomas/ml plasma; grupo III 800-20,999 genomas/ml plasma y grupo IV $21,000$ genomas/ml plasma. Los puntos de corte de carga viral para estos grupos se basaron en la forma en que suelen interpretarse los resultados de las pruebas por PCR para los últimos 7 años.

Grupo I representa un valor que no sea detectado o detectables (aunque sea muy baja) de un valor similar a los valores observados en infección latente en individuos inmunocompetentes. Grupo II valores son de 1 a 2 \log_{10} unidades mayores que los esperados en la infección latente normal, pero que no han sido normalmente asociados con la enfermedad clínica en los pacientes trasplantados.

Grupos III y IV, los valores se consideran muy y muy elevado, respectivamente, y hemos asociado estos valores con un mayor riesgo para cualquiera que tenga o desarrolle infección sintomática de VEB o ELPT asociada a VEB^{26, 27}.

JUSTIFICACION

La ELPT consta de una amplia variedad de presentaciones clínico-patológicas, las cuales pueden imitar otras alteraciones y retrasar el diagnóstico definitivo y el inicio de una terapia apropiada. Confiriendo una alta mortalidad que puede ascender a un 70%; alta morbilidad, incluida la pérdida del injerto. El uso de la carga viral del VEB determinado por medio de la PCR en tiempo real ha sido documentado como herramienta útil en la identificación oportuna de la ELPT. Sin embargo, no existe un consenso en los valores de corte del número de copias/mL de plasma por PCR y el desarrollo de ELPT en pacientes post trasplante hepático.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la frecuencia y las características clínicas de la enfermedad linfoproliferativa en los pacientes postrasplantados hepáticos secundaria a infección por VEB en el HIMFG?

¿Existe una relación en la aparición de ELPT directamente con la elevada carga viral del VEB?

OBJETIVO GENERAL

Describir la relación de la carga viral de VEB como marcador predictivo y la presencia de enfermedad linfoproliferativa, su frecuencia y características clínicas en pacientes postrasplantados de hígado en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” en el periodo de enero 2005 a enero 2008.

PARTICULAR

- Establecer el valor de corte de la carga viral para el riesgo de desarrollo de ELPT,
- Identificar la frecuencia de la ELPT por EBV en pacientes postrasplante hepático,
- Describir las características poblacionales de pacientes que desarrollan ELPT en el HIMFG,
- Describir características clínicas de los pacientes que desarrollan ELPT en el HIMFG.

MATERIAL Y METODO

- Tipo de estudio:
Descriptivo, Retrolectivo y Observacional de una Serie de Casos.
- Universo de trabajo:
Pacientes con trasplante hepático durante el periodo de enero 2005 a enero de 2008 en el HIMFG.
- Se excluirán aquellos pacientes con expediente incompleto.
- Análisis estadístico: frecuencias simples.
- Variable dependiente: Enfermedad Linfoproliferativa Postrasplante (ELPT)
- Variable independiente:
 - Carga viral VEB
 - Tiempo de postrasplante de aparición de ELPT
 - Tipo de terapia inmunosupresora

- Características poblacionales:
 - Edad
 - Sexo
 - Diagnóstico de base
 - Serología receptor/donador
 - Clínica
 - Laboratorio auxiliar
 - Complicaciones
 - Tratamiento

LIMITACIONES DE ESTUDIO

Debido a que el tamaño de la población de estudio es pequeña, sólo podemos estimar la frecuencia y posible relación entre la carga viral y el desarrollo de ELPT sin poder sugerir valores de cortes.

RESULTADOS

En el periodo de enero del 2005 a enero de 2008 se realizaron 9 trasplantes hepáticos. Se realizó una revisión como serie de casos de estos pacientes trasplantados. De los 9 pacientes, 5 desarrollaron ELPT confirmada por biopsia hepática e inmunohistoquímica.

La atresia biliar extrahepática fue el diagnóstico de base más frecuente en 4 de los 9 pacientes sometidos a Trasplante Hepático, lo cual se correlaciona con lo reportado en la literatura. En cuanto al grupo etario, predominaron los menores de cinco años (7/9), se captaron 2 adolescentes, uno con tumor hepático y otro con enfermedad de Caroli. Predomino el sexo femenino (6/9). En relación a los donadores, 8/9 fueron donadores cadavéricos. En lo que respecta a serología pretrasplante del receptor y donador, respecto al VEB, tres receptores tuvieron serología R-/D+; 5 R+/D+ y 1 R+/D-; uno de los receptores del grupo de alto riesgo presentó ELPT a las cien semanas postrasplante.

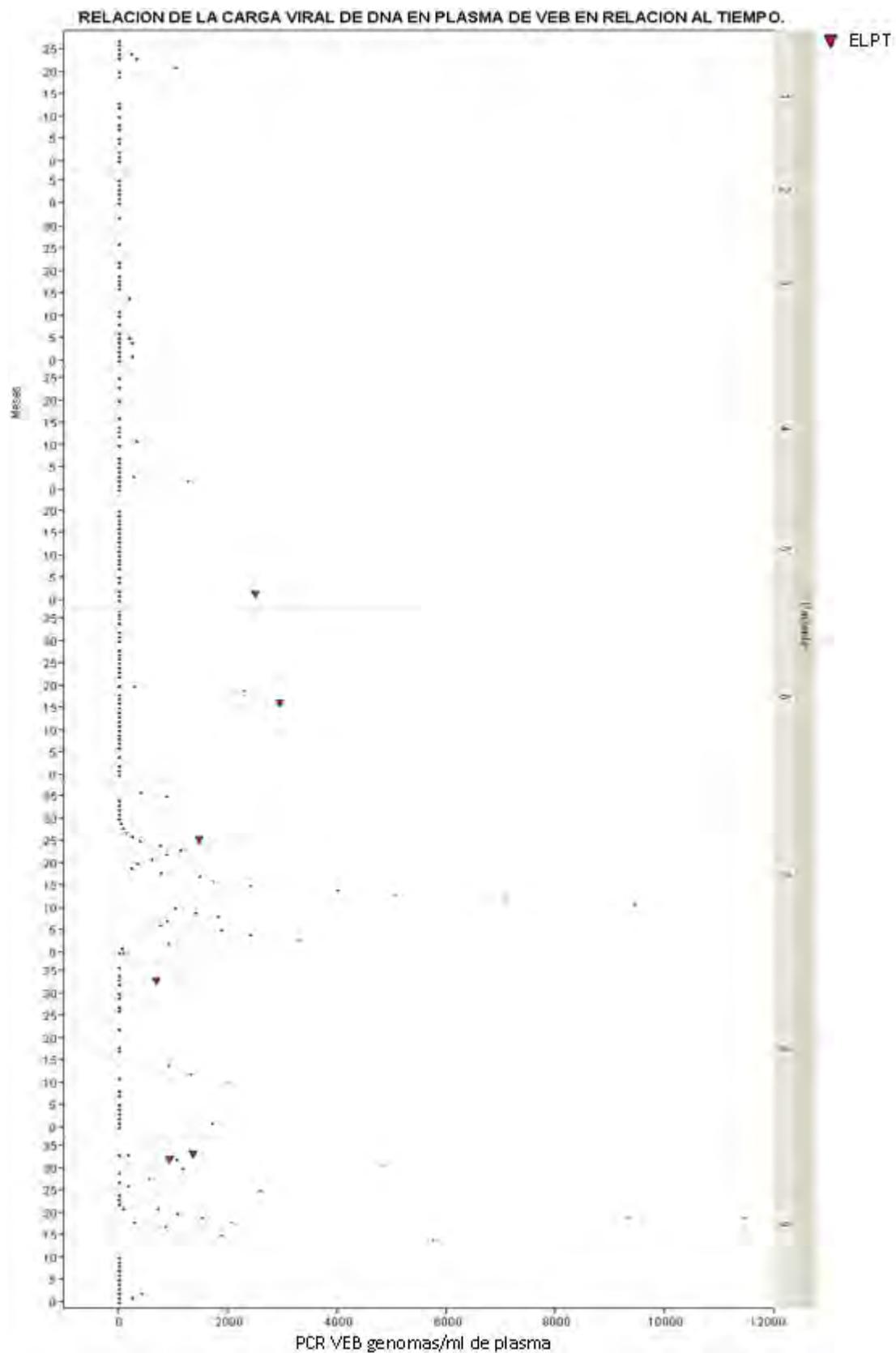
Mostramos las características demográficas así como el tiempo de reactivación de VEB, en sus diferentes modalidades en la tabla I.

Tabla I. Características demográficas y tiempo de reactivación de la población estudiada

PACIENTE No.	EDAD/SEXO (años y meses)	DIAGNÓSTICO DE BASE	SEROLOGIA PRETASPLANTE	INMUNOSUPRESION	INICIO DE REACTIVACION O INFECCION PRIMARIA * DE VEB o PTLD ** (semanas)
1	2/F	Atresia de Vía Biliar	R+/D+	Tacrolimus	2
2	1 11/12/F	Hepatitis Fulminante (VHA)	R-/D+	Tacrolimus	
3	3/M	Atresia de Vía Biliar	R+/D+	Tacrolimus	2
4	13/M	Enfermedad de Carola	R-/D+	Tacrolimus	2 * 8
5	1 6/12 /F	Tirosinemia Tipo I	R+/D+	Tacrolimus	4 **
6	1 1/12 /F	Atresia Vía Biliar	R+/D-	Tacrolimus	14 56**
7	3/F	Atresia Vía Biliar	R-/D+	Tacrolimus/Micofenolato	2* 12 100**
8	16/F	Tumor Hepático	R+/D+	Tacrolimus/Micofenolato	2 131**
9	2 8/12 /M	Hepatitis Fulminante (VHA)	R+/D+	Tacrolimus	2 137** 143 **

En la figura I, se muestra la relación que existe entre la carga viral de DNA en plasma y desarrollo de ELPT, donde se aprecia que valores > 800 genomas/mL estuvieron presentes en pacientes que la presentaron.

Figura 1.



En cuanto a las diferentes variables de importancia en el seguimiento de un paciente postrasplantado, en la tabla 2, mostramos los valores en los pacientes que desarrollaron ELPT y la relación existente con la carga viral de VEB en plasma.

Valores de Enzimas hepáticas en el momento de presentación de ELPT y su relación con valores de PCR VEB en plasma			
Paciente	Carga Viral Plasma (genomas/ml plasma)	AST (U/l)	ALT (U/l)
5	2440	217	444
6	2893	89	120
7	1450	988	989
8	648	230	430
9 (a)	939	201	222
9 (b)	1320	336	131

Valores de leucocitos, linfocitos y monocitos en el momento de presentación de ELPT y su relación con valores de PCR VEB en plasma				
Paciente	Carga Viral Plasma (genomas/ml plasma)	Leucos	Linfocitos	Monocitos
5	2440	800	48*	31
6	2893	3400	66*	19
7	1450	9800	59	6
8	648	8500	66	13
9 (a)	939	8900	60	6
9 (b)	1320	8500	30	6

* Se reportaron linfocitos atípicos en el momento de la ELPT: paciente 5, 25%; paciente 6, 65%

Manifestación clínica en el momento de presentación de ELPT y su relación con valores de PCR VEB en plasma				
Paciente	Carga Viral Plasma (genomas/ml plasma)	Mononucleosis-like	Asintomático	Rechazo Injerto
5	2440	x		
6	2893	x		
7	1450		x	
8	648		x	x

En la figura 2, se muestra que los pacientes que desarrollaron ELPT, presentaron valores cuatro veces por arriba de los valores normales de enzimas hepáticas, como alaninoamino transferasa (ALT) y aspartatoamino transferasa (AST) y carga viral elevada en plasma.

En la figura 3, se muestra la relación de los valores representativos en la biometría hemática, tales como leucocitos, linfocitos (incluyendo atípicos) y monolitos; predominó la cuenta elevada de linfocitos, que traducen habitualmente afección viral, en los pacientes que desarrollaron ELPT, y su relación con los valores de VEB en plasma, obtenidos por PCR en tiempo real.

En la figura 4, se muestra la relación de las manifestaciones clínicas en los pacientes que desarrollaron ELPT, y su relación existente con la carga viral de VEB en plasma, habrá que recordar que estas variables fueron categorizadas en mononucleosis-like, masa, asintomáticos, rechazo celular (sólo confirmados por biopsia hepática) y sepsis.

En la figura 5, mostramos la relación que existe entre el comportamiento de la carga viral dependiendo de la regulación del régimen de tratamiento inmunosupresor y su clasificación de acuerdo en el grupo riesgo para desarrollo de ELPT, el cual se muestra en la tabla 3.

RELACION DE LAS PRUEBAS DE FUNCION HEPATICA CON RESPECTO A LA CARGA VIRAL EN PLASMA DE VEB

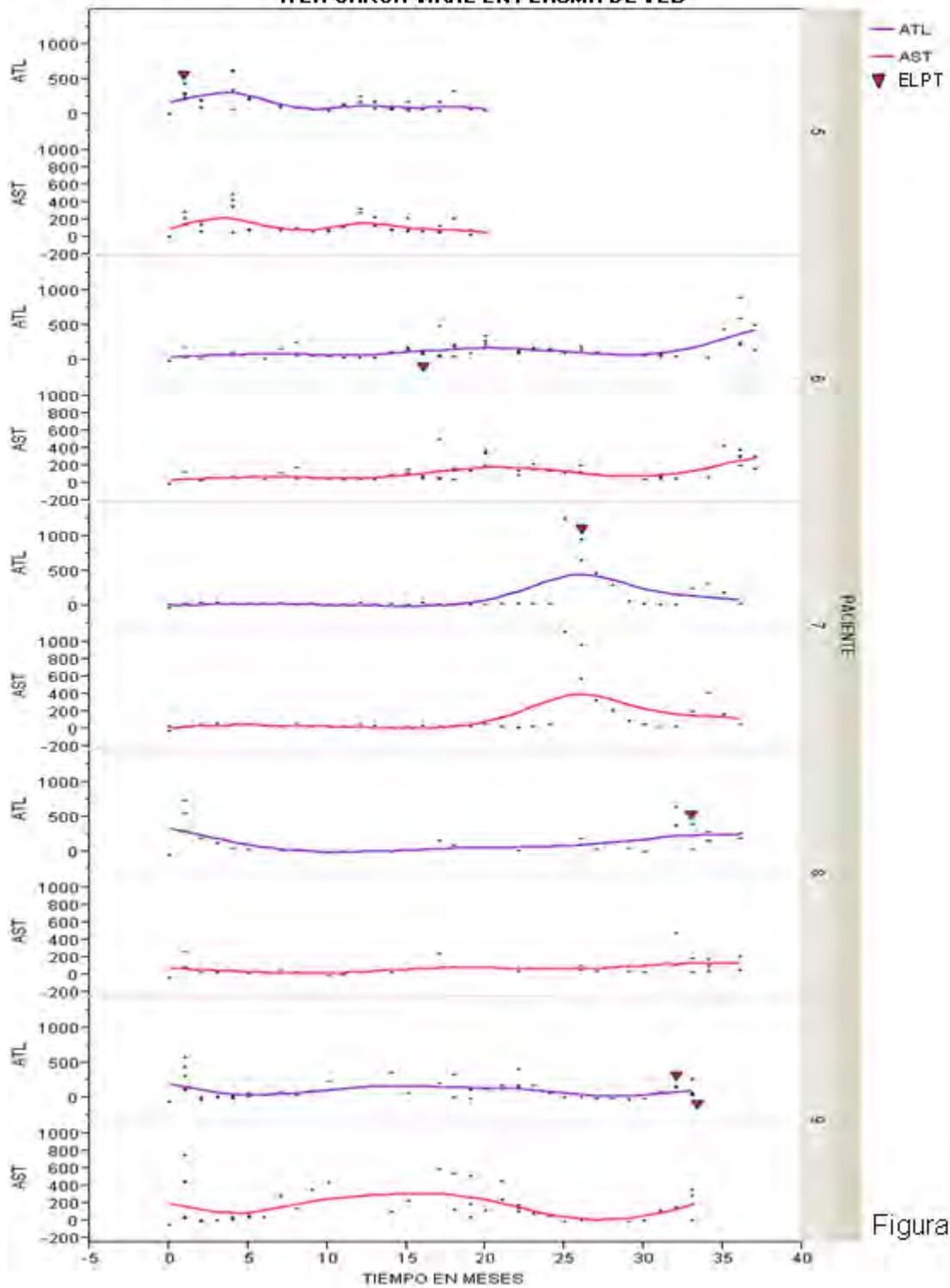
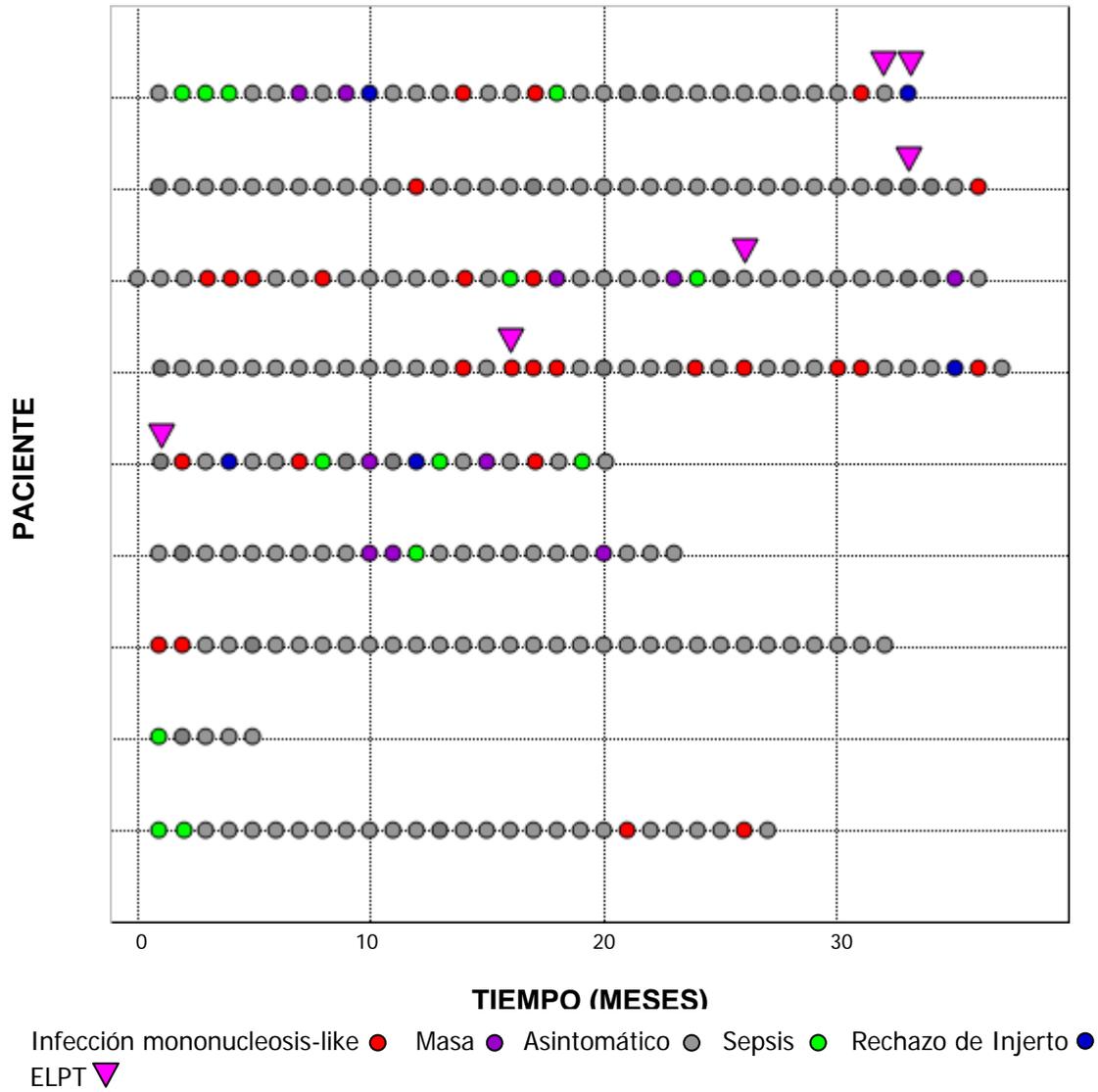


Figura 2

MANIFESTACIONES CLÍNICAS EN PACIENTES POSTRANSPLANTADOS Y SU RELACION EN EL TIEMPO



FECHA DE TRANSPLANTE (PACIENTE)

PACIENTE 1: 11-09-05; PACIENTE 2: 28-08-07; PACIENTE 3: 02-05-05; PACIENTE 4: 24-09-05;
 PACIENTE 5: 17-05-06; PACIENTE 6: 30-12-04; PACIENTE 7: 03-01-05; PACIENTE 8: 31-01-05;
 PACIENTE 9: 20-05-05

Figura 4

TABLA 3

Valores de PCR plasma categorizados en 4 grupos de riesgos (genomas/ml plasma)α				
Paciente	Grupo I (< 50)	Grupo II (50-799)	Grupo III (800-20,999)	Grupo IV (> 21,000)
1	0	2	1	0
2	0	0	0	0
3	0	4	0	0
4	0	2	1	0
5	0	0	1*	0
6	0	1	2*	0
7	0	13	20*	0
8	0	1	4	0
9	0	8	24*	0

α Las cifras reportados son los números de muestras positivas, encasilladas en el grupo correspondiente de acuerdo a su valor.

* Muestra e evento ELPT (paciente 5, 2240; paciente 6, 2893, paciente 7, 1450, paciente 8, 648, paciente 9, 939 y 1320)

Valores de PCR Leucos totales categorizados en 4 grupos de riesgos (genomas/μ ADN leucos totales)α				
Paciente	Grupo I (< 10)	Grupo II (10-3999)	Grupo III (4000-29,000)	Grupo IV (> 30,000)
1	0	2	0	0
2	0	0	0	0
3	0	17	0	0
4	0	3	1	0
5	0	1*	0	0
6	0	8*	0	0
7	0	23*	10	0
8	0	8*	0	0
9	0	29*	1	0

α Las cifras reportados son los números de muestras positivas, encasilladas en el grupo correspondiente de acuerdo a su valor.

* Muestra e evento ELPT (paciente 5, 1630; paciente 6, 1749, paciente 7, 1303, paciente 8, 456, paciente 9, 382 y 2535)

Grupo I: representa valores detectados o no (aunque muy bajos), similares a los valores en infección latente en pacientes inmunocompetentes.

Grupo II: valores más altos que aquellos esperados en infección latente normal, pero los cuales no han sido asociados típicamente con enfermedad clínica en pacientes trasplantados.

Grupo III y IV: son considerados altos y extremadamente altos respectivamente y se han asociado con un riesgo incrementado para tener o desarrollar infección sintomática de VEB o ELPT asociada a VEB.

DISCUSIÓN:

En nuestro estudio se incluyeron 9 pacientes transplantados en un periodo de tres años, la mayoría contaron con factores de riesgo ya establecidos ², como el grupo etario menor de 5 años (7 pacientes), el uso de Tacrolimus (9 pacientes, 2 con uso de micofenolato agregado) como régimen inmunosupresor, la carga viral de VEB elevada en plasma establecida en los grupos de riesgo III y IV ^{26, 27} (4 pacientes), la serología R-/D+ (3 pacientes). De estos pacientes, 5 desarrollaron enfermedad linfoproliferativa confirmada por biopsia y estudio inmunohistoquímico. Dentro de éstos 2 pacientes desarrollaron la forma más temida como lo es la expresión neoplásica, El paciente No. 6, en su evolución en diciembre del 2007, presento dolor abdominal constante e inexplicable, llegando a la decisión de LAPE donde se reportó en tejido de yeyuno “Linfoma de Hodgkin difuso de células grandes, inmunofenotipo T y LMP-1 positivos. Así mismo se realizó biopsia hepática con reporte de rechazo agudo, colangitis y pericolangitis leve. Este paciente ulteriormente, fuera ya de nuestro periodo de estudio, en febrero del 2008 se realizo nueva biopsia hepática con reporte de infiltrado policlonal de predominio de linfocitos T y en mayo del 2008 nueva biopsia con reporte de rechazo celular mínimo agudo y crónico incipiente. Lo cual nos puede traducir la relevancia de la afección de VEB a la postre.

Por otro lado, otro paciente que compartió este tipo de afección por VBE con ELPT en su forma neoplásica, fue el No. 5 la cual en enero del 2007, tras datos clínicos de dolor abdominal, amerita realización de LAPE con reporte de “duodeno,

yeyuno, ileon, ganglios mesentéricos con infiltrado por Linfoma No Hodgkin difuso de células grandes de alto grado. Con perforación intestinal secundaria a linfoma con resección de intestino, con dudodenostomía y 2 anastomosis ileales y yeyunostomía de una boca. Así mismo fue la única paciente sometida a manejo a base de anti-CD 20 (“Rituximab”) por un periodo de 3 semanas. Respecto a este tema, No existen estudios randomizados para alguna de las posibles opciones terapéuticas del ELPT. Sólo hay publicados casos aislados o series limitadas de pacientes. El uso de Rituximab cuenta con nivel de evidencia “D”. Incluso la disminución de la inmunosupresión cuenta con nivel de evidencia “C”²⁸.

Regresando a nuestra paciente, ésta presento una serie de complicaciones a nivel abdominal como sepsis y dehiscencia de duodenostomía. Y posteriormente, fuera de nuestro periodo de estudio, en mayo y agosto del 2008, se realiza biopsia hepática con reporte de rechazo crónico extenso con necrosis hepática extensa. Falleciendo en mayo del 2009 con diagnóstico de defunción de displasia multifocal y cáncer hepatocelular, infiltración por Linfoma No Hodgkin células grandes inmunofenotipo B, múltiples episodios de rechazo agudos e infección por VEB y rechazo crónico. Lo cual nuevamente nos traduce la importancia de una monitorización estrecha en este tipo de pacientes.

Por otro lado, el paciente No. 9 presentó pérdida del injerto en diciembre del 2006, tras eventos previos de colangitis, rechazo celular agudo y crónico diagnosticado por biopsia hepática, ameritando un segundo trasplante hepático. Posterior a esto, presenta nuevamente datos de rechazo celular IB el cual coincide con segundo evento de ELPT en misma biopsia. Contando con primer evento de ELPT tan sólo

3 semanas previas. Sin embargo, no se considero disminución de la inmunosupresión ante mas sospecha de rechazo, lo que favoreció el segundo evento de ELPT, esto pone de manifiesto la encrucijada ante la cual pueden verse implicados los médicos trasplantólogos, ante 2 situaciones con tratamientos completamente opuestos. En este ejemplo en particular, la carga viral del VEB en plasma fue elevada, lo que puede apoyar más el diagnóstico de ELPT y el rechazo sea secundario a esto. La evolución del paciente hasta el momento ha sido favorable.

Dentro de nuestras variables, las que demostraron relación aparente con la aparición de ELPT, fueron las enzimas hepáticas elevadas en más de 4 veces su valor base (todos los pacientes con ELPT) los linfocitos atípicos solo en 2 pacientes y monocitosis en 3 pacientes. La clínica no fue representativa en términos generales, puesto que 3 pacientes de 5 que desarrollaron ELPT fueron asintomáticos en el momento del diagnóstico. El tiempo de presentación de reactivación de VEB fueron en promedio en los nueve pacientes de 3.3 semanas lo que coincide con lo reportado en la literatura ^{2,3}. Todos los pacientes que presentaron ELPT obtuvieron cargas virales en plasma elevadas, siendo categorizados en el grupo de riesgo III (800 – 20,999 genomas/ml plasma) ^{26, 27}.

CONCLUSIONES:

- Para la población estudiada, de acuerdo a los resultados obtenidos, cargas virales >800 genomas/mL acompañados de elevación en los valores de enzimas hepáticas de hasta cuatro veces o más de sus cifras normales se vieron relacionados con el desarrollo de ELPT.
- Proponemos un seguimiento mensual de la carga viral de VEB, enzimas hepáticas y de la cuenta de linfocitos, esto independientemente de la presencia de manifestaciones clínicas, durante el primer año postrasplante, ya que dependiendo del grado de elevación de estos marcadores biológicos se puede anticipar la aparición de ELPT, lo que permitirá iniciar en forma oportuna la adecuada modulación de la inmunosupresión.
- En ausencia de tratamiento eficaz para la ELPT, la mejor estrategia es la prevención. Los pacientes con alto riesgo deben ser identificados pretrasplante y monitorizados de forma cuidadosa para detectar infección VEB, siendo este seguimiento de manera estricta de manera mensual durante el primer año postrasplante.
- Dado que la infección primaria postrasplante es un importante factor de riesgo para el desarrollo de ELPT, el *status* serológico para VEB debe determinarse en todos los potenciales receptores de trasplante.
- La monitorización de la carga viral es importante, puesto que puede permitir la prevención de la enfermedad mediante reducción de la inmunosupresión iniciada a tiempo.

- Las cargas virales elevadas, por arriba de 800 genomas/ml plasma se han asociado a mayor desarrollo de ELPT. Sin embargo, hasta la actualidad no existe un valor de cohorte ni un consenso en el tipo de muestra (sangre total, leucocitos en sangre periférica, plasma) para la monitorización de este tipo de pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido.
- La monitorización de las enzimas hepáticas, así como la cuenta de linfocitos (atípicos y no) y monocitos son herramientas auxiliares en el diagnóstico de ELPT.
- La clínica al ser tan amplia y diversa, puede ser poco útil, e incluso los pacientes asintomáticos, pueden desarrollar ELPT, por lo que la monitorización de las cargas virales de VEB son la herramienta más útil y benéfica demostrada.
- Algunos pacientes reportaron cargas virales muy elevadas, por arriba de 3000 genomas/ml plasma, sin embargo, el diagnóstico confirmatorio de ELPT por biopsia no fue considerado en ese momento por los médicos tratantes. Pero si se optó por disminuir el régimen de inmunosupresión lo cual disminuyó de manera significativa las cargas virales elevadas. Lo que apoya nuevamente este tratamiento como el más útil y a la mano que se cuenta en nuestro medio.

BIBLIOGRAFIA:

1. Paya, Carlos V, Epstein-barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders, *Transplantation:Volume 68(10)*27 November 1999 pp 1517-1525
2. Maher K. Gandhi, Plasma Epstein-Barr Virus (EBV) DNA Is a Biomarker for EBV-Positive Hodgkin's Lymphoma, *Clin Cancer Res* 2006 12: 460-464
3. Smets, Françoise, Ratio between Epstein-Barr viral load and anti-Epstein-Barr virus specific T-cell response as a predictive marker of posttransplant lymphoproliferative disease, *Transplantation: 27 May 2002 - Volume 73 - Issue 10 - pp 1603-1610.*
4. Nelson, Beverly P. M.D, Epstein-Barr Virus-Negative Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders: A Distinct Entity? , *The American Journal of Surgical Pathology: March 2000 - Volume 24 - Issue 3 - pp 375-385.*
5. Frizzera G, Polymorphic diffuse B-cell hyperplasias and lymphomas in renal transplant recipients. *Cancer Res* 1981; 41: 4262.
6. Lai, Yi-Chun, Post-transplantation lymphoproliferative disorders localizing to the gastrointestinal tract after liver transplantation: Report of five pediatric cases. *Pediatric Transplantation. 10(3):390-394, May 2006.*
7. Ann S. LaCasce Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders *The Oncologist* 2006; 11:674–680.
8. Vikas r. Dharnidharka, Risk factors for Posttransplant

- Lymphoproliferative Disorder (ptld) in pediatric kidney transplantation: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study (NAPRTCS), *Transplantation* Vol. 71, 1065–1068, No. 8, April 27, 2001
9. Thompson MP, Kurzrock R: Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* 10: 803-821, 2004.
 10. Young LS, Murray PG: Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 22: 5108-5121, 2003.
 11. Cohen JI: Epstein–Barr Virus infection. *N Engl J Med* 343: 481- 482, 2000.
 12. Kaiser C, The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein- Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* 73: 4481-4484, 1999.
 13. Blackwell Munksgaard, Epstein-Barr virus and lymphoproliferative disorders after transplantation. Guidelines for the prevention and management of infectious complications of solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4(Suppl. 10): 59–61
 14. T. Haque, Transmission of donor Epstein-Barr virus (EBV) in transplanted organs causes lymphoproliferative disease in EBV-seronegative recipients, *Journal of General Virology* (1996), 77, 1169-1172.
 15. Cherikh, Association of the type of induction immunosuppression with posttransplant lymphoproliferative disorder, graft survival, and patient survival after primary kidney transplantation, *Transplantation*: November 2003 - Volume 76 - Issue 9 - pp 1289-1293

16. Preiksaitis JK, Diagnosis and management of posttransplant lymphoproliferative disorder in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2001; 33: S38–S46.
17. Humar, A. American Society of Transplantation Recommendations for Screening, Monitoring and Reporting of Infectious Complications in Immunosuppression Trials in Recipients of Organ Transplantation *American Journal of Transplantation*. 6(2):262-274, February 2006.
18. Blackwell Munksgaard, American Society of Transplantation Recommendations for Screening, Monitoring and Reporting of Infectious Complications in Immunosuppression Trials in Recipients of Organ Transplantation, *American Journal of Transplantation* 2006; 6: 262–274
19. Nalesnik MA. The diverse pathology of post-transplant lymphoproliferative disorders: the importance of a standardized approach. *Transpl Infect Dis* 2001; 3: 88–96.
20. Straathof KC. Immunotherapy for post-transplant lymphoproliferative disease. *Br J Haematol* 2002; 118: 728–740.
21. Mutimer D. Quantitation of Epstein-Barr virus DNA in the blood of adult liver transplant recipients. *Transplantation* 2000; 69: 954–959
22. Straathof KC. Immunotherapy for post-transplant lymphoproliferative disease. *Br J Haematol* 2002; 118: 728–740.
23. Gartner BC. Epstein-Barr viral load as a tool to diagnose and monitor post-transplant lymphoproliferative disease: recent results. *Cancer Res* 2002; 159: 49–54.

24. Rowe DT. Epstein-Barr virus load monitoring: its role in the prevention and management of post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis* 2001; 3: 79–87.
25. Leung, E .Use of real-time PCR to measure Epstein-Barr virus genomes in whole blood. *J. Immunol. Methods* 2002, 270:259–267.
26. Green, M. Predictive negative value of persistent low Epstein-Barr virus viral load after intestinal transplantation in children. *2000 Transplantation* 70: 593–596.
27. Robert M. Wadowsky, Measurement of Epstein-Barr Virus DNA Loads in Whole Blood and Plasma by TaqMan PCR and in Peripheral Blood Lymphocytes by Competitive PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2003, p. 5245–5249 Vol. 41, No. 11
28. Evidence based clinical practice guideline for management of post transplant lymphoproliferative disease (PTLD) following solid organ transplant. Cincinnati Children’s Hospital Medical Center. Evidence based clinical practice guideline for management of post transplant lymphoproliferative disease (PTLD) following solid organ transplant. Cincinnati (OH): Cincinnati Children’s Hospital Medical Center, 2003.
29. Swinnen LJ: Aggressive treatment for post-cardiac transplant lymphoproliferation. *Blood* 86: 3333-3340, 1995.
30. Dotti G: Epstein-Barr virus –negative lymphoproliferative disorders in long term survivors after heart, kidney, and liver transplant. *Transplantation* 69: 827-833, 2000.

31. Cesarman E: *BCL-6* gene mutations in posttransplantation lymphoproliferative disorders predict response to therapy and clinical outcome. *Blood* 92: 2294-2302, 1998
32. Majewski M,: The immunosuppressive macrolide RAD inhibits growth of human Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes in vitro and in vivo: A potential approach to prevention and treatment of posttransplant lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4285-4290, 2000.
33. Majewski M : Immunosuppressive TOR kinase inhibitor everolimus (RAD) suppresses growth of cells derived from posttransplant lymphoproliferative disorder at allograft-protecting doses. *Transplantation* 75: 1710-1717, 2003.
34. Nepomuceno RR: Rapamycin inhibits the interleukin 10 signal transduction pathway and the growth of Epstein Barr virus Bcell lymphomas. *Cancer Res* 63: 4472-4480, 2003.
35. Lin JC: Prolonged inhibitory effect of 9- (1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine against replication of Epstein-Barr virus. *J Virol* 50: 50-55, 1984.
36. Darenkov IA: Reduced incidence of Epstein-Barr virus-associated posttransplant lymphoproliferative disorder using preemptive antiviral therapy. *Transplantation* 64: 848-852, 1997.