



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE LOS HERPESVIRUS 4(VEB), 5(CMV), 6(HHV-6), 7(HHV-7) Y
8(VSK) EN PACIENTES PEDIÁTRICOS POST-TRASPLANTADOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

SÁNCHEZ PONCE YESSICA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

DRA. ROCÍO ÁNGELES GARCÍA BECERRA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN.

MÉXICO, CD. MX., ABRIL, 2018



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
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE LOS HERPESVIRUS 4(VEB), 5(CMV), 6(HHV-6), 7(HHV-7) Y
8(VSK) EN PACIENTES PEDIÁTRICOS POST-TRASPLANTADOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

SÁNCHEZ PONCE YESSICA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

DRA. ROCÍO ÁNGELES GARCÍA BECERRA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN.

MÉXICO, CD. MX., ABRIL, 2018


Lic. Ivonne Ramirez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de noviembre de 2017, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **SÁNCHEZ PONCE YESSICA** con número de cuenta **516011622**, con la tesis titulada "**ANÁLISIS DE LOS HERPESVIRUS 4(VEB), 5(CMV), 6(HHV-6), 7(HHV-7) Y 8(VSK) EN PACIENTES PEDIÁTRICOS POST-TRASPLANTADOS**", realizada bajo la dirección del **DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ**:

Presidente: DR. LUIS PADILLA NORIEGA
Vocal: DRA. EUGENIA FLORES FIGUEROA
Secretario: DRA. ROCÍO ANGELES GARCÍA BECERRA
Suplente: DR. SANTIAGO ÁVILA RÍOS
Suplente: DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 23 de febrero de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por permitirme ser parte de su excelente programa y proporcionarme las herramientas y condiciones adecuadas para mi formación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención recibida durante el periodo 2015-2017 (CVU: 704288).

Al Proyecto CONACYT SALUD-2015-2-261307, “Carga viral de los herpesvirus humanos 4, 5, 6, 7 y 8 e inflamación sistémica como marcadores de pronóstico en pacientes pediátricos post-trasplante” por aportar los fondos para esta investigación.

Al Hospital Infantil de México Federico Gómez y al proyecto HIM-2016-021(SSA1237) de fondos federales, “Carga viral de los herpesvirus humanos 4, 5, 6, 7 y 8 e inflamación sistémica como marcadores de pronóstico en pacientes pediátricos post-trasplante” por aportar los fondos para esta investigación.

A mi tutor principal

Dr. Ezequiel Moisés Fuentes Pananá

A los miembros del Comité Tutor

Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Dra. Rocío Ángeles García Becerra

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi tutor principal

Dr. Ezequiel Moisés Fuentes Pananá

Por darme la oportunidad de pertenecer a su extraordinario grupo y por su excelente guía.

A los miembros del Comité Tutor

Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Dra. Rocío Ángeles García Becerra

Por su absoluta disposición para asesorarme y sus valiosas contribuciones a este trabajo.

A mi cotutora

Dra. Abigail Morales Sánchez

Sin su codirección, este trabajo no hubiese sido posible.

A los miembros del jurado evaluador

Dra. Eugenia Flores Figueroa

Dr. Luis Padilla Noriega

Dr. Carlos Rosales Ledezma

Dr. Santiago Ávila Ríos

Por su disponibilidad y por todo el apoyo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi madre, Eva Ma. Ponce, por enseñarme a defender mis ideales sin importar las adversidades. Por ser mi ejemplo de fortaleza y bondad.

A mi padre, José Luis Sánchez, por procurar mi felicidad. Por su increíble capacidad de encontrar bienestar en la simpleza.

A mi hermano, Jonathan, por alentarme, escucharme y por su extraordinaria empatía con los seres vivos.

A mi hermana, Guadalupe Yazmín, por acompañarme en tantas aventuras y por su desmesurado interés por experimentar la vida.

A mi hermano, José Luis, por exhortarme a estudiar biología, transmitirme su pasión por la ciencia y por ser un ejemplo de compromiso social.

A mis sobrinos, leo y luci, por sus hermosos dibujos y su inocencia que me recuerdan la verdadera importancia de la vida.

A Verónica González por acompañarme en este viaje hasta el final, por ser mi amiga y hermana y por llenar esta etapa de mi vida con grandes y felices momentos. A Eloísa Torres por cuidarme, por darme ánimos y por tantas risas en este ciclo. Gracias a las dos por formar esta mini-familia conmigo.

A mi cotutora la Dra. Abigail Morales Sánchez, por asesorarme paso a paso durante todo este proceso con infinita paciencia, por su ejemplo de inteligencia y tenacidad. Por enseñarme tanto, académica y personalmente y sobre todo por su valiosa amistad.

A mis amigas, Mariana Solís, por escucharme y creer en mí, por ser honesta y genuina. A Laura Rodríguez, por llenar mis memorias con gratos recuerdos, por ser valiente y única. A

Adriana Andrade, por ese viaje inolvidable. A Dulce Chávez y Cecilia Castillo por todo lo compartido en estos años. A todas gracias por permanecer.

A Israel Morales, por las aventuras y los momentos compartidos y por enseñarme que todo es transitorio en esta vida.

A mi tutor el Dr. Ezequiel Fuentes Pananá por abrirme las puertas de su laboratorio. Por su gran liderazgo, por procurar el bienestar académico y personal de sus estudiantes, incluyéndome. Por su pasión y compromiso con la ciencia y por su gran calidad humana.

A Viridiana Olivares por su invaluable apoyo en este trabajo. A la Dra. Isabel Tussié, a mis muy apreciados compañeros del laboratorio, Nancy Espinoza, Selene Herrera, Karen Gaytán, Cecilia Suárez, Karina Chávez, Angelica Aponte, Raúl Sol, Moisés Rojas, Eric López y al señor Miguel Ramos por hacerme parte en su equipo de trabajo y crear un ambiente armonioso y alegre. Por ser un modelo de arduo trabajo, sin perder la buena actitud, por su gran compromiso y sus ganas de sobresalir en la vida.

A la UNAM por otorgarme el título de puma, que porto con gran orgullo. “Por mi raza hablará el espíritu”

DEDICATORIA

A mi familia por su apoyo incondicional.

Por inspirarme a ser una mejor persona.

Por ser mi razón de levantarme cada día.

*“El cazador ha de ir siempre un poco hambriento, pues el hambre
agudiza los sentidos”*

(Luis Sepúlveda)

ÍNDICE

Índice de Tablas.....	I
Índice de Figuras.....	II
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Herpesvirus humanos.....	5
1.1.1. Herpes virus humano 4 (HHV-4) o Virus de Epstein-Barr (VEB).....	6
1.1.2. Herpes virus humano 5 (HHV-5) o Citomegalovirus (CMV).....	7
1.1.3. Herpes virus humano 6 (HHV-6).....	9
1.1.4. Herpes virus humano 7 (HHV-7).....	10
1.1.5. Herpes virus humano 8 (HHV-8) o virus de sarcoma de Kaposi (VSK).....	10
1.2. Coinfecciones.....	11
1.3. Trasplantes.....	13
1.3.1. Trasplante renal pediátrico.....	14
1.3.2. Trasplante hepático pediátrico.....	15
1.4. Inmunosupresión.....	15
1.5. Complicaciones post-trasplante.....	16
1.5.1. Rechazo del injerto.....	16
1.5.1.1. Rechazo hiperagudo.....	17
1.5.1.2. Rechazo acelerado.....	17
1.5.1.3. Rechazo agudo.....	17
1.5.1.4. Rechazo crónico.....	18
1.5.2. Enfermedad linfoproliferativa post-trasplante (ELPT).....	18
1.6. Pruebas de detección simultánea de secuencias virales.....	19
2. ANTECEDENTES.....	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
4. JUSTIFICACIÓN.....	22
5. HIPÓTESIS.....	23
6. OBJETIVOS.....	24
6.1. Objetivo general.....	24
6.2. Objetivos particulares.....	24
7. METODOLOGÍA.....	25

7.1. Pacientes y diseño del estudio.....	26
7.1.1. Población del estudio.	26
7.2. Estandarización de la PCR multiplex en tiempo real.	26
7.2.1. Elección y diseño de oligonucleótidos y sondas.	26
7.2.1.1. Diseño de oligonucleótidos y sondas de beta actina (ACTB).	26
7.2.1.2. Diseño de oligonucleótidos y sondas del HHV-6 (U31) y el VSK (Lana).....	27
7.3. Construcción de los plásmidos control para las curvas patrón de la PCR multiplex.	27
7.3.1. Cultivo y/o infección de líneas celulares.....	27
7.3.2. Obtención de los fragmentos de ADN viral.	28
7.3.3. Clonación de fragmentos génicos virales.	28
7.3.4. Digestión y secuenciación de los plásmidos virales.....	29
7.4. Estandarización de las curvas patrón para PCR multiplex en tiempo real.....	30
7.4.1. Condiciones de amplificación para la PCR multiplex.....	30
7.4.2. Especificidad de los oligonucleótidos.	30
7.4.3. Sensibilidad analítica.....	31
7.4.4. Confiabilidad predictiva y eficiencia de la curva patrón.....	31
7.4.5. Precisión y rango dinámico de las reacciones de PCR cuantitativas multiplex.	31
7.4.6. Correlaciones entre las reacciones multiplex y las reacciones individuales.....	32
7.5. Análisis de muestras de pacientes.	32
7.5.1. Colecta de muestras.....	32
7.5.2. Extracción de los ácidos nucleicos.....	32
7.5.3. Detección de la carga viral de los cinco herpesvirus de interés	33
7.5.4. Análisis de asociación de las cargas virales con la dosis de inmunosupresión y con episodios de rechazo.....	33
8. RESULTADOS.....	33
8.1. Elección y diseño de oligonucleótidos y sondas.....	33
8.1.1. Diseño de oligonucleótidos y sonda de beta actina.	34
8.1.2. Diseño de oligonucleótidos y sondas del HHV-6 (U31) y el VSK (Lana).....	37
8.2. Construcción de los plásmidos control para la curva de la PCR multiplex.....	39
8.2.1. Clonación de los fragmentos génicos virales.	39
8.2.2. Digestión y secuenciación de los plásmidos virales.....	42
8.3. Estandarización de la curva para PCR multiplex en tiempo real.....	45
8.3.1. Especificidad de los oligonucleótidos.	45

8.3.2.	Sensibilidad analítica.....	46
8.3.3.	Confiabilidad predictiva y eficiencia de la curva patrón.....	46
8.3.4.	Precisión y rango dinámico de las reacciones de PCR cuantitativas multiplex.	47
8.3.5.	Correlaciones entre las reacciones multiplex y las reacciones individuales.....	48
8.4.	Análisis de muestras de pacientes.	51
8.4.1.	Colecta de muestras.....	51
8.4.2.	Detección de la carga viral de los 5 herpesvirus de interés.....	54
8.4.2.1.	Muestras positivas para al menos uno de los herpesvirus.	55
8.4.2.2.	Rangos de detección y distribución de las cargas virales.....	58
8.4.2.3.	Cargas virales positivas sostenidas en el tiempo de manera consecutiva.....	62
8.4.2.4.	Cargas virales positivas a más de un herpesvirus (eventos de coinfección).	63
8.5.	Asociación entre los niveles de infección viral y la dosis de inmunosupresión.	67
8.6.	Asociación entre los niveles de infección viral y episodios de rechazo.	73
9.	DISCUSIÓN	75
9.1.	Pruebas de PCR multiplex en tiempo real para la detección simultánea de secuencias virales.	75
9.2.	Comparación de las cargas virales entre leucocitos y plasma.	76
9.3.	Asociación clínica de las cargas virales.	78
9.4.	Cargas virales positivas sostenidas en el tiempo de manera consecutiva.	82
9.5.	Eventos de coinfección.	83
9.6.	Asociación de los niveles de infección viral con la dosis de inmunosupresor.	84
9.7.	Asociación de los niveles de infección viral con episodios de rechazo.	84
10.	CONCLUSIONES	85
10.1.	Limitantes de estudio y perspectivas.	86
11.	LITERATURA CITADA	87
12.	ANEXOS	94
12.1.	Carta de Asentimiento Informado.	94
12.2.	Carta de Consentimiento Informado.	96
12.3.	Gráficas de las cargas virales de los pacientes positivos.	101
12.4.	Cuadro comparativo de los herpesvirus humanos.	112

Índice de Tablas.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos y sondas de la qPCR multiplex.	34
Tabla 2. Par de oligonucleótidos y sonda elegidos para beta-actina.....	34
Tabla 3. Análisis de los auto-dímeros de los oligonucleótidos y sondas de la 1 ^{er} triplex.	35
Tabla 4. Análisis de los hetero-dímeros de los oligonucleótidos y sondas de la 1 ^{er} triplex.	35
Tabla 5. Par de oligonucleótidos elegidos para el HHV-6.	37
Tabla 6. Análisis de los auto-dímeros de los oligonucleótidos y sondas de la 2 ^a triplex.	37
Tabla 7. Análisis de los hetero-dímeros de los oligonucleótidos y sondas de la 2 ^a triplex.....	38
Tabla 8. Condiciones óptimas de amplificación para los 5 fragmentos virales por PCR punto final.	40
Tabla 9. Media de los coeficientes de determinación (R^2) y de los porcentajes (%) de eficiencia obtenidos para cada fragmento viral.	46
Tabla 10. Coeficientes de variación de cada reacción con un 95% de confiabilidad.	48
Tabla 11. Concentraciones optimizadas de los reactivos utilizados en la PCR multiplex.	49
Tabla 12. Coeficientes de correlación (R) del número de copias virales obtenidas entre cada una de las reacciones de amplificación de los virus en formato individual con respecto a la multiplex.	49
Tabla 13. Datos clínico-demográficos de los pacientes sometidos a trasplante.	52
Tabla 14. Seguimiento de los pacientes.....	53
Tabla 15. Resumen de muestras positivas por virus.	55
Tabla 16. Cargas virales del paciente TR17.	56
Tabla 17. Rangos de detección de los herpesvirus beta y gamma en leucocitos y plasma.	58
Tabla 18. Rangos de distribución de las cargas virales de los herpesvirus en leucocitos y plasma.	60
Tabla 19. Medianas y rangos de las cargas virales de los herpesvirus en leucocitos y plasma.	60
Tabla 20. Cargas virales positivas sostenidas.	62
Tabla 21. Eventos de coinfección.	64

Índice de Figuras.

Figura 1. Esquema de la partícula viral de un herpesvirus (modificado de [2]).	5
Figura 2. Secuencias de los fragmentos amplificados para los genes beta-actina y U31.	39
Figura 3. Ejemplo de las PCRs punto final ensayadas.	41
Figura 4. Esquema de la clonación de los fragmentos virales de interés.	42
Figura 5. Digestión de los plásmidos virales.	43
Figura 6. Alineamiento de fragmentos virales clonados en Standard Nucleotide-Blast.	45
Figura 7. Curvas MELT de los cinco fragmentos virales.	45
Figura 8. Curvas de fluorescencia de los cinco plásmidos virales.	47
Figura 9. Correlación entre ensayos individuales y multiplex.	50
Figura 10. Periodicidad en la toma de muestras.	54
Figura 11. Gráfica de las cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR17.	57
Figura 12. Muestras positivas por herpesvirus.	58
Figura 13. Número de muestras positivas observadas en leucocitos y en plasma por herpesvirus.	59
Figura 14. Distribución de las cargas virales.	61
Figura 15. Cargas virales sostenidas en muestras consecutivas.	62
Figura 16. Gráfica de las cargas virales del paciente TH6.	63
Figura 17. Eventos de infección individual y conjunta.	65
Figura 18. Proporción de los distintos eventos de coinfección, de acuerdo al tipo de herpesvirus.	65
Figura 19. Gráfica de las cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR15.	66
Figura 20. Gráfica del universo muestral.	67
Figura 21. Cinética de las cargas virales en relación a la dosis de inmunosupresión del paciente TR1.	68
Figura 22. Cinética de las cargas virales en relación a la dosis de inmunosupresión del paciente TR5.	68
Figura 23. Cinética de las cargas virales en relación a la dosis de inmunosupresión del paciente TR6.	69
Figura 24. Cinética de las cargas virales en relación a la dosis de inmunosupresión del paciente TR10.	69
Figura 25. Cinética de las cargas virales en relación a la dosis de inmunosupresión del paciente TR15.	70
Figura 26. Cinética de las cargas virales en relación a la dosis de inmunosupresión del paciente TH7.	70
Figura 27. Cinética de las cargas virales en relación a la dosis de inmunosupresión del paciente TR6.	72
Figura 28. Cinética de las cargas virales y la asociación con episodios de rechazo del paciente TR1.	73
Figura 29. Cinética de las cargas virales y la asociación con episodios de rechazo del paciente TR5.	74
Figura 30. Cinética de las cargas virales y la asociación con episodios de rechazo del paciente TR13.	74

RESUMEN

Los herpesvirus humanos de las subfamilias beta y gamma (VEB, CMV, HHV-6, HHV-7 y VSK) son agentes asociados a una amplia diversidad de patologías, poseen las propiedades de transformar a la célula que infectan en una célula tumoral y/o participan como potenciales cofactores en el desarrollo de distintas neoplasias. Estos virus son habituales residentes humanos, que resultan particularmente relevantes en procesos patológicos que requieren inmunovigilancia. Por ejemplo, en inmunodeficiencias primarias y/o adquiridas y en inmunosupresión farmacológica post-trasplante. En los pacientes trasplantados, la infección con los herpesvirus beta y gamma puede tener una doble consecuencia. Los efectos de la propia enfermedad infecciosa y el efecto inmunomodulador, que contribuye al rechazo del injerto y favorece la coinfección de otros patógenos, exacerbando la infección latente o promoviendo la infección por otro herpesvirus. Estas propiedades ocasionan altas tasas de morbilidad y mortalidad. Lo anterior, denota la importancia clínico-biológica de estudiar a los herpesvirus cuantitativa y conjuntamente. A pesar de ello, los trabajos que incluyen análisis cuantitativos simultáneos entre estos herpesvirus, son restringidos, esto debido en parte a que no existe una técnica cuantitativa que permita la detección simultánea de los cinco miembros de las subfamilias beta y gamma. El desarrollo de una técnica de detección y cuantificación simultánea de estos herpesvirus, es sumamente importante, pues permitirá identificar sus cargas virales de manera conjunta.

En este trabajo, se estandarizó una técnica de PCR en tiempo real cuantitativa multiplex, que permitió la detección y cuantificación simultánea de los herpesvirus humanos beta y gamma. Se demostró que esta técnica fue altamente específica, sin reactividad cruzada entre los herpesvirus. Presentó alta sensibilidad analítica, con límites de detección entre 18 y 25 copias virales. Mostró una confiabilidad predictiva entre un 98 y un 99%, con una eficiencia de entre un 93 y un 100% y una precisión mayor al 95% en un rango dinámico de seis magnitudes, desde 10 hasta un millón de copias virales. Esta PCR multiplex resultó similar a las técnicas de PCR tiempo real simples.

La técnica se probó en una cohorte de 28 pacientes pediátricos, sometidos a trasplante de órgano sólido (21 de trasplante renal y 7 de trasplante hepático) en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, con un seguimiento de 8 a 12 meses post-trasplante. Se colectaron en promedio 16 muestras de sangre periférica por paciente para un total de 415, de las cuales

se separó el plasma y los leucocitos y se purificó el ADN de ambas fracciones sanguíneas. Se determinó la carga viral de los 5 herpesvirus de interés en las 830 muestras de ADN obtenidas (415 de leucocitos y 415 de plasma). Se observó un alto índice de infección de los herpesvirus analizados en los pacientes post-trasplantados, ya que el 79% (22 pacientes) resultó positivo al menos a uno de los herpesvirus analizados. De estos pacientes, el 54% (12 pacientes) presentó muestras consecutivas cuyas cargas virales se mantuvieron positivas para el mismo herpesvirus; y el 45% (10 pacientes) presentó cargas virales a más de un herpesvirus.

El HHV-7 fue el herpesvirus más frecuentemente encontrado en las muestras positivas, el que mantuvo el mayor número y el rango más amplio de cargas virales sostenidas, y en conjunto con VEB el de mayor frecuencia en los eventos de coinfección viral. El HHV-6 fue el herpesvirus que alcanzó los valores de carga viral más altos (3.7 millones de copias por ml de plasma). El VSK no fue detectado en este estudio, sugiriendo una baja prevalencia en nuestra población. En estos pacientes el VEB y el HHV-6 fueron principalmente asociados a infecciones líticas (detección en plasma) mientras que el CMV y el HHV-7 fueron asociados principalmente a infecciones latentes (detección en leucocitos). El rango de distribución de los valores de las cargas virales fue muy amplio siendo dichos valores mayores en plasma. En relación a la inmunosupresión, el incremento del VEB y el CMV se asoció con una consecuente disminución de la dosis de tacrolimus. También se observó una asociación entre el incremento de carga viral y episodios de rechazo, principalmente en un contexto de coinfección. En los pacientes inmunocomprometidos como los receptores de trasplantes que son susceptibles a infecciones, el monitoreo cuantitativo de estos virus servirá como guía para mantener un adecuado protocolo de inmunosupresión y de tratamiento antiviral. Es necesario un análisis amplio de asociación clínica con nuestros resultados para comprender mejor la relevancia de este estudio.

ABSTRACT

Human herpesviruses of the beta and gamma subfamilies (EBV, CMV, HHV-6, HHV-7 and KSV) are associated with a wide diversity of pathologies. They are able to transform the cell they infect or participate as cofactors in the progression of different neoplasia. These viruses are common human residents, which are particularly relevant in pathological processes that require immunosurveillance. For example, in primary and acquired immunodeficiencies and in post-transplant pharmacological immunosuppression. In these patients, infection by the beta and gamma herpesviruses potentially have a double detrimental effect. The effects of the infectious disease itself and the immunomodulatory effect, that contributes to the rejection of the graft and increase the risk to coinfection of other pathogens, including the exacerbation of the latent or primary infection of another herpesvirus, thus allowing events that would increase its pathogenic effects. These properties cause high morbidity and mortality rates. The above, denotes the clinical-biological importance of studying herpesviruses quantitatively and jointly. In spite of this, the studies that include simultaneous quantitative analyzes of these herpesviruses are limited, this is due in part to the fact that there is not a quantitative technique that allows the simultaneous detection of the five beta and gamma herpesviruses. The development of a technique for the simultaneous detection and quantification of these herpesviruses is extremely important, since it will allow us to identify their viral loads jointly.

In this study, we develop a multiplex real-time PCR technique that allows the simultaneous detection and quantification of the beta and gamma human herpesviruses. The Multiplex PCR was highly specific, without cross-reactivity between herpesviruses. It presented high analytical sensitivity, with detection limits between 18 and 25 viral copies, a predictive reliability between 98 and 99%, an efficiency of 93 to 100%, accuracy greater than 95% in a dynamic range of six magnitudes, from 10 to a million viral copies. This multiplex was as efficient as simple real-time PCR techniques.

The PCR multiplex was tested in a cohort of 28 solid organ transplanted pediatric patients (21 from renal transplant and 7 from hepatic transplant) assisted at the Children's Hospital of Mexico Federico Gómez. The follow-up of these patients was 8 to 12 months post-transplant. 415 peripheral blood samples were collected. DNA was purified from plasma and leukocytes

separately. The viral load of the five herpesviruses of interest was determined in the 830 DNA samples (415 leukocytes and 415 plasma).

A high infection rate of the herpesviruses analyzed in the post-transplant patients was observed, since 79% (22 patients) tested positive to at least one of the herpesviruses analyzed. Of these patients, 54% (12 patients) presented consecutive samples whose viral loads remained positive for the same herpesvirus; and 45% (10 patients) presented viral loads to more than one herpesvirus. The HHV-7 was the herpesvirus most frequently found in the positive samples (42%) and also the one with the highest number and the widest range of positive consecutive samples. Additionally, HHV-7 had the most coinfection events in conjunction with EBV. HHV-6 was the herpesvirus that presented the highest viral loads (3.7 million copies per ml of plasma). KSV was not detected in this study, suggesting a low prevalence in our population. In these patients, EBV and HHV-6 are mainly lytic while CMV and HHV-7 are mainly latent, since they were mostly detected in plasma and leukocytes, respectively. The range of distribution of viral load values was very wide, observing that they were higher in plasma. The increase of the immunosuppressant seems to correlate with an increase in the viral loads of the herpesviruses analyzed. However, only the increase in EBV and CMV correlates with a consequent decrease in the immunosuppressant dose. There is an association between increased viral load of positive herpesviruses and episodes of rejection. Mainly in a context of coinfection. In immunocompromised patients such as transplant recipients who are susceptible to infections, the quantitative monitoring of these viruses will serve as a guide to maintain an adequate protocol of immunosuppression and antiviral treatment. However, a broad correlative analysis between our data and the clinical outcome is necessary to further understand the relevance of this study.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Herpesvirus humanos.

Los herpesvirus humanos se dividen en tres subfamilias: la subfamilia alphaherpesvirinae (α -herpesvirinae), incluye a los virus Herpes simple tipo 1 (HVS-1), Herpes simple tipo 2 (HVS-2) y Varicela Zóster (VZV); la subfamilia betaherpesvirinae (beta-herpesvirinae), incluye al Citomegalovirus (CMV), al herpesvirus tipo 6 (HHV-6) y al herpesvirus tipo 7 (HHV-7); y la subfamilia gammaherpesvirinae (γ -herpesvirinae) que incluye el virus de Epstein Barr (VEB) y el virus de Sarcoma de Kaposi (VSK). La familia Herpesviridae se caracteriza por tener un genoma de una única molécula de doble cadena de ADN de 124 a 230 kb, que está rodeado con una cápside icosaédrica de 162 capsómeros, recubiertos de una envoltura viral compuesta de numerosas glicoproteínas ^[1] (Figura 1).

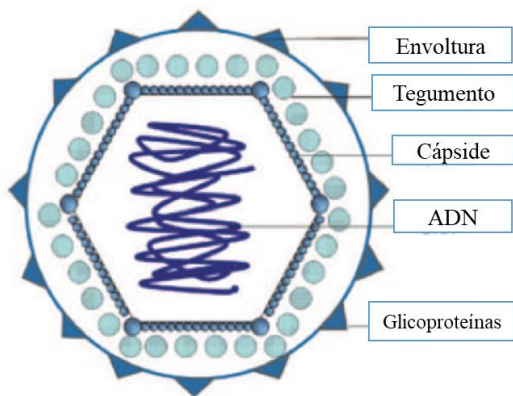


Figura 1. Esquema de la partícula viral de un herpesvirus (modificado de ^[2]).

Los herpesvirus comparten cuatro propiedades biológicas importantes:

1. Cuentan con una gran variedad de enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos, en la síntesis de ADN y en el procesamiento de proteínas.
2. La síntesis de ADN y el ensamblado de la cápside tienen lugar en el núcleo, mientras que el procesamiento final del virión ocurre en el citoplasma.
3. La producción de progenie viral infecciosa está invariablemente acompañada por la destrucción de la célula infectada.
4. Presentan un ciclo de vida bifásico, tienen la capacidad de establecer una infección persistente en sus hospederos naturales y mantenerse en fase latente y también son capaces de reactivarse y entrar en una fase lítica ^[1, 3].

En la fase de latencia, el genoma viral toma forma de un círculo cerrado (episoma) y sólo una pequeña cantidad de genes virales es expresada, lo que le permite establecerse de manera persistente en células del sistema inmune maduras y sus progenitoras, por lo que la detección en leucocitos se asocia con esta fase del ciclo. En la fase lítica el genoma viral se reactiva encendiendo los genes necesarios para la producción de progenie viral, lisando la célula hospedera y liberando partículas víricas, por lo cual la detección de ADN viral en plasma se asocia a esta fase del ciclo.

Los miembros de las subfamilias beta y gamma son habituales residentes humanos, que particularmente en individuos inmuno-comprometidos son causa frecuente de morbilidad y mortalidad. Presentan un amplio tropismo, infectando principalmente células del sistema inmune como linfocitos B, linfocitos T, monocitos, neutrófilos, células dendríticas y sus progenitores hematopoyéticos; pero también células endoteliales y epiteliales ^[1]. También poseen la propiedad de poder transformar a la célula que infectan en una célula tumoral y/o participan como potenciales cofactores en el desarrollo de distintas malignidades. Por estas propiedades son virus importantes en procesos clínicos que requieran inmunovigilancia, por ejemplo en inmunodeficiencias primarias y/o adquiridas y en inmunosupresión farmacológica como en el caso de pacientes post-trasplante. A continuación se describen a más detalles los herpesvirus beta y gamma.

1.1.1. Herpes virus humano 4 (HHV-4) o Virus de Epstein-Barr (VEB).

El VEB o HHV-4 pertenece al género de linfocriptovirus, se subdivide en dos subtipos comúnmente conocidos como tipo 1 y 2 ^[4]. Se encuentra ampliamente distribuido en la población humana, más del 90% de los adultos son seropositivos ^[5]. Se propaga por vía oral, infecta durante los primeros años de vida de manera asintomática, aunque ocasionalmente la primo-infección se da en adolescentes y adultos jóvenes causando mononucleosis infecciosa ^[1, 6]. Se replica en células epiteliales de la orofaringe y establece una latencia a largo plazo en linfocitos B de memoria, con la capacidad de causar de manera eficiente su expansión continua, lo que correlaciona con su potencial oncogénico, y que ha permitido clasificar al VEB como un agente carcinogénico tipo I, los más fuertemente asociados a cáncer en humanos ^[7, 8]. El VEB fue identificado como el primer virus tumoral humano, relacionado

directamente con el linfoma de Burkitt (LB), y desde entonces se ha asociado con un grupo heterogéneo de linfomas y carcinomas ^[4,9], que incluyen además de LB: linfoma de Hodgkin, linfomas de células T y de células asesinas naturales (NK), carcinoma nasofaríngeo, carcinoma gástrico, entre otros ^[4, 9, 10].

En los pacientes inmunocomprometidos como aquellos sometidos a trasplante de órgano sólido (TOS), se debe tener especial cuidado en la vigilancia de aparición de complicaciones por el VEB, que pueden ser desde sepsis, hasta la enfermedad linfoproliferativa post-trasplante (ELPT) ^[11-13], que representa una de las afectaciones más graves a las cuales se puede enfrentar un paciente trasplantado.

1.1.2. Herpes virus humano 5 (HHV-5) o Citomegalovirus (CMV).

El CMV se encuentra universalmente distribuido entre las poblaciones humanas, con un rango de prevalencia entre el 52-99% ^[14, 15], siendo mayor en los países en desarrollo en donde además la infección se adquiere a una edad más temprana. Se transmite principalmente por contacto casual a partir de secreciones del cuerpo infectadas como saliva, orina, semen o secreciones cervicales ^[1]. Se replica en células epiteliales de glándulas salivales y renales con liberaciones esporádicas en fluidos corporales, mientras que de manera latente se aloja en células progenitoras hematopoyéticas que incluyen varios tipos de progenitores mieloides, así como en células mieloides diferenciadas ^[1, 16-19]. La posible relación entre la infección por el CMV y el cáncer se ha investigado durante décadas, la detección de ADN viral, ARNm y/o antígenos en tejidos tumorales sugirió un papel de la infección por el CMV en la etiología de varias malignidades humanas. No obstante, no hay pruebas concluyentes de la transformación de las células normales mediada por la infección del CMV, por lo que no se considera oncogénico. Sin embargo, sí se propone como un importante oncomodulador, ya que puede infectar células tumorales y modular sus propiedades malignas favoreciendo la progresión tumoral de una manera que no implica una transformación directa ^[20]. En líneas celulares de neuroblastomas persistentemente infectadas con el CMV se ha observado una mayor capacidad de crecimiento tumoral y de formación de metástasis en comparación con células no infectadas ^[20], esto correlaciona con estudios que han encontrado que el virus codifica proteínas que interfieren con vías de señalización asociadas a procesos celulares

como la proliferación, supervivencia, angiogénesis, motilidad y adhesión ^[15,21]. La capacidad oncomoduladora del CMV se ha evidenciado en glioblastomas de alto grado, pero también existen propuestas de que participa en el sarcoma de Kaposi, carcinoma de colon, adenocarcinoma de próstata, carcinoma cervical, tumor de Wilm's, neuroblastomas, linfoma cutáneo de células T y linfoma de Hodgkin negativo al VEB ^[21].

La infección por el CMV es la infección vírica más frecuente y una causa importante de morbilidad y mortalidad en el paciente sometido a TOS. Las complicaciones aparecen entre el segundo y tercer mes post-trasplante. Entre el 40% y hasta el 90% de los receptores de TOS presentan episodios de viremia por el CMV ^[12, 22, 23], ya sea por primo-infección o reactivación viral. Sin embargo, cargas virales altas no son sinónimo de enfermedad, sólo entre el 8-23% de pacientes con viremia desarrollan la enfermedad por el CMV ^[24]. La infección asintomática se caracteriza por excreción del virus en orina y saliva, viremia y/o antigenemia ^[13]. Las manifestaciones clínicas son variadas, en enfermedad por el CMV, la viremia va acompañada de un síndrome febril con o sin leucotrombocitopenia y mialgias, o puede haber afectación de órganos específicos como en los casos en que se desarrolla hepatitis, gastroenteritis, retinitis, meningitis, miocarditis, pancreatitis, nefritis o neumonía ^[1, 12, 13, 22, 25]. También pueden presentarse efectos indirectos, por ejemplo la infección por el CMV *per se* produce un estado de inmunosupresión transitoria que favorece la predisposición a infecciones oportunistas y el desarrollo de neoplasias ^[23, 26]. Se ha propuesto que el CMV incrementa 7 a 10 veces el riesgo de sufrir ELPT causada por el VEB, e incrementa el riesgo del rechazo al injerto tanto agudo como crónico. La relación entre rechazo y el CMV parece ser bidireccional de forma que el CMV puede desencadenar rechazo y la inflamación causada por el rechazo puede aumentar la replicación viral; además puede relacionarse con el síndrome del conducto biliar perdido en trasplante hepático y la glomerulopatía crónica del trasplante renal ^[1, 22-25, 27].

La adquisición de la infección por el CMV a través del órgano trasplantado (receptor seronegativo que recibe un órgano procedente de un donante seropositivo) o de los productos sanguíneos utilizados durante la cirugía, coloca al receptor en un alto riesgo de desarrollar enfermedad por el CMV. Otros factores de riesgo son el estado general de inmunosupresión según lo determinado por el protocolo inmunosupresor (tipo de fármaco, dosis y duración);

factores del hospedero (edad, leucopenia, linfopenia y factores genéticos) [23]. Las coinfecciones con los herpesvirus humanos HHV-6 y HHV-7 también han sido sugeridas como factores de riesgo [28].

1.1.3. Herpes virus humano 6 (HHV-6).

El HHV-6 pertenece al género roseolovirus, actualmente se reconoce que alberga a dos especies distintas, el HHV-6A y el HHV-6B con un ciclo de vida altamente similar. Por simplificación en este trabajo nos vamos a referir a las dos especies A y B como el HHV-6. El HHV-6 infecta a más del 90% de las personas en los primeros 9 meses de vida [29, 30]. Su modo de transmisión no es completamente conocido, se sugiere que ocurre horizontalmente a través de la saliva, aunque no se descarta la transmisión vertical [1]. Los linfocitos T CD4+ representan la población celular en la que el HHV-6 se replica de manera más eficiente [31, 32]. Los sitios candidatos para la persistencia viral son las glándulas salivales, tejido cerebral y en células progenitoras de la médula ósea [32-34]. Se describió que el HHV-6 tiene actividades inmunomoduladoras al inducir la secreción de interleucina 1beta (IL-1beta), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interferón- α (IFN- α) en cultivos de leucocitos [31]. Se ha descrito que la infección de linfocitos por el HHV-6 en el tejido tumoral afecta la histología y progresión en un subconjunto de linfomas: linfoma no-Hodgkin, enfermedad linfoproliferativa crónica de células T, carcinoma de glándulas salivares y otras neoplasias [32, 35, 36]. También se le ha identificado como un cofactor para acelerar la inmunodepresión en pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), y se asocia además a exantema súbito, síndrome de fatiga crónica, esclerosis múltiple y otros desórdenes neurológicos [1, 2, 35, 37].

La incidencia de infección post-TOS varía entre un 23 y un 66%. Se ha descrito tanto en trasplante renal como hepático y reno-pancreático. La infección por este virus se ha asociado con cuadros febriles en las primeras semanas post-trasplante, con casos graves de citopenias, meningoencefalitis, neumonitis, hepatitis, aplasia medular [1, 12] y con rechazo de riñón [38-41]. Además puede actuar como cofactor en el desarrollo de la enfermedad por CMV, y dado que reside en linfocitos T podría favorecer el rechazo celular del órgano trasplantado y la aparición de infecciones oportunistas por hongos o bacterias [12].

1.1.4. Herpes virus humano 7 (HHV-7).

El HHV-7 pertenece al género roseolovirus, se encuentra ampliamente diseminado en la población general, la seroprevalencia (60-90%) aumenta en torno a los dos años de edad [12, 42-44]. Es muy probable que se transmita predominantemente por vía oral ya que se disemina continuamente en la saliva de adultos sanos [42]. Su tropismo parece ser menos amplio, infecta linfocitos T CD4+ (se cree es el sitio de infección latente) y células epiteliales de la glándula salival (sitio de infección productiva y esparcimiento viral) [42, 45]. Además se han detectado células infectadas por el HHV-7 en pulmón, piel y glándulas mamarias y en una menor frecuencia en hígado, riñón y amígdalas [46]. Aunque la frecuencia de manifestaciones clínicas es menor, la infección primaria por el HHV-7 es similar a la ocasionada por el HHV-6, asociándose con exantema súbito, altas fiebres, citopenia, leucopenia, hepatitis, linfadenopatías y síntomas neurológicos como convulsiones febriles [1, 37, 45, 47-49]. Su tropismo celular en linfocitos T y la capacidad de inducir la producción de citocinas en las células infectadas podrían convertirlo en un importante cofactor patogénico en los trastornos linfoproliferativos. Existen algunos estudios sobre su posible papel en los linfomas cutáneos primarios de células T, sin embargo esto es controversial [50].

Existe información limitada sobre el papel de la infección por el HHV-7 en pacientes post-trasplante, se ha sugerido que podría tener un papel en el retraso de la función del injerto renal y encefalitis. Varios autores han observado que la infección por el HHV-7 se asocia con una mayor incidencia de enfermedad por CMV [12, 42, 47].

1.1.5. Herpes virus humano 8 (HHV-8) o virus de sarcoma de Kaposi (VSK).

El VSK pertenece al género rhadinovirus, presenta 6 subtipos (A, B, C, D, E y N), que se encuentran distribuidos de manera diferente alrededor del mundo [51]. La seroprevalencia varía entre áreas geográficas: en países o regiones no endémicos (Estados Unidos, norte de Europa y Asia) es baja, de entre 1 a 3%, y la vía principal de transmisión es la sexual. En contraste, en países endémicos (Mediterráneo, África y Perú) va desde 20% hasta 70%, las altas prevalencias se presentan principalmente en individuos cuyas edades fluctúan entre 1 y 15 años, lo que significa que la mayoría de ellos adquirieron la infección durante la infancia.

Esto sugiere la existencia de una ruta de transmisión no sexual, particularmente se ha propuesto la transmisión materno-fetal [2, 51, 52]. El VSK puede persistir en estado latente a niveles indetectables en los linfocitos B y en células multipotentes de médula ósea [52]. Las manifestaciones clínicas son inespecíficas, se ha observado fiebre, artralgias, edema, artrosinovitis, esplenomegalia, linfadenopatía, diarrea, fatiga y rash eritematoso, estos síntomas han sido reportados en asociación con la primo-infección, además se reporta una correlación entre las manifestaciones clínicas y los niveles de replicación viral [51]. El VSK es considerado un agente carcinogénico y es el agente etiológico del sarcoma de Kaposi, también se le ha implicado en la patogénesis de dos desórdenes linfoproliferativos raros asociados a SIDA: algunas formas de la enfermedad multicéntrica de Castleman y linfoma de efusión primario [1, 51, 53, 54].

El sarcoma de Kaposi es relativamente común entre los pacientes trasplantados, representa el 3% de todas las neoplasias *de novo* que se desarrollan en receptores de TOS. En algunas poblaciones, el riesgo de desarrollar sarcoma de Kaposi puede ser muy alto, hasta 400 o 500 veces mayor en pacientes inmunosuprimidos como los pacientes trasplantados, que en controles sanos. Por ejemplo, en Arabia Saudita, en los pacientes sometidos a trasplante renal, el sarcoma de Kaposi representa la neoplasia más común; la infección por el VSK puede ser tanto previa al trasplante como transmitida por el donante. En una revisión de 28 casos de sarcoma de Kaposi en pacientes con trasplante renal y hepático sometidos a terapia inmunosupresora se demostró una alta prevalencia de ADN del VSK en lesiones neoplásicas de pacientes [55].

Se resumen las características de los herpesvirus humanos de las subfamilias beta y gamma en el cuadro comparativo del anexo 12.4.

1.2. Coinfecciones.

La similitud biológica entre estos herpesvirus y su alta prevalencia en la población nos llevó a proponer que potencialmente puede existir una comunicación entre ellos que potencie sus efectos patogénicos. Existen algunos estudios que apoyan nuestra propuesta: en linfomas asociados al VIH, como el de efusión primaria, entre el 50-70% de los casos, el VSK y el

VEB se encuentran coinfectando la célula neoplásica, apoyando un papel conjunto, siendo este el primer ejemplo de una infección por herpesvirus dual consistente en una neoplasia humana, proporcionando un modelo único para estudiar las interacciones virales ^[56]. También se ha reportado que la infección activa del CMV precede el inicio del sarcoma de Kaposi ^[57], sin embargo, no se conoce exactamente cuál es el mecanismo celular o molecular. Un estudio *in vitro* propuso que en la coinfección de estos virus, el CMV puede influenciar la expresión de genes líticos del VSK y activar su replicación viral, sugiriendo que el CMV puede impactar la patogénesis del VSK ^[58]. Un estudio retrospectivo que incluyó pacientes pediátricos con sospecha de mononucleosis infecciosa, mostró que la primo y coinfección del VEB y el CMV aumentó el riesgo de contraer infecciones múltiples de virus respiratorios, incrementó la severidad de síntomas clínicos y la duración de la estancia hospitalaria en comparación con los individuos infectados por un solo virus ^[59]. En un análisis del espectro mutacional y viral de linfoma de Burkitt endémico se observó la coinfección del VEB con el CMV y el VSK, sugiriendo que pueden contribuir a la estimulación antigénica crónica y participar en la inducción del ciclo lítico del VEB a través de la reactivación de células B y el esparcimiento de la infección por el VEB fuera de su nicho natural, que son las células B de memoria ^[60].

A pesar de que los pacientes inmunosuprimidos farmacológicamente, por ejemplo post-trasplante, representan un modelo biológico ideal para el estudio de las interacciones entre los herpesvirus beta y gamma, los reportes sobre coinfecciones entre ellos son escasos. En un monitoreo de pacientes sometidos a trasplante de hígado tanto de adultos como de jóvenes se encontró la coinfección del CMV y el HHV-6 en 26% de las muestras analizadas, el VEB y el CMV en el 11% y entre el VEB y el HHV-6 en el 5%, sin encontrar resultados concluyentes sobre asociaciones entre las coinfecciones encontradas y episodios de rechazo u otras manifestaciones clínicas ^[61]. En otro estudio realizado en pacientes sometidos a trasplante de hígado, riñón, corazón, páncreas y pulmón que desarrollaron la enfermedad por CMV se observó eventos de coinfección entre el CMV, el HHV-6 y el HHV-7 sugiriendo que interacciones entre estos virus promueven la replicación del CMV, y que la enfermedad causada por este agente viral en realidad podría ser el resultado de la interacción de los tres herpesvirus ^[62-65].

1.3. Trasplantes.

La descripción de las enfermedades y manifestaciones clínicas a las cuales se asocia cada uno de los herpesvirus de interés, que se describió en el apartado anterior, nos permite distinguir que existen patologías que se asocian de manera importante a los herpesvirus, frecuentemente a más de uno de ellos, lo que respalda nuestra propuesta de una posible cooperación viral y denota la importancia clínica de estudiarlos de manera conjunta. Entre este grupo de enfermedades y manifestaciones clínicas que se asocian a más de un herpesvirus se resaltan aquellas asociadas al trasplante, esto debido al inmunocompromiso al que son sometidos los pacientes trasplantados, lo que los vuelve particularmente susceptibles a estos agentes. Adicionalmente, los herpesvirus presentan la capacidad de producir inmunosupresión transitoria favoreciendo la coinfección de otros patógenos, incluida la exacerbación de la infección latente de otro miembro de la misma familia, permitiendo así eventos que aumentarían los efectos patogénicos e incrementarían la vulnerabilidad de los pacientes trasplantados. Por esta razón, el trasplante se eligió como modelo para analizar las infecciones y coinfecciones de los herpesvirus de las subfamilias beta y gamma.

El trasplante es uno de los avances médicos más importantes y actualmente sigue representando la única alternativa terapéutica en aquellos padecimientos crónico-degenerativos cuya consecuencia es la insuficiencia de algún órgano. Dada su importancia y gracias a su efectividad en el panorama mundial, el número de trasplantes tanto en adultos como en niños se han incrementado en los últimos años. De acuerdo a la Organización Global de Observación en Donación y Trasplante asociada a la Organización Mundial de la Salud, se estima que en 2015 se realizaron 126,670 TOSs principalmente de riñón, hígado y corazón ^[66]. México se une a este incremento generalizado, reportando 2,960 TOSs en el 2015 ^[67]. El Hospital Infantil de México Federico Gómez es uno de los principales centros de TOS pediátrico y de células progenitoras hematopoyéticas en nuestro país, cuenta con tres programas de TOS, hígado, riñón y corazón ^[68]. Este trabajo se centra en pacientes pediátricos incluidos en los programas de trasplante renal y hepático, los más comunes del HIMFG.

El trasplante se define como la transferencia de órganos, tejidos o células vivas desde un organismo donante a otro receptor, para sustituir el tejido u órgano enfermo con el objetivo de mantener su integridad funcional en el receptor ^[11, 69].

En función de la relación donante-receptor, se reconocen cuatro tipos de trasplantes ^[11]

1) Aloinjerto u homoinjerto	• Cuando donante y receptor son genéticamente diferentes pero de la misma especie.
2) Xenoinjerto, heteroinjerto o heterólogo	• Cuando donante y receptor son de especies distintas (ejemplo: válvulas cardíacas de cerdo en humanos).
3) Autoinjerto	• Es la transferencia de tejidos de un sitio a otro en el mismo individuo (ej.: injerto óseo para estabilizar fracturas).
4) Trasplante singénico o Isoinjerto	• Es la transferencia de tejidos entre gemelos idénticos entre los que no hay rechazo.

Los donantes pueden ser vivos o cadavéricos; existen diversos criterios de selección y exclusión tanto para el donante como para el receptor, se evalúan aspectos como la historia clínica, la serología, histocompatibilidad entre muchos otros.

1.3.1. Trasplante renal pediátrico.

Las uropatías complejas son una causa frecuente de uremia en niños y constituyen hasta 32% de las indicaciones para trasplante ^[70]. En el HIMFG la gran mayoría de los pacientes acuden en etapa terminal de la enfermedad renal, lo cual impide establecer con certeza la causa de la uremia, sin embargo, una etiología estructural se observa en 24% de los pacientes, que incluye malformaciones congénitas, uropatía obstructiva y reflujo vesicouretral; seguida por glomerulonefritis en 19.8% de los casos ^[71]. En el HIMFG se realizó el primer trasplante pediátrico en Latinoamérica en 1967 y hasta el 2011 se habían realizado 586 trasplantes renales ^[71]. En un periodo de seis años este centro logró reducir la mortalidad en el trasplante renal de un 16% a un 4.3%, porcentaje muy similar al 4.8% que presenta el NAPRTCS (North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study) que incluye los mejores centros nefrológicos de Estados Unidos y Canadá; esta mejoría se atribuye a un mejor manejo de los inmunosupresores y vigilancia más estrecha al paciente en el periodo post-trasplante ^[71].

1.3.2. Trasplante hepático pediátrico.

El trasplante hepático es en la actualidad una terapia habitual para tratar pacientes con enfermedades irreversibles del hígado, agudas o crónicas, para las cuales no existen tratamientos curativos ^[11]. En los niños las causas más frecuentes son las enfermedades colestásicas, siendo la Atresia de Vías Biliares la patología que condiciona cerca de 60% del total de los casos, seguidas de las hepatitis fulminantes (15%) y los problemas metabólicos (10%) ^[11, 13, 72]. El HIMFG inició su programa de trasplante hepático en 1998 y para el 2011 ya había realizado 76 trasplantes hepáticos. En este centro las causas más frecuentes del trasplante fueron la AVB (43%), enfermedades metabólicas (13%) y hepatitis fulminante (12%) ^[13]. La sobrevivencia de los pacientes trasplantados es comparable a la de centros en Europa y Estados Unidos ^[13, 68, 73].

1.4. Inmunosupresión.

El éxito en los trasplantes depende en gran medida de las terapias inmunosupresoras, cuyo objetivo principal es evitar el rechazo del injerto. La inmunosupresión se define como la inhibición de componentes del sistema inmune. Puede ocurrir debido a una enfermedad o por el uso de inmunosupresores. Los cuales son sustancias químicas que mediante diversos mecanismos evitan desencadenar una respuesta inmune ^[74].

Los inmunosupresores se clasifican en inespecíficos y específicos. Los inespecíficos ejercen sus efectos inmunosupresores al deprimir ampliamente la función inmune en múltiples sitios del sistema inmune. En este grupo se incluyen agentes citotóxicos, glucocorticoides, agentes contra inmunofilinas, entre otros. Los específicos ejercen efecto sobre células específicas del sistema inmune, citocinas o receptores. En este grupo se incluyen los anticuerpos monoclonales y policlonales, entre otros ^[75].

Actualmente en el trasplante de órganos se utilizan terapias inmunosupresoras que combinan distintos agentes, lo que permite un efecto sinérgico más efectivo. En el HIMFG se combina el tacrolimus, el micofenolato y la prednisona, como agentes de la terapia inmunosupresora en pacientes de TOS.

Clasificado como inmunosupresor inespecífico que actúan sobre las inmunofilinas, el tacrolimus es un inhibidor de la calcineurina, la fosfatasa responsable de la activación de la transcripción de la interleucina-2 (IL-2), citocina que estimula el crecimiento y diferenciación de los linfocitos T. El micofenolato se clasifica dentro de los inmunosupresores inespecíficos citotóxicos, capaz de inhibir la síntesis de novo de las purinas, por lo que inhibe la proliferación de linfocitos y la producción de anticuerpos. La prednisona también inmunosupresor inespecífico, es un glucocorticoide que disminuye la producción de citocinas inflamatorias, causan un incremento en los neutrófilos y un decremento de los linfocitos [75, 76].

1.5. Complicaciones post-trasplante.

Al mismo tiempo que las terapias inmunosupresoras posibilitan la supervivencia del injerto facilitan la aparición de infecciones, como las ocasionadas por los herpesvirus de las subfamilias beta y gamma, dichas infecciones pueden tener una doble consecuencia: los efectos de la propia enfermedad infecciosa, como los previamente descritos para cada herpesvirus, y el efecto inmunomodulador que contribuye al rechazo del injerto y a una mayor predisposición a sufrir otras infecciones o neoplasias (linfomas o sarcomas) [12, 77] como las asociadas a la ELPT, que como ya se mencionó es una de las complicación más severas a la cual se puede enfrentar un paciente trasplantado. La mínima evidencia de linfoproliferación es una indicación para disminuir la inmunosupresión, pero esto aumenta el riesgo de rechazo al injerto. Encontrar el equilibrio adecuado en este sistema resulta sumamente complejo. Las complicaciones post-trasplante más severas son por un lado el rechazo al injerto y por otro la ELPT, ambas asociadas a los herpesvirus de las subfamilias beta y gamma.

1.5.1. Rechazo del injerto.

El sistema Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA) codifica una serie de proteínas altamente polimórficas, cuya función fisiológica es la presentación de antígenos al sistema inmunológico. El trasplante de un órgano implica que el sistema inmunitario del receptor se enfrentará a células vivas con moléculas HLA distintas de las propias (alógenas) y por tanto

susceptibles de ser reconocidas como extrañas. Estas moléculas HLA alogénicas son altamente inmunogénicas y estimulan a los linfocitos T de forma directa o indirecta, desencadenando una respuesta que se conoce como rechazo del injerto ^[24, 78]. En un inicio, la compatibilidad sanguínea ABO era una de las principales causas de rechazo ^[24, 25]. Dependiendo de la velocidad con la que se produzca, se distinguen 4 tipos de rechazo:

1.5.1.1. Rechazo hiperagudo.

Se produce rápidamente después del trasplante, ocurre en las primeras 72 horas e incluso minutos después de la revascularización del injerto (tejido u órgano sólido); está mediado por anticuerpos citotóxicos circulantes preformados en el receptor, los cuales se unen al endotelio del órgano, activando la cascada de coagulación y el sistema de complemento ^[79], lo que resulta en la muerte del injerto en las horas o minutos que siguen a la revascularización.

1.5.1.2. Rechazo acelerado.

Es una complicación rara que se manifiesta durante el tercer y séptimo día post-trasplante, es considerado una variación del rechazo hiperagudo ^[25] que se instaura más lentamente y se produce en la mayoría de los casos por la presencia de anticuerpos preexistentes en el suero del receptor a las moléculas HLA del donante ^[78]. Se considera un rechazo principalmente humoral ^[80], aunque también se ha sugerido la participación de los linfocitos T ^[25]. Histopatológicamente resulta en alteraciones severas de la función y la morfología del trasplante ^[80]. Actualmente el rechazo hiperagudo y acelerado son cada vez menos frecuentes debido a la evaluación pre-trasplante en la cual se verifica la compatibilidad ABO y a la tipificación tisular de la compatibilidad HLA mediante pruebas cruzadas para anticuerpos tisulares (leucocitos donantes + suero receptor).

1.5.1.3. Rechazo agudo.

Aparece generalmente dentro del primer mes post-trasplante pero puede desarrollarse unos meses más tarde ^[11, 24, 25]. Su incidencia es variable según el tipo de trasplante, del 10 al 20% en trasplante renal y del 30 al 40% en hepático ^[24]. Su mecanismo principal es la reacción del hospedero contra el injerto conocida como HVGR (por sus siglas en inglés, Host Vs. Graft Reaction) ^[11] y es mediada fundamentalmente por linfocitos T aloreactivos que reconocen

antígenos del injerto ^[81] ^[82]. Se asocia con alteraciones funcionales del órgano, como por ejemplo aumento de las cifras de creatinina plasmática en el trasplante renal y elevación de las enzimas hepáticas en el trasplante hepático ^[24]. Las lesiones histológicas son muy parecidas en los distintos tipos de trasplantes, destacando un infiltrado intersticial por granulocitos, macrófagos, monocitos y linfocitos, predominantemente T, que provoca una lesión del parénquima correspondiente, edema y hemorragia ^[11, 24]. Es el principal factor predictor de la aparición de rechazo crónico ^[25] y se puede tratar intensificando la dosis del fármaco inmunosupresor ^[11].

1.5.1.4. Rechazo crónico.

Se produce meses o años después del trasplante ^[11, 78]. La prevalencia a los 5 años oscila alrededor del 20-70% en diferentes centros de trasplante. La amplitud de este intervalo también depende del órgano en cuestión, en el riñón es del 15-35% y en hígado del 15-50% ^[24]. Su etiología no se conoce con exactitud pero se propone que puede deberse a una reacción de baja intensidad mediada por células, o al depósito de anticuerpos o inmuno-complejos en el tejido injertado ^[78]. El receptor mantiene permanentemente un proceso inmunológico que activa el sistema de reconocimiento de aloantígenos ^[25], ocasionando que las paredes de los vasos sanguíneos del injerto se engrosen por extrema proliferación endotelial y terminen obstruyéndose ^[11, 78, 81]. Dado que aún no se dispone de una terapia eficaz para el tratamiento del rechazo crónico, la prevención y control de factores potencialmente de riesgo en el desarrollo de rechazo crónico como la infección por el CMV, la nefrotoxicidad crónica por inmunosupresores; factores inmunológicos como el grado de incompatibilidad HLA, el grado de inmunosupresión y los episodios previos de rechazo agudo, podría jugar un papel fundamental para disminuir el fracaso del órgano injertado ^[82].

1.5.2. Enfermedad linfoproliferativa post-trasplante (ELPT).

ELPT es un término utilizado para describir a un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la proliferación descontrolada principalmente de linfocitos B, pero ocasionalmente también de linfocitos T y muy rara vez de células NK ^[83-85]. La ELPT va desde un proceso policlonal benigno, como la hiperplasia linfoide, hasta un linfoma monoclonal maligno altamente invasivo y resistente a cualquier tratamiento, como un

linfoma difuso rápidamente progresivo y frecuentemente fatal ^[13, 25, 86]. La ELPT es la forma más común de malignidad post-trasplante en niños, y varía de acuerdo al órgano trasplantado. Se reporta entre el 1.2-10.1% en trasplantes de riñón y entre el 4-15% en trasplantes de hígado en los diferentes centros de trasplante. La mortalidad debida a la ELPT es elevada pudiendo ser hasta del 60% ^[86]. Se asocia al VEB, por lo que la seronegatividad del receptor antes del trasplante, la intensidad de la inmunosupresión, el tipo de inmunosupresor utilizado, la utilización de anticuerpos monoclonales (OKT3) para el tratamiento del rechazo, y el desarrollo de enfermedad por CMV son factores de riesgo para el desarrollo de una ELPT ^[11-13].

1.6. Pruebas de detección simultánea de secuencias virales.

En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en tiempo real es la técnica más sensible para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos (ADN y ARN). El uso de la PCR en el diagnóstico clínico, está limitado por el costo y algunas veces por la disponibilidad de un volumen adecuado de muestra para la prueba. Buscando superar estas limitantes y aumentar la capacidad de diagnóstico de la PCR, se ha descrito una variante denominada PCR multiplex ^[87]. Esta versión multiplex permite la amplificación simultánea de diferentes secuencias diana. La PCR multiplex en tiempo correlaciona los productos de la PCR de cada uno de los ciclos, con señales de intensidad de fluorescencia, lo que permiten resultados cuantitativos. Las diferentes secuencias diana se distinguen por la hibridación a oligonucleótidos marcados con distintos fluoróforo ^[88]. Amplificar distintas secuencias simultáneamente implica combinar distintas temperaturas de alineamiento, manteniendo al mismo tiempo alta sensibilidad analítica, especificidad, eficiencia, precisión y un amplio rango dinámico de detección. Por lo que, el diseño de una técnica de PCR multiplex en tiempo real resulta muy complejo. Sin embargo, las ventajas que proporciona esta técnica son cuantiosas: Reduce el tiempo de análisis de manera considerable, ya que en una sola corrida se puede detectar y cuantificar simultáneamente diferentes secuencias diana. Disminuye la cantidad de muestra y de reactivos necesarios para el análisis, lo cual reduce los costos tanto económicos como biológicos, además de ahorro en tiempo y esfuerzo ^[89]. Por lo anterior la PCR multiplex en tiempo real es la técnica ideal para la detección y cuantificación simultánea de los hepesvirus de interés.

La especificidad analítica es la detección apropiada de la secuencia diana, discriminando otros objetivos no específicos también presentes en una muestra. Aunque las herramientas *in silico* como BLAST ^[99] son útiles para el diseño del ensayo, es necesaria la validación experimental (gel de electroforesis, perfil de fusión, secuenciación de ADN, tamaño de amplicón y/o digestión con enzimas de restricción, ensayos de reactividad cruzada). La sensibilidad analítica se refiere a la cantidad mínima de copias en una muestra que se puede medir exactamente con un ensayo, se determina a través del límite de detección. La eficiencia de amplificación (E) hace alusión a la capacidad del ensayo para duplicar el fragmento diana con cada ciclo de amplificación y se determina a partir de la pendiente en la fase logarítmica lineal de una curva patrón, $E=10^{-1/\text{pendiente}}-1$ y del coeficiente de determinación, el cual indica la confiabilidad predictiva del ensayo. La precisión, es otro de los parámetros importantes en la PCR múltiplex, expresa que tan repetible (intra) y reproducible (inter) es el ensayo, a través de medidas de dispersión como el coeficiente de variación (CV). Por su parte el rango dinámico de detección, sobre el cual una reacción es lineal se refiere al rango del mayor al menor número de copias cuantificable establecido por medio de una curva patrón. Dependiendo de la plantilla utilizada para generar curvas de calibración, el rango dinámico debe cubrir al menos tres órdenes de magnitud e idealmente debería extenderse a cinco o seis concentraciones log10. Además de estos parámetros, es importante demostrar que la eficacia y la sensibilidad del ensayo multiplex son los mismos que cuando los ensayos se realizan en uniplex ^[90, 91].

2. ANTECEDENTES

Desde su introducción, la PCR múltiplex ha sido aplicada exitosamente en varias áreas de diagnóstico de ácidos nucleicos, como análisis cuantitativos, de mutación y polimorfismos. En el campo de las enfermedades infecciosas, la técnica ha demostrado ser un método valioso para la identificación de virus, bacterias, hongos y parásitos. Varios estudios han demostrado la practicidad de identificar patógenos virales en muchos entornos clínicos y epidemiológicos mediante la PCR multiplex ^[87].

En 1993 Tenorio y colaboradores aplicaron la técnica de PCR multiplex en la detección de herpesvirus humanos, mediante amplificación anidada de fragmentos del gen de la ADN polimerasa viral. Este análisis incluyó la amplificación de VEB, CMV y HHV-6, además de

los herpesvirus de la subfamilia alfa, en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con meningitis, encefalitis y otros síndromes clínicos. Los resultados mostraron alta especificidad para la detección y tipificación de herpesvirus humanos, con secuencias conocidas y sin amplificación del ADN humano ^[92]. A esta PCR multiplex se le incluyó un paso de transcripción inversa y oligonucleótidos para detectar el ADN complementario de enterovirus ^[93, 94]. Seis años después el mismo grupo de investigadores desarrolló una PCR multiplex, para la detección simultánea de los herpesvirus beta y gamma VEB, CMV, HHV-6, HHV-7 y VSK, también mediante la amplificación anidada de fragmentos del gen de la ADN polimerasa viral. Los resultados mostraron que las cantidades mínimas de ADN de herpesvirus detectadas se encontraron en un rango de entre 10 a 100 moléculas, dependiendo del virus probado. La especificidad del método se demostró al analizar ADN extraído de células infectadas con herpesvirus de la subfamilia alfa y no observar amplificación de ninguno de estos virus ^[95].

Otro grupo de investigadores desarrolló una técnica de PCR capaz de detectar de manera simultánea a todos los herpesvirus humanos excepto al VSK. Mediante el uso de oligonucleótidos que permiten distinguir a los diferentes herpesvirus por un tamaño del producto de PCR específico. Esta técnica mostró una sensibilidad de 20 copias virales en 100ng de ADN y se demostró su especificidad mediante la secuenciación directa de los fragmentos amplificados además de una prueba de exclusión utilizando ADN viral de ocho virus distintos a los de interés ^[96].

Las técnicas de PCR multiplex hasta ahora descritas son cualitativas, solo permiten saber si el virus está o no presente en la muestra ensayada. Existen algunas pruebas cuantitativas de PCR en tiempo real que amplifican de manera simultánea a los herpesvirus. Wada y colaboradores desarrollaron una PCR multiplex en tiempo real que detecta y cuantifica a los herpesvirus: VEB, CMV y HHV-6 de manera simultánea. Para confirmar la especificidad, se probó ADN viral de cepas estándar, ninguno de los oligonucleótidos/sondas reaccionó con ADN viral inespecífico, lo que indicó que no se produjo reactividad cruzada. Se obtuvo una sensibilidad analítica de 2 copias por reacción con un 95% de confianza. Un rango dinámico de 200 a 5×10^8 copias/ml de sangre total y plasma colectadas de pacientes trasplantados. Se

compararon las cargas virales de los tres herpesvirus evaluadas en el ensayo triplex contra ensayos individuales, encontrando que su reacción multiplex fue tan sensible y específica como las reacciones individuales ^[97].

Este mismo grupo de investigadores desarrolló una PCR multiplex para los herpesvirus HSV1, HHV-6 y HHV-7 que se probó en una cohorte de pacientes con sospecha de encefalitis. Se demostró la especificidad de la técnica mediante el uso de ADN viral de cepas estándar. Los HHV-6 y -7 no mostraron reactividad cruzada con otros virus. El HSV1 mostró reactividad cruzada con HSV2. La sensibilidad analítica fue de 3-4 copias por reacción con un 95% de confianza, con eficiencias entre 94% y 100%. Una confiabilidad predictiva de 99%. Precisión del 95% y un rango dinámico de seis ordenes de magnitud ^[98]. Estos ejemplos demuestran la utilidad de la PCR multiplex en tiempo real en el monitoreo de herpesvirus.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los miembros de las subfamilias de herpesvirus beta y gamma son habituales residentes humanos, que bajo determinadas circunstancias, como la inmunosupresión, se asocian a una gran variedad de enfermedades y manifestaciones clínicas. Son capaces de producir inmunosupresión transitoria, favoreciendo la coinfección de otros patógenos, incluyendo la exacerbación de la infección latente o la primo-infección de otro herpesvirus, permitiendo así eventos que incrementarían sus efectos patogénicos. Lo anterior denota la importancia clínico-biológica de estudiarlos cuantitativa y conjuntamente. A pesar de ello, los trabajos que incluyen análisis cuantitativos simultáneos entre estos herpesvirus, son restringidos, esto debido en parte a que no existe una técnica cuantitativa que permita la detección simultánea de los cinco herpesvirus.

4. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de una técnica de detección y cuantificación simultánea de los herpesvirus de las subfamilias beta y gamma permitirá identificar sus cargas virales de manera conjunta, lo cual resultará muy útil en la vigilancia de una gran variedad de pacientes con enfermedades y manifestaciones clínicas asociadas a estos herpesvirus. Los pacientes trasplantados de órgano sólido son sometidos a una terapia de inmunosupresión farmacológica con el objetivo

de evitar el rechazo del órgano trasplantado. Por lo anterior, estos pacientes resultan particularmente vulnerables a los herpesvirus beta y gamma y representan un modelo biológico ideal para el estudio de las interacciones entre dichos agentes. El monitoreo cuantitativo en pacientes con trasplante de órgano sólido servirá como guía para mantener un adecuado protocolo de inmunosupresión y de tratamiento antiviral. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez, que es uno de los centros de trasplante más importantes en nuestro país, se monitorean dos de estos cinco herpesvirus, el VEB y el CMV. Estudiar una cohorte de pacientes pediátricos post-trasplantados de este importante centro de trasplantes, nos permitirá ensayar la técnica y analizar la cinética de las cargas virales de los cinco herpesvirus en estos pacientes.

5. HIPÓTESIS

El desarrollo de una técnica de PCR multiplex que detecte y cuantifique de manera simultánea a los herpesvirus de las subfamilias beta y gamma permitirá su estudio conjunto, eficientizando su análisis y monitoreo. Lo cual será de gran utilidad en el seguimiento de pacientes con alto riesgo de morbilidad y mortalidad asociadas a los herpesvirus de interés, como aquellos sometidos a trasplante de órgano sólido inmunocomprometidos farmacológicamente.

6. OBJETIVOS

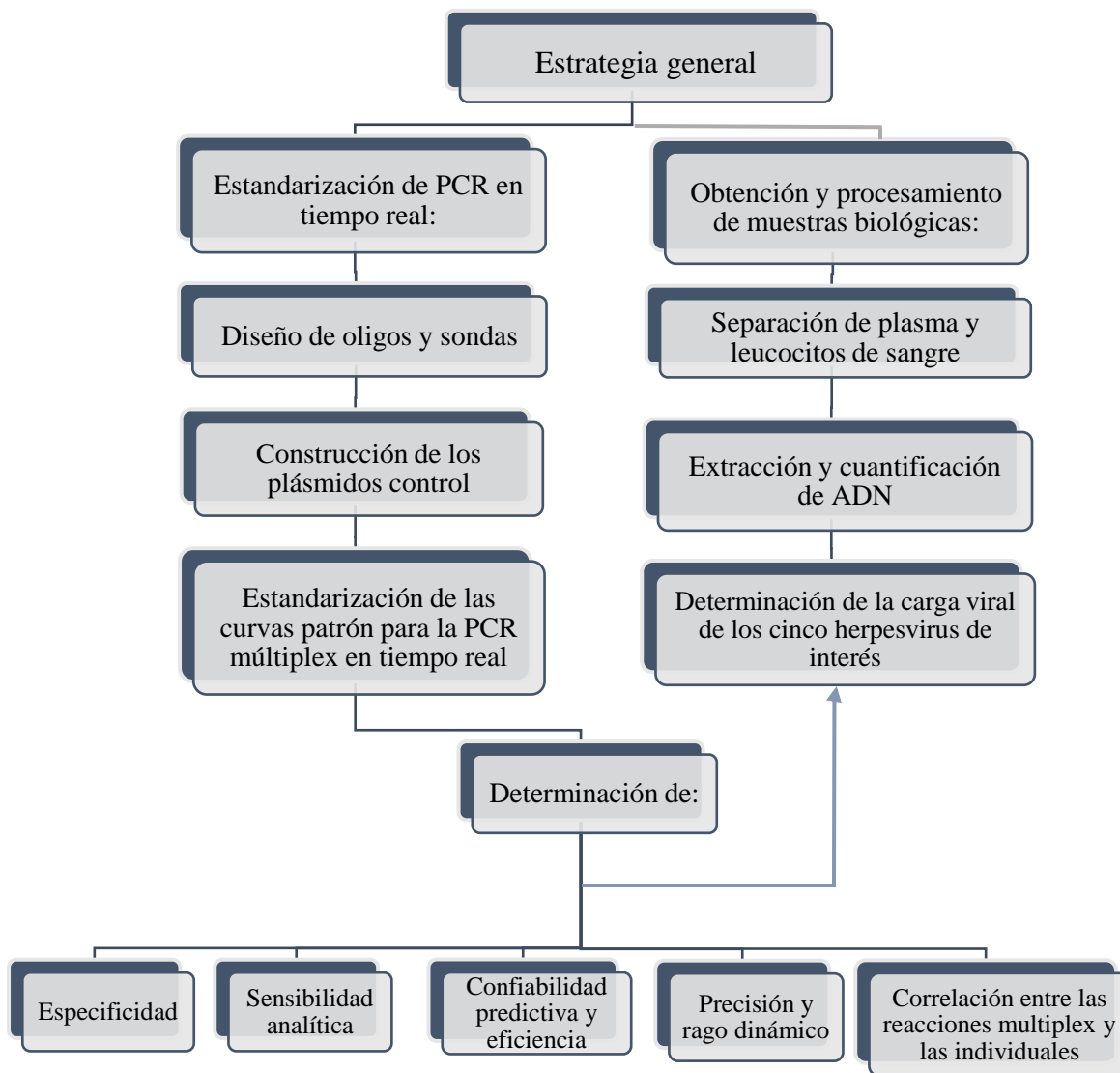
6.1. Objetivo general.

Desarrollar una técnica de laboratorio que permita detectar de manera cuantitativa y simultánea a los herpesvirus humanos de las subfamilias beta y gamma que funcione como una herramienta en el monitoreo clínico de pacientes en riesgo de presentar morbilidad y mortalidad asociadas a los herpesvirus de interés.

6.2. Objetivos particulares.

- I. Diseñar una PCR multiplex en tiempo real que permita detectar y cuantificar de manera conjunta a los herpesvirus humanos de las subfamilias beta y gamma (VEB, CMV, HHV-6, HHV-7 y VSK).
- II. Ensayar la prueba y determinar los niveles de infección individual y conjunta de los herpesvirus de las subfamilias beta y gamma en leucocitos y plasma de pacientes pediátricos inmunodeprimidos farmacológicamente debido a trasplante de órgano sólido.
- III. Realizar un análisis de asociación entre los niveles de infección de los herpesvirus de las subfamilias beta y gamma y los episodios de rechazo así como los niveles de inmunosupresor suministrados a los pacientes pediátricos post-trasplantados.

7. METODOLOGÍA



7.1. Pacientes y diseño del estudio.

Este proyecto es un estudio de tipo prospectivo y longitudinal. La recolección y el uso de las muestras fueron aprobados por los Comités Científico, de Ética y de Bioseguridad del HIMFG (Registro HIM-2016-021). Las cartas de asentimiento y consentimiento informado fueron firmadas por los pacientes (mayores de 10 años) y sus padres/tutores respectivamente (Anexo 12.1 y 12.2).

7.1.1. Población del estudio.

En este estudio fueron incluidos 28 pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido (21 de trasplante renal y 7 de trasplante hepático) realizados en el HIMFG entre febrero y noviembre de 2016. El seguimiento fue de entre 8 y 12 meses por paciente, con una periodicidad en el seguimiento de 15 días (+/- 10 días) en los primeros tres meses y cada 30 días (+/- 10 días) en los siguientes 9 meses.

7.2. Estandarización de la PCR multiplex en tiempo real.

7.2.1. Elección y diseño de oligonucleótidos y sondas.

De los seis pares de oligonucleótidos y las seis sondas que conforman la reacción de PCR multiplex en tiempo real, tres pares de oligonucleótidos y dos sondas fueron diseñados en el laboratorio, los demás fueron tomados de la literatura como se indica en la Tabla 1.

7.2.1.1. Diseño de oligonucleótidos y sondas de beta actina (ACTB).

El gen constitutivo utilizado fue beta-actina, ID: 60 en la base de datos “Nucleotide Collection (nr/nt)” en su versión optimizada para secuencias de alta similitud (megablast)^[99] del servidor del NCBI, se empleó la secuencia de referencia (*RefSeq*) y se eligió el intrón ACTB-010 intron 1:KNOWN_protein_coding como diana. Se realizó un megablast en el servidor del NCBI para asegurar que la secuencia elegida fuera específica del gen beta actina humano. Para el diseño de los oligonucleótidos y la sonda, se utilizó el programa “Primer blast” del servidor del NCBI^[99]. Dado que el amplicón viral de mayor tamaño fue de 223 pb, se diseñó la amplificación de beta-actina de manera que el fragmento resultante asegurara que al menos se amplificara ese tamaño en una muestra biológica. El tamaño del producto se seleccionó entre 225 y 235 pb, se eligió una temperatura de fusión (T_m) de entre 57 y 60°C que coincide con la T_m de los oligonucleótidos del VEB y el CMV, con lo cuales, se

combinara el fragmento de beta actina en una reacción simultánea. Para el oligonucleótido interno (secuencia de la sonda) se eligió una T_m de 60-63°C. Las demás condiciones como los parámetros de comprobación de la especificidad, se mantuvieron en sus valores por defecto. El programa arrojó 10 opciones de pares de oligonucleótidos. Se analizaron varias opciones con el programa “Oligo analyzer” que evalúa la formación de autodímeros, heterodímeros y horquillas y de acuerdo a los resultados obtenidos se eligió el par de oligonucleótidos a utilizar, los cuales generan un producto de amplificación de 225 pb (Tabla 1).

7.2.1.2. Diseño de oligonucleótidos y sondas del HHV-6 (U31) y el VSK (Lana).

Los oligonucleótidos del HHV-6 se rediseñaron a partir de un fragmento amplificado por un par de oligonucleótidos ya reportados y específicos para el gen viral U31 ^[100], que se pretendieron utilizar en la multiplex, sin embargo, fue necesario rediseñarlos con el objetivo de reducir el tamaño del fragmento amplificado y mejorar las eficiencias de amplificación de la reacción de PCR multiplex en tiempo real. Por lo cual, el fragmento de 223 pb ya reportado fue utilizado como template en el diseño de oligonucleótidos mediante el programa “primer blast” del servidor del NCBI ^[99], utilizando parámetros iguales a los establecidos para los demás pares de oligonucleótidos de la reacción: tamaño de producto entre 100 y 200 pb y T_m de entre 57 y 60°C. Las demás condiciones, como los parámetros de comprobación de la especificidad, se mantuvieron en sus valores por defecto. El programa arrojó 10 opciones de pares de oligonucleótidos y de acuerdo a los resultados del análisis del programa “Oligo analyzer” se eligió un par de estos oligonucleótidos. La sonda utilizada fue la misma secuencia reportada previamente ^[100] pero con el fluoróforo modificado, se sustituyó Cy5 por Fam. Para los oligonucleótidos y la sonda del VSK se realizó un procedimiento muy similar al descrito para el gen de beta actina.

7.3. Construcción de los plásmidos control para las curvas patrón de la PCR multiplex.

7.3.1. Cultivo y/o infección de líneas celulares.

Para el VEB se utilizó la línea celular comercial Raji (ATCC CCL-86, VEB+). Para el CMV se utilizó un sobrenadante proveniente de un cultivo primario de fibroblastos de prepucio

humano infectados (amablemente donados por el Dr. Arellano Galindo, HIMFG). Para el HHV-6 se utilizó la línea celular permisiva a la infección MOLT3 (ATCC-CRL-1552) la cual fue infectada en el laboratorio con partículas virales comerciales del virus (ATCC-VR1467), el sobrenadante de la infección se utilizó para obtener el genoma del HHV-6. Para el HHV-7 se utilizó ADN de la cepa B5 donado por la Dra. Tzindilú Molina-Muñoz (Centro Médico Nacional SXXI, IMSS). Para el VSK se utilizó el sobrenadante del cultivo de la línea celular BCP-1 (ATCC-CRL-2294) positiva al VSK. Las líneas celulares MOLT3, Raji y BCP-1 fueron cultivadas en medio RPMI al 10% (MOLT3 y Raji) y 20% (BCP-1) de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico/antimicótico (todos de Gibco) 1x.

7.3.2. Obtención de los fragmentos de ADN viral.

El ADN de las líneas celulares y de los sobrenadantes previamente mencionados se purificó con el estuche comercial QIAamp ADN Mini Kit (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración y calidad del ADN recuperado del sobrenadante o de la línea celular infectada se estimaron a partir de la absorbancia a 280 nm y relación de absorbancia 260/280 nm respectivamente en un equipo nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) y en geles de agarosa al 1.5%.

El ADN recuperado de los sobrenadantes o de las líneas celulares según correspondiera para cada virus, se utilizó en la amplificación mediante PCR punto final de fragmentos génicos virales utilizando los oligonucleótidos que también se utilizarían en la PCR multiplex previamente descritos. Esto con el objetivo de obtener productos de amplificación que pudieran ser clonados en plásmidos comerciales.

7.3.3. Clonación de fragmentos génicos virales.

Los cinco fragmentos virales, que servirían de controles positivos en la estandarización de la PCR multiplex de diagnóstico viral fueron clonados en vectores comerciales. Para lo cual se purificaron los productos de PCR a partir de los geles de agarosa, utilizando el Kit QIAquick gel extraction de Qiagen, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Con el objetivo de obtener cinco plásmidos que contuvieran los fragmentos virales de interés, de manera independiente se ligó cada fragmento viral al vector comercial pGEM T-easy (Promega), el

cual en sus extremos 3' terminales posee Timidinas, que eficientizan la unión con nuestros productos de PCR cuyos extremos terminales poseen una cola de adeninas adicionadas por la DNA polimerasa usada en la reacción de PCR. La ligación ocurrió en el sitio *EcoRI* de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Se generaron bacterias competentes (*E. coli* DH5 α), mediante choque térmico e incubación en medio rico en cationes divalentes. Las bacterias *E. coli* DH5 α fueron descongeladas y luego de confirmar su sensibilidad a la ampicilina fueron cultivadas en medio LB (Luria-Bertani) e incubadas 14 horas en agitación (250 rpm) a 37°C. Una alícuota fue tomada y transferida a medio SOC para crecer las bacterias durante 1.5 horas en agitación (250 rpm) a 37°C. Luego se les aplicaron dos choques térmicos, el primero al colocarlas en hielo por 10 min, inmediatamente después fueron centrifugadas y resuspendidas en buffer TF-1 (rico en cationes divalentes). El segundo choque fue por 15 min en hielo. Finalmente fueron centrifugadas y resuspendidas en buffer TF-2. Una vez competentes, las bacterias fueron transformadas con los plásmidos virales, de acuerdo a las especificaciones del fabricante del vector pGEM T-easy (Promega), en experimentos independientes, uno por cada plásmido. Las clonas exitosamente transformadas fueron doblemente seleccionadas, por un lado mediante crecimiento en ampicilina, que selecciona únicamente aquellas clonas que presentan el vector y por otro lado mediante la coloración obtenida de los sistemas de clonación que usan el principio de α - complementación, que distinguen las clonas con el plásmido viral gracias a su coloración blanca, de aquellas que sólo presentan el vector vacío en color azul.

7.3.4. Digestión y secuenciación de los plásmidos virales.

En cada uno de los experimentos de transformación (uno por cada plásmido viral) se aislaron y sembraron 10 clonas exitosamente transformadas (blancas) en medio LB y LBA. De dichas clonas exitosamente transformadas se purificó el ADN plasmídico con el kit “pure link quick plasmid Miniprep” (Invitrogen). El plásmido extraído fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* (libera el inserto clonado) y *NdeI* (lineariza el plásmido). La reacción se visualizó mediante un gel de agarosa y de acuerdo a la calidad de la banda del inserto esperado se eligió una clona por plásmido viral. Los plásmidos se secuenciaron mediante el

método Sanger en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las secuencias arrojadas fueron analizadas en el programa “Standard Nucleotide Blast” usando la base de datos “Nucleotide Collection (nr/nt)” en su versión optimizada para secuencias de alta similitud (megablast) [99].

7.4. Estandarización de las curvas patrón para PCR multiplex en tiempo real.

Además de los cinco fragmentos virales de interés se incluyó el gen celular de beta-actina como control de amplificación.

7.4.1. Condiciones de amplificación para la PCR multiplex.

Las condiciones de amplificación se eligieron de acuerdo al diseño y a las características de los oligonucleótidos y las sondas, basándose en condiciones ya reportadas para una PCR multiplex diseñada para el VEB y el CMV [97]. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo *pre-hold* a 52°C (2.5 min), 1 ciclo *hold* a 95°C (15 min), 50 ciclos a 95°C (15 seg) y 60°C (1 min). Para la estandarización de las curvas patrón se realizaron diluciones seriales, cada plásmido con seis puntos (número de copias: 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ y 10⁶)

7.4.2. Especificidad de los oligonucleótidos.

Con el objetivo de probar la especificidad de los oligonucleótidos elegidos y diseñados para la técnica de PCR multiplex, se realizaron análisis de reactividad cruzada, en un contexto de ADN genómico humano de fondo y utilizando los genomas virales completos de los herpesvirus de interés. Para los herpesvirus gamma se utilizaron 100ng de ADN de una línea celular positiva a estos virus (VEB: Namalwa, ATCC-CRL-1432 y VSK: BCP-1, ATCC-CRL-2294). Para los herpesvirus beta se utilizaron sobrenadantes. Cada genoma viral completo fue puesto a prueba en ambas reacciones multiplex (VEB, CMV y ACTB/ HHV-6, HHV-7 y VSK).

Mediante PCR cuantitativa tiempo real, se realizaron tres curvas patrón con los seis puntos previamente descritos (10¹ a 10⁶ copias) de los plásmidos que contenían los fragmentos virales de interés, cada punto por triplicado. A cada tubo de reacción le fue adicionado además del ADN plasmídico, 100 ng de ADN de una línea celular humana negativa a todos

los virus en estudio (MOLT3, ATCC-CRL-1552). Las reacciones se llevaron a cabo bajo las condiciones de amplificación descritas en el apartado anterior, utilizando el reactivo SYBR Green (Thermo Fisher). El análisis de especificidad se visualizó mediante una curva MELT, que muestra la cinética de disociación de los fragmentos amplificados, basada en la T_m específica de cada fragmento, de acuerdo a su longitud y secuencia.

7.4.3. Sensibilidad analítica.

La sensibilidad analítica es expresada por el límite de detección, el cual se determinó a partir del número de copias mínimo (10 en nuestra curva patrón) que se pueden amplificar con una confiabilidad del 95%, para lo cual se calculó la media de 51 mediciones obtenidas de 17 curvas patrón por triplicado, y se le sumó 1.96 veces su desviación estándar: $LD = \bar{X} + 1.96\sigma$ (el valor 1.96 fue obtenido de las Tablas de distribución normal).

7.4.4. Confiabilidad predictiva y eficiencia de la curva patrón.

Con el objetivo de determinar la confiabilidad y eficiencia de la técnica, se evaluaron las curvas patrón, mediante el coeficiente de determinación (R^2) y la eficiencia (E) de cada reacción de PCR cuantitativa. Se realizaron tres reacciones de PCR cuantitativa por cada fragmento viral. Las curvas patrón se realizaron con los seis puntos control (cada uno por triplicado). La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones de amplificación previamente descritas, utilizando el Kit QuantiTect multiplex PCR (Qiagen).

7.4.5. Precisión y rango dinámico de las reacciones de PCR cuantitativas multiplex.

La precisión $\geq 95\%$ de estos ensayos multiplex fue determinada con el coeficiente de variación (CV), medida de dispersión que expresa la relación porcentual entre la desviación estándar y la media de un conjunto de datos $CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100$. El CV se determinó en ensayos intraespecíficos, para conocer la repetibilidad de la curva patrón e interespecíficos, para conocer la reproducibilidad. El rango dinámico se refiere al rango de concentraciones entre las que funciona correctamente la PCR. Fue establecido a partir de las curvas patrón.

7.4.6. Correlaciones entre las reacciones multiplex y las reacciones individuales.

Una vez obtenidas las curvas patrón en reacciones de PCR cuantitativas individuales, se inició la estandarización de las reacciones multiplex. Dado que amplificar seis fragmentos en una misma reacción no está recomendado ya que no existen equipos capaces de leer en seis canales de fluorescencia distintos, esto debido al sobre lape de lecturas, la técnica de PCR multiplex se dividió en dos reacciones de tres fragmentos cada una; la primera incluyó dos virus el VEB y el CMV y a un control interno de amplificación, el gen celular beta-actina (reacción VEB/CMV/ACTB) y la segunda incluyó tres virus, el HHV-6, -7 y -8 (reacción HHV-6/HHV-7/VSK). Las condiciones de la PCR multiplex se diseñaron de manera que ambas reacciones se pudieran realizar simultáneamente y que los seis blancos pudieran ser analizados en una misma corrida. Se realizaron más de treinta pruebas de amplificación multiplex, variando algunas concentraciones de los oligonucleótidos y sondas, hasta que se lograron las curvas patrón con los parámetros óptimos, las pruebas se llevaron a cabo bajo las condiciones de amplificación ya descritas. Mediante un análisis de correlación se obtuvieron y compararon las medias de los triplicados por cada punto control y para cada fragmento viral, entre las reacciones individuales y las reacciones multiplex.

7.5. Análisis de muestras de pacientes.

7.5.1. Colecta de muestras.

Se colectaron 415 muestras mediante punción venosa de sangre periférica, en un rango de 2-8 ml, con una mediana de 5 ml por muestra, pertenecientes a 28 pacientes pediátricos sometidos a trasplante de órgano sólido (renal o hepático) entre el 1° de febrero y el 30 de noviembre de 2016. Los datos clínico-demográficos se presentan en el apartado de resultados. Las muestras de sangre periférica fueron centrifugadas para separar el plasma y almacenarlo a -70°C; los eritrocitos fueron lisados utilizando el buffer EL (Qiagen), por centrifugación se obtuvieron los leucocitos, los cuales fueron lavados con PBS y almacenados a -70°C en RNA later (Qiagen).

7.5.2. Extracción de los ácidos nucleicos.

El ADN de 415 muestras de leucocitos se purificó, usando el estuche comercial “QIAamp DNA Mini Kit” (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN de 415 muestras de plasma se purificó de forma automatizada con el equipo QIASymphony SP,

usando el estuche comercial “QIA-symphony virus/bacteria mini kit” (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En total se obtuvieron 830 muestras de ADN provenientes de 28 pacientes. Después de cada purificación, el ADN se cuantificó usando un espectrofotómetro nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

7.5.3. Detección de la carga viral de los cinco herpesvirus de interés

La carga viral de los cinco herpesvirus de interés en las 830 muestras de ADN obtenidas (415 de leucocitos/415 de plasma), se determinó mediante dos reacciones de amplificación de PCR multiplex en tiempo real cuantitativa usando el estuche comercial “Quantitect multiplex PCR kit” (Qiagen) y sondas de hidrólisis tipo Taqman marcadas con diferentes fluoróforos: VEB-FAM, CMV-JOE, HHV-6-FAM, HHV-7-JOE y VSK-Cy5.

7.5.4. Análisis de asociación de las cargas virales con la dosis de inmunosupresión y con episodios de rechazo.

En un análisis preliminar se colectaron los datos clínicos sobre las dosis del inmunosupresor (Tacrolimus) administrada a seis pacientes, seleccionados por presentar uno o varios criterios considerados de relevancia en este trabajo: cargas virales altas, sostenidas o eventos de coinfección. Así mismo, se colectaron los datos sobre episodios de rechazo de 18 pacientes y se contrastaron con las cargas virales.

8. RESULTADOS

8.1. Elección y diseño de oligonucleótidos y sondas.

La técnica de PCR multiplex tiempo real amplifica seis fragmentos de ADN, cinco de ellos corresponden a genes virales de herpesvirus y uno a un gen celular que funciona como control de amplificación. La técnica está dividida en dos reacciones, una reacción amplifica dos fragmentos virales correspondientes a los herpesvirus VEB y CMV y el fragmento celular correspondiente al gen beta actina; la otra reacción amplifica tres fragmentos virales correspondientes a los herpesvirus HHV-6, HHV-7 y VSK. De estas reacciones, tres pares de oligonucleótidos y dos sondas fueron diseñados en nuestro laboratorio, el resto se obtuvo de la literatura (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos y sondas de la qPCR multiplex.

Fragmento amplificado	Gene	Secuencia 5'→3'	Tamaño del amplicón (pb)	Ref.
VEB	BALF5	F CCCTGTTTATCCGATGGAATG	90	[101]
		R CGGAAGCCCTCTGGACTTC		
CMV	IE	Sonda FAM-TGTACACGCACGAGAAATGCGCC-BHQ1a	201	[102]
		F GCTACAATAGCCTCTTCTCATCTG		
		R GACTAGTGTGATGCTGGCCAAG		
HHV-6	U31	Sonda JOE-AGCCTGAGGTTATCAGTGTAATGAAGCGCC-BHQ1a	121	[102] y en nuestro laboratorio
		F CGACTCTCACCTACTGAACGA		
		R GAGGCTGGCGTCGTAGTAGAA		
HHV-7	U57	Sonda FAM-AGCCACAGCAGCCATCTACATCTGTCAA-BHQ1a	108	[103]
		F CGGAAGTCACTGGAGTAATGACAA		
		R ATGCTTTAAACATCCTTTCTTTTCGG		
VSK	LANA	Sonda JOE-CTCGCAGATTGCTTGTGGCCATG-BHQ1a	166	En nuestro laboratorio
		F AGTTATGGGCGACTGGTCTG		
		R GGATGGAAGACGAGATCCAA		
ACTB	beta-actina	Sonda Cy5-AAGTCCGTATGGGTCATTGC-BHQ3a	225	En nuestro laboratorio
		F CCAGGCTAACCTCGGAAATCT		
		R CATCGTCATTCTGTGCAACT		
		Sonda Cy-5- TGGGGTGCCGGCTCTCTGCT- BHQ3a		

F: Forward (sentido), R: Reverse (antisentido).

8.1.1. Diseño de oligonucleótidos y sonda de beta actina.

Una vez elegida la secuencia del intrón ACTB-010 intron 1:KNOWN_protein_coding, del gen beta-actina, se realizó un megablast que confirmó la identidad de la secuencia elegida y descartó la hibridación a secuencias inespecíficas. Los oligonucleótidos se diseñaron con el programa “Primer blast” del servidor del NCBI y de acuerdo al análisis del programa “Oligo-Analyzer” se eligió el juego de oligonucleótidos apropiado (Tabla 2 y Figura 2).

Tabla 2. Par de oligonucleótidos y sonda elegidos para beta-actina.

Oligonucleótidos	Secuencia (5'→3')	Longitud (pb)	*Inicio	*Fin	Tm	GC%
Forward	CCAGGCTAACCTCGGAAATCT	21	2555	2575	59.51	52.38
Reverse	CATCGTCATTCTGTGCAACT	21	2779	2759	58.92	47.62
Sonda interna	TGGGGTGCCGGCTCTCTGCT	20	2691	2710	62.32	70.00

*N° de nucleótido del gen en donde inicia y termina la secuencia del oligonucleótido.

Forward (sentido), Reverse (antisentido).

Las deltas G máximas totales e individuales de cada oligonucleótido y sonda, de autodímeros y heterodímeros obtenidas del análisis mediante el programa “oligo analyzer” se muestra en las Tablas 3 y 4 respectivamente.

Tabla 3. Análisis de los auto-dímeros de los oligonucleótidos y sondas de la 1^{er} triplex.

Oligonucleótido	Delta G máxima kcal/mol
BALF VEB F	-5.12
BALF VEB R	-4.64
BALF VEB S	-9.89
IE CMV F	-13.19
IE CMV R	-5.7
IE CMV S	-9.89
beta actina F	-4.67
beta actina R	-7.05
beta actina S	-16.03

F: Forward (sentido), R: Reverse (antisentido), S: Sonda.

Tabla 4. Análisis de los hetero-dímeros de los oligonucleótidos y sondas de la 1^{er} triplex.

Oligonucleótido	Delta G máxima kcal/mol
BALF VEB F/R	-8.26
BALF VEB F/S	-3.61
BALF VEB R/S	-3.89
IE CMV F/R	-6.21
IE CMV F/S	-6.21
IE CMV R/S	-8.2
beta-actina F/R	-6.62
beta-actina F/S	-6.68
beta-actina R/S	-5.09
BALF VEB F/IE CMV-F	-6.21
BALF VEB F/IE CMV-R	-8.19

BALF VEB F/IE CMV-S	-6.24
BALF VEB R/IE CMV-F	-5.02
BALF VEB R/IE CMV-R	-6.59
BALF VEB R/IE CMV-S	-4.67
BALF VEB S/IE CMV-F	-6.21
BALF VEB S/IE CMV-R	-4.26
BALF VEB S/IE CMV-S	-9.89
beta-actina F/BALF VEB F	-7.81
beta-actina F/BALF VEB R	-9.83
beta-actina F/BALF VEB S	-6.78
beta-actina R/BALF VEB F	-6.59
beta-actina R/BALF VEB R	-10.02
beta-actina R/BALF VEB S	-6.53
beta-actina S/BALF VEB F	-7.81
beta-actina S/BALF VEB R	-6.68
beta-actina S/BALF VEB S	-6.44
beta-actina F/IE CMV F	-6.62
beta-actina F/IE CMV R	-10.37
beta-actina F/IE CMV S	-11.36
beta-actina R/IE CMV F	-5.09
beta-actina R/IE CMV R	-3.42
beta-actina R/IE CMV S	-6.95
beta-actina S/IE CMV F	-6.21
beta-actina S/IE CMV R	-7.81
beta-actina S/IE CMV S	-7.81

F: Forward (sentido), R: Reverse (antisentido), S: Sonda.

Las delta G máximas tanto totales como individuales de los heterodímeros y los autodímeros formados por los oligonucleótidos y la sonda de beta-actina son similares a las obtenidas por los oligonucleótidos y la sonda del VEB y el CMV, los cuales fueron exitosamente probados. Excepto por los marcados en **negritas**, sin embargo, estos valores están cercanos a los exitosamente probados. Además, la gran mayoría de los valores de delta G obtenidos son más positivos o están muy cercanos a -9, valor recomendado por el IDT (Integrated DNA Technologies). También se analizó la formación de horquillas de cada secuencia, la mayoría tienen deltas G mayores o muy cercanas a 0 lo que indicó que no las reacciones no ocurrirían

de forma espontánea y que necesitarían de energía para llevarse a cabo. Además las temperaturas que se necesitan para que se formen estas horquillas son muy bajas, condición que no ocurrirá en la reacción de PCR donde se manejan temperaturas altas.

8.1.2. Diseño de oligonucleótidos y sondas del HHV-6 (U31) y el VSK (Lana).

Los oligonucleótidos se diseñaron con el programa “Primer blast”^[99] y se eligió un par de acuerdo al análisis del programa “Oligo-Analyzer” (Tabla 5) que se localizaron en la secuencia del gen viral U31 (Figura 2). Las deltas G máximas totales e individuales de cada oligonucleótido y sonda, obtenidas del análisis se muestra en las Tablas 6 y 7.

Tabla 5. Par de oligonucleótidos elegidos para el HHV-6.

Oligonucleótido	Secuencia (5'->3')	Longitud (pb)	*Inicio	*Fin	Tm	GC%
Forward	CGACTCTCACCTACTGAACGA	22	69	90	61.19	54.55
Reverse	GAGGCTGGCGTCGTAGTAGAA	21	189	169	61.61	57.14
Longitud del producto		121				

*N° de nucleótido del gen en donde inicia y termina la secuencia del oligonucleótido.

Tabla 6. Análisis de los auto-dímeros de los oligonucleótidos y sondas de la 2ª triplex.

Oligonucleótido	Delta G máxima kcal/mol
U31 HHV-6 F	-3.61
U31 HHV-6 R	-3.61
U31 HHV-6 S	-4.89
U57 HHV-7 F	-4.87
U57 HHV-7 R	-8.74
U57 HHV-7 S	-13.19
LANA VSK F	-5.99
LANA VSK R	-3.61
LANA VSK S	-3.61

F: Forward (sentido), R: Reverse (antisentido), S: Sonda.

Tabla 7. Análisis de los hetero-dímeros de los oligonucleótidos y sondas de la 2ª triplex.

Oligonucleótido	Delta G máxima
	kcal/mol
U31 HHV-6 F/R	-3.61
U31 HHV-6 F/S	-3.55
U31 HHV-6 R/S	-9.76
U57 HHV-7 F/R	-4.64
U57 HHV-7 F/S	-5.24
U57 HHV-7 R/S	-5.24
LANA VSK F/R	-6.97
LANA VSK F/S	-8.09
LANA VSK R/S	-8.09
U31 HHV-6 F/U57 HHV-7 F	-4.52
U31 HHV-6 F/U57 HHV-7 R	-5.19
U31 HHV-6 F/ U57 HHV-7 S	-5.19
U31 HHV-6R/U57 HHV-7F	-3.61
U31 HHV-6R/U57 HHV-7R	-5.12
U31 HHV-6 R/ U57 HHV-7 S	-8.16
U31 HHV-6 S/U57 HHV-7 F	-6.82
U31 HHV-6 S/U57 HHV-7 R	-6.69
U31 HHV-6 S/ U57 HHV-7 S	-8.16
U31 HHV-6 F/LANA VSK F	-6.14
U31 HHV-6 F/LANA VSK R	-4.65
U31 HHV-6 F/LANA VSK S	-7.48
U31 HHV-6 R/ LANA VSK F	-6.53
U31 HHV-6 R/ LANA VSK R	-6.53
U31 HHV-6 R/ LANA VSK S	-3.61
U31 HHV-6 S/ LANA VSK F	-5.02
U31 HHV-6 S/ LANA VSK R	-1.95
U31 HHV-6 S/ LANA VSK 8 S	-6.5
U57 HHV-7 F/LANA VSK F	-6.62
U57 HHV-7 F/LANA VSK R	-8.19
U57 HHV-7 F/LANA VSK S	-8.29
U57 HHV-7 R/ LANA VSK F	-6.24

U57 HHV-7 R/ LANA VSK R	-3.89
U57 HHV-7 R/ LANA HHV-8 S	-6.68
U57 HHV-7 S/ LANA HHV-8 F	-5.02
U57 HHV-7 S/ LANA HHV-8 R	-6.97
U57 HHV-7 S/ LANA HHV-8 S	-6.5

F: Forward (sentido), R: Reverse (antisentido), S: Sonda.

Los delta G obtenidos en los autodímeros, los heterodímeros y las horquillas que también se analizaron, mostraron valores dentro de los rangos exitosamente probados.

- a >ACTB-010 intron 1:KNOWN_protein_coding
- CCAGGCTAACCTCGGAAATCTGAAATCTGCATTTAGGTAAGGGGTGGAGGTCACAGCAGAGGCG
 GAACCTGCAGGACAGGGCGTTACCATGACCGGTCTTCCAGCCAGGGAAAGCTGGATTCTCAG
 ACGCAGGATGGGGTGCCGGCTCTCTGCTTCGTCTGTGTACCCAGAGCCACCCCGATGTGGAGA
 CTCAGGGTGCCTAGTTGCACAGGAATGACGATG
- b >gi|9633069|ref|NC_000898.1| Human herpesvirus 6B, complete genome
 >gi|224020395|ref|NC_001664.2| Human herpesvirus 6A, complete genome
- TTTGAGTCATCAGATCGGCGTGCTATCGCGAGCACTTTTTTTTCTTAACAATACTCTCTACTTA
 TTGACTCTCACCCTACTGAACGAGAAGCCACAGCAGCCATCTACATCTGTCAAACATTGAAG
 AAGTTTATGAACTGCTCACCACCCACGGCACCGAAGGCTTCTACTACGACGCCAGCCTGATTTT
 TTCATAGAAACCTCCAATTTGTCGCTCT

Figura 2. Secuencias de los fragmentos amplificados para los genes beta-actina y U31.

Secuencias de los oligonucleótidos (amarillos) y las sondas (turquesa) diseñados para (a) el gen beta-actina y (b) el gen U31 del virus HHV-6.

8.2. Construcción de los plásmidos control para la curva de la PCR multiplex.

8.2.1. Clonación de los fragmentos génicos virales.

Los fragmentos génicos de los virus VEB, CMV, HHV-6, HHV-7 y VSK que fueron utilizados en la clonación, se obtuvieron mediante amplificación por PCR de ADN proveniente de sobrenadantes o de células infectadas, como se explicó en la Metodología, sección 5.3.1, se resume en Tabla 8 y se ejemplifica con el virus HHV-6 en la Figura 3. Se obtuvieron los 5 plásmidos virales (pVEB, pCMV, pHHV-6, pHHV-7 y pVSK) que fueron utilizados como controles positivos en la PCR multiplex de diagnóstico viral. La Figura 4 esquematiza el proceso de clonación, las clonas exitosamente transformadas fueron doblemente seleccionadas mediante crecimiento en ampicilina y la coloración blanca

obtenida en los sistemas de clonación que usan el principio de α -complementación, las clonas azules presentan el vector vacío, sin ningún inserto viral.

Tabla 8. Condiciones óptimas de amplificación para los 5 fragmentos virales por PCR punto final.

Virus	Temp. Alineamiento	Buffer de la Taq polimerasa	MgCl₂	Tamaño del fragmento	Fuente del templado para PCR:
VEB	59°C	KCl	2-2.5mM	90pb	ADN de línea celular Raji de linfocitos B VEB(+)
CMV	58°C	KCl	2-2.5mM	201pb	ADN de sobrenadante de fibroblastos primarios de prepucio infectados con CMV
HHV-6	56°C	(NH ₄) ₂ SO ₄	2-2.5mM	223pb	ADN de línea celular MOLT-3 de linfocitos T. infectadas con el HHV-6
HHV-7	58°C	(NH ₄) ₂ SO ₄	2-2.5mM	108pb	ADN viral donado por la Dra. Tzindilu Molina Muñoz, CMN SXXI. Cepa 5B
VSK	58°C	(NH ₄) ₂ SO ₄	2-2.5mM	166pb	ADN de línea celular BCP-1 Linfocito B VSK(+)

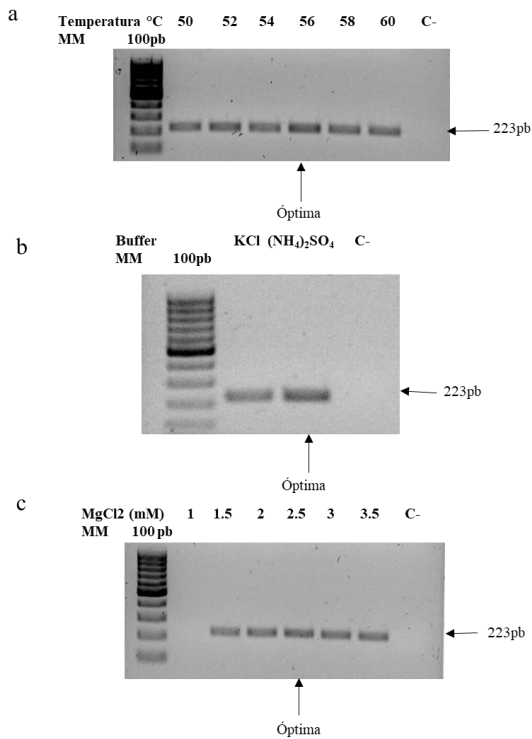


Figura 3. Ejemplo de las PCRs punto final ensayadas.

Geles de agarosa al 1.5%. Fragmento de 223pb del gen U31 del virus HHV-6. (a) Gradiente de temperatura de 50°C a 60°C con un incremento de 2°C, representadas en cada uno de los carriles. (b) Prueba de dos buffer de la reacción, cloruro de potasio (KCl) y sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄). (c) Curva de concentración de cloruro de magnesio (MgCl₂) en un rango de 1mM a 3mM con un incremento de 0.5mM entre cada reacción, representadas en cada uno de los carriles. Marcador molecular (MM) de 100pb ladder (marcador con incrementos cada 100pb); C- control negativo, reacción sin templado, pb = pares de bases.

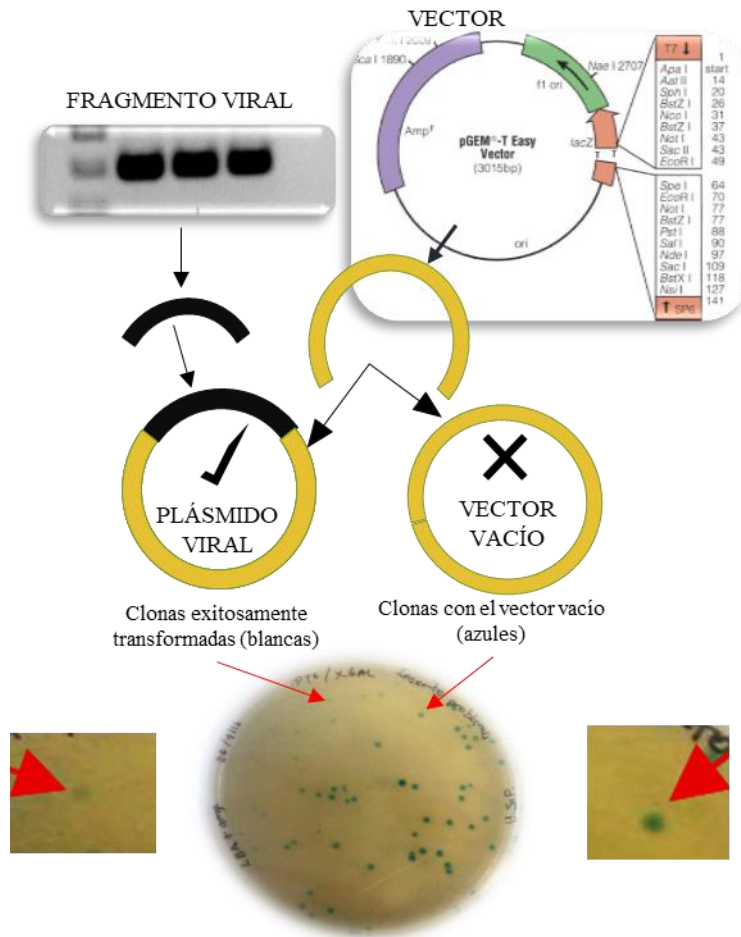


Figura 4. Esquema de la clonación de los fragmentos virales de interés.

El producto de PCR obtenido por PCR punto final del fragmento viral correspondiente a uno de los herpesvirus, se ligó al vector comercial (pGEM T-easy, Promega), obteniendo así el plásmido viral, el cual fue utilizado para transformar bacterias *E. coli* DH5 α competentes. Las clonas exitosamente transformadas con el plásmido viral (vector pGEM T-easy ligado al fragmento viral de interés), se distinguieron mediante la coloración blanca, de aquellas que sólo presentaron el vector vacío cuya coloración es azul.

8.2.2. Digestión y secuenciación de los plásmidos virales.

Los cinco plásmidos virales contenidos en las clonas exitosamente transformadas, fueron purificados y luego digeridos con las enzimas *Eco*RI (libera el inserto clonado) y *Nde*I (lineariza el plásmido). Los tamaños para cada uno de los fragmentos génicos virales de interés fueron los esperados (Figura 5). La identidad de los fragmentos obtenidos fue confirmada mediante la secuenciación por el método Sanger (Figura 6). Así se corroboró la clonación exitosa de los fragmentos génicos de interés en los plásmidos virales, los cuales

funcionaron como controles positivos de las reacciones de PCR multiplex de diagnóstico viral

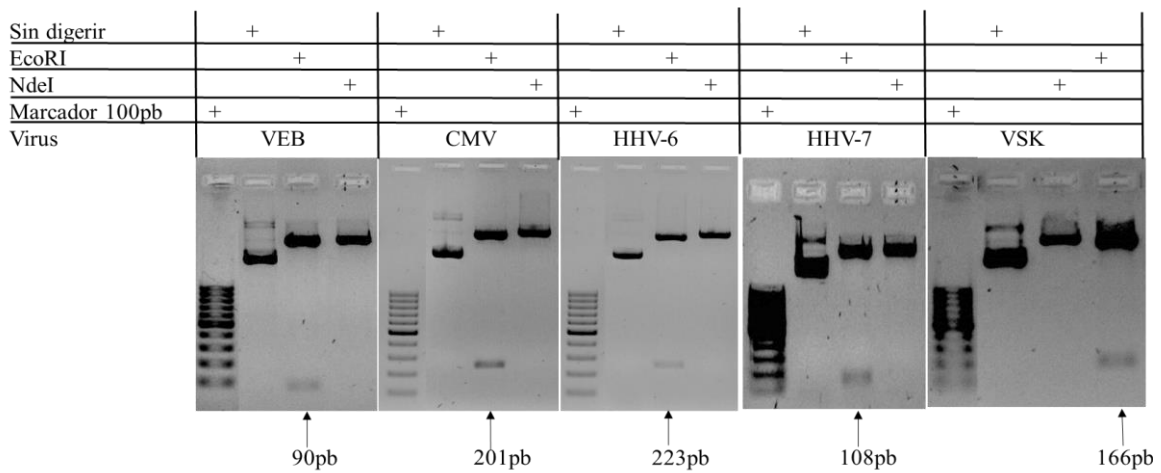


Figura 5. Digestión de los plásmidos virales.

Gel de agarosa al 1% muestra la digestión del AND plasmídico obtenido de cada clona transformada con los 5 plásmidos virales. Se muestra: Plásmido sin digerir, digerido con *EcoRI* que libera el fragmento viral clonado y digerido con *NdeI* que lineariza el plásmido. Marcador molecular 100pb ladder (marcador con incrementos cada 100 pares de bases).

a) Human gammaherpesvirus 4 isolate EBVaGC5-1, partial genome
 Sequence ID: [MG021317.1](#) Length: 171758 Number of Matches: 1

Range 1: 155867 to 155956 GenBank Graphics

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	167 bits (90)	4e-38	90/90 (100%)	0/90 (0%)	Plus/Plus
Query 1			CCCTGTTTATCCGATGGAATGACGGCGCATTCTCGTGCGGTGTACACCGTCTCGAGTATG		60
Sbjct 155867			CCCTGTTTATCCGATGGAATGACGGCGCATTCTCGTGCGGTGTACACCGTCTCGAGTATG		155926
Query 61			TCGTAGACATGGAAGTCCAGAGGGCTTCCG	90	
Sbjct 155927			TCGTAGACATGGAAGTCCAGAGGGCTTCCG	155956	

b) Human betaherpesvirus 5 strain HANSCTR9, complete genome
 Sequence ID: [KY490083.1](#) Length: 235153 Number of Matches: 1

Range 1: 172479 to 172679 GenBank Graphics

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	372 bits (201)	2e-99	201/201 (100%)	0/201 (0%)	Plus/Plus
Query 1			GCTACAATAGCCTCTTCTCATCTGACTCCTCGGCGATGGCCCGTAGGTCATCCACACTA		60
Sbjct 172479			GCTACAATAGCCTCTTCTCATCTGACTCCTCGGCGATGGCCCGTAGGTCATCCACACTA		172538
Query 61			GGAGAGCAGACTCTCAGAGGATCGGCCCCAGAAATGTACTGGGCAAGACCTTCATGCAG		120
Sbjct 172539			GGAGAGCAGACTCTCAGAGGATCGGCCCCAGAAATGTACTGGGCAAGACCTTCATGCAG		172598
Query 121			ATCTCCTCAATGCGGCGCTTCATTACACTGATAACCTCAGGCTTGGTTATCAGAGGCCGC		180
Sbjct 172599			ATCTCCTCAATGCGGCGCTTCATTACACTGATAACCTCAGGCTTGGTTATCAGAGGCCGC		172658
Query 181			TTGGCCAGCATCACACTAGTC	201	
Sbjct 172659			TTGGCCAGCATCACACTAGTC	172679	

c) Human herpesvirus 6 strain HP51G12, partial genome
 Sequence ID: [KY315537.1](#) Length: 161686 Number of Matches: 1

Range 1: 46321 to 46441 GenBank Graphics

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	224 bits (121)	4e-55	121/121 (100%)	0/121 (0%)	Plus/Plus
Query 1			CGACTCTCACCCGACTGAACGAGAAGCCACAGCAGCCATCTACATCTGTCAAGACATTGA		60
Sbjct 46321			CGACTCTCACCCGACTGAACGAGAAGCCACAGCAGCCATCTACATCTGTCAAGACATTGA		46380
Query 61			AGAAGCTTATGAACTGCTCACCGCCACGGCCTGAAGGCTTCTACTACGACGCCAGCTT		120
Sbjct 46381			AGAAGCTTATGAACTGCTCACCGCCACGGCCTGAAGGCTTCTACTACGACGCCAGCTT		46440
Query 121			C 121		
Sbjct 46441			C 46441		

d) Human herpesvirus 7 isolate UCL-1, partial genome
 Sequence ID: [KF558370.1](#) Length: 153072 Number of Matches: 1

Range 1: 88303 to 88410 GenBank Graphics

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	200 bits (108)	5e-48	108/108 (100%)	0/108 (0%)	Plus/Plus
Query 1			CGGAAGTCACTGGAGTAATGACAACCTCGCAGATTGCTTGTGGCCATGTAAGTATTG		60
Sbjct 88303			CGGAAGTCACTGGAGTAATGACAACCTCGCAGATTGCTTGTGGCCATGTAAGTATTG		88362
Query 61			ATTGTGATTGCTTATTTATCTTACCAGAAAGAAAGGATGTTTAAAGCAT	108	
Sbjct 88363			ATTGTGATTGCTTATTTATCTTACCAGAAAGAAAGGATGTTTAAAGCAT	88410	

e) Human gammaherpesvirus 8 DNA, nearly complete genome, strain: Japan1
 Sequence ID: [LC200589.1](#) Length: 136429 Number of Matches: 1

Range 1: 123741 to 123906 GenBank Graphics

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	302 bits (163)	3e-78	165/166 (99%)	0/166 (0%)	Plus/Plus
Query 2			AGTTATGGGCGACTGGTCTGGTCCAGGGTGGGGCAGGCAGGACCGGGCCCTGCCTTTAC		61
Sbjct 123741			AGTTATGGGCGACTGGTCTGGTCCAGGGTGGGGCAGGCAGGACCGGGCCCTGCCTTTAC		123800
Query 62			TCCTCAAACCTGGAAGGCCCTGAGATAAATTTTTAAGTCCGTATGGGTCAATGCCCAAAA		121
Sbjct 123801			TCCTCAAACCTGGAAGGCCCTGAGATAAATTTTTAAGTCCGTATGGGTCAATGCCCAAAA		123860
Query 122			AATCACTGCAAACCTCCATTGACACTTTGGATCTCGTCTTCCATCC	167	
Sbjct 123861			AATCACTGCAAACCTCCATTGACACTTTGGATCTCGTCTTCCATCC	123906	

Figura 6. Alineamiento de fragmentos virales clonados en Standard Nucleotide-Blast.

Alineamiento de los cinco fragmentos clonados y secuenciados mediante el método Sanger, en el que cada fragmento mostró identidad entre un 99 y un 100% con el genoma del herpesvirus correspondiente. a) VEB, b) CMV, c) HHV-6, d) HHV-7 y e) VSK.

8.3. Estandarización de la curva para PCR multiplex en tiempo real.

8.3.1. Especificidad de los oligonucleótidos.

Mediante el uso de las diluciones seriales de los 5 plásmidos control, se amplificaron los fragmentos virales de interés en reacciones de PCR cuantitativas, utilizando SYBR-Green. Estas reacciones permitieron llevar a cabo un análisis de disociación de los fragmentos amplificados mediante la formación de curvas MELT. La cinética de disociación mostró un pico de fluorescencia perfectamente marcado entre los 80°C y 85°C en los 5 fragmentos virales amplificados (Figura 7), lo que indicó la especificidad de los 5 pares de oligonucleótidos y que las condiciones de amplificación funcionaron para la amplificación de los 5 fragmentos virales.

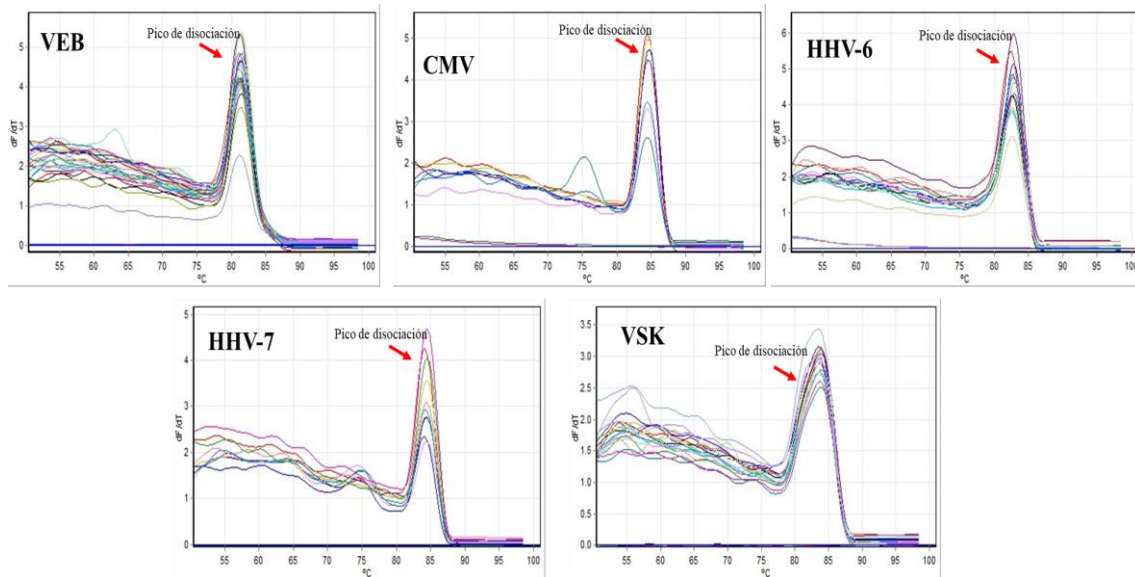


Figura 7. Curvas MELT de los cinco fragmentos virales.

Curvas MELT post-PCR que muestran la cinética de disociación de los 5 fragmentos virales, en los ejes de las “X” se observa la temperatura de disociación y en los ejes de las “Y” la fluorescencia, se distingue un pico de disociación perfectamente marcado entre los 80 y 85°C (flecha roja).

8.3.2. Sensibilidad analítica.

La sensibilidad analítica de las reacciones de PCR multiplex es expresada por el límite de detección, el cual se muestran en la Tabla 12, estos valores nos indican que a partir de 21, 18, 25, 21 y 18 copias virales las reacciones multiplex son capaces de detectar al VEB, el CMV, el HHV-6, el HHV-7 y el VSK, respectivamente, con un 95% de confiabilidad.

8.3.3. Confiabilidad predictiva y eficiencia de la curva patrón.

La confiabilidad y la eficiencia fueron evaluadas mediante el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de eficiencia (E) de 15 reacciones de PCR cuantitativas (3 por cada fragmento viral amplificado). Se obtuvieron eficiencias del 91% al 100% y coeficientes de determinación muy cercanos a 1. La Tabla 9 presenta las medias obtenidas tanto de la eficiencia como del coeficiente de determinación de las 3 reacciones de PCR cuantitativa para cada fragmento viral amplificado. La Figura 8 muestra las curvas de fluorescencia con alta homogeneidad de los triplicados y una distribución simétrica de los 6 puntos control de las diluciones decimales de cada plásmido viral. Los valores obtenidos nos indican que la curva patrón obtenida puede predecir el número de copias virales de todos los herpesvirus con un 98% de confianza (R^2) y amplificar con al menos un 93% de eficiencia (E) las secuencias de todos los herpesvirus; demostrando así que los oligonucleótidos, las sondas, las diluciones decimales de los plásmidos virales y las condiciones de amplificación son adecuadas para determinar el número de copias de los 5 virus de interés.

Tabla 9. Media de los coeficientes de determinación (R^2) y de los porcentajes (%) de eficiencia obtenidos para cada fragmento viral.

Plásmidos control	(R^2)	E (%)
pVEB	0.98888	100
pCMV	0.99400	93
pHHV-6	0.99278	95
pHHV-7	0.99652	93
pVSK	0.99545	95

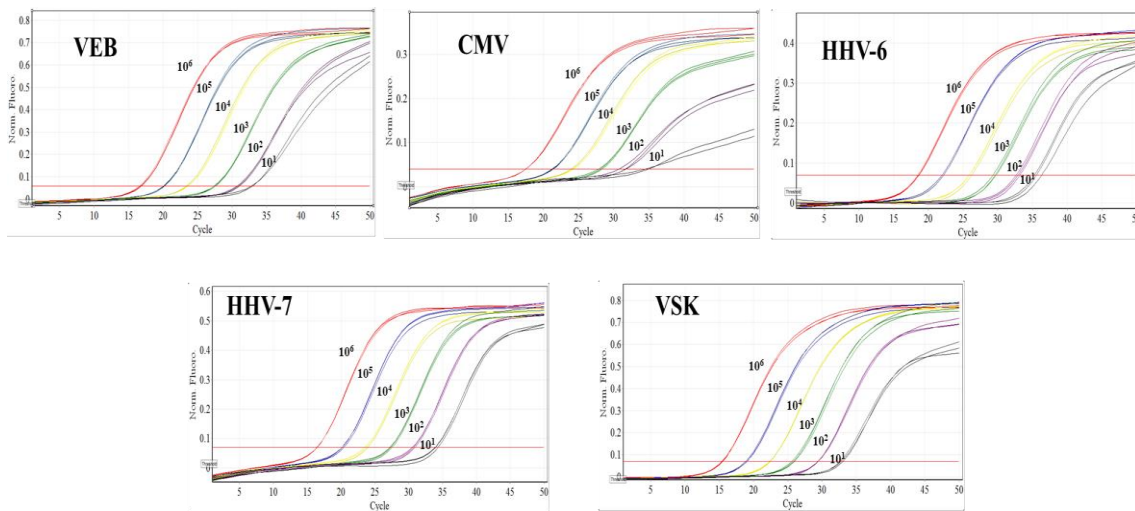


Figura 8. Curvas de fluorescencia de los cinco plásmidos virales.

Cada curva patrón se realizó con seis puntos control a 10^1 (negro) 10^2 (morado), 10^3 (verde), 10^4 (amarillo), 10^5 (azul) y 10^6 (rojo) de copias virales, cada punto por triplicado. En los ejes de las “X” se grafican los ciclos de amplificación y en los ejes de las “Y” la fluorescencia. Se observa una gran homogeneidad en las curvas y los coeficientes de determinación obtenidos son adecuados (Tabla 9).

8.3.4. Precisión y rango dinámico de las reacciones de PCR cuantitativas multiplex.

La precisión $\geq 95\%$ de estos ensayos multiplex es expresada con el coeficiente de variación, que se muestra en la Tabla 10, observando que tanto en los análisis de repetibilidad, intra-ensayos, que incluye un ensayo por triplicado para cada punto de amplificación, como en los de reproducibilidad, inter-ensayos, que incluye tres ensayos por triplicado para cada punto de amplificación, los valores son menores al 4% lo que indica que estos ensayos son altamente reproducibles. El rango dinámico fue de seis órdenes de magnitud log10, desde 10 hasta 10^6 copias virales/ μg de ADN o ml de plasma.

Tabla 10. Coeficientes de variación de cada reacción con un 95% de confiabilidad.

	VEB	CMV	HHV-6	HHV-7	VSK
Repetibilidad					
1x10 ⁶	0.31	0.73	0.44	0.54	0.31
1x10 ⁵	0.77	2.93	0.91	0.44	0.31
1x10 ⁴	0.96	1.64	0.93	0.69	1.27
1x10 ³	1.43	3.30	0.50	1.05	0.67
1x10 ²	1.82	1.65	0.43	0.87	0.69
1x10 ¹	2.54	3.55	0.65	1.43	1.19
Reproducibilidad					
1x10 ⁶	0.96	3.12	1.89	0.49	0.66
1x10 ⁵	1.77	2.89	1.21	0.76	0.96
1x10 ⁴	1.49	2.94	1.33	0.91	1.13
1x10 ³	1.75	2.35	1.95	0.85	0.57
1x10 ²	1.88	2.53	1.63	0.69	1.09
1x10 ¹	2.09	3.87	0.72	2.67	2.60

8.3.5. Correlaciones entre las reacciones multiplex y las reacciones individuales.

La amplificación de los seis fragmentos se dividieron en 2 reacciones, VEB/CMV/ACTB y HHV-6/HHV-7/VSK, las concentraciones finales óptimas de los oligonucleótidos y las sondas utilizados en la amplificación se resumen en la Tabla 11. Mediante un análisis de correlación se compararon las medias (obtenidos de los triplicados de cada punto control) entre el número de copias virales observadas en reacciones individuales con respecto a las observadas en las reacciones multiplex para cada fragmento viral. La Figura 9 muestra las curvas de correlación obtenidas, en las cuales se grafican en los ejes de las “X” los valores de carga viral obtenidos en la reacción individual y en los ejes de las “Y” los valores de carga viral obtenidos en la reacción multiplex. La Tabla 12 muestra los coeficientes de correlación obtenidos de la comparación entre las reacciones individuales y las multiplex, de cada plásmido viral, observando que para los cinco fragmentos virales se obtuvieron coeficientes cercanos a 1, esto indica una alta correlación entre el número de copias de ADN determinadas

por las reacciones individuales y las determinadas por las reacciones multiplex, lo cual nos permite concluir que no habrá cambios significativos en los valores cuantitativos en las reacciones multiplex.

Tabla 11. *Concentraciones optimizadas de los reactivos utilizados en la PCR multiplex.*

Reactivos	Concentración final
Master mix Quantitec	1x
Oligonucleótidos del gen BALF5-VEB, F y R	250nM
Oligonucleótidos del gen IE-CMV, F y R	250nM
Oligonucleótidos del intrón ACTB10- beta actina, F y R	125nM
Oligonucleótidos del gen U31-HHV-6, F y R	250nM
Oligonucleótidos del gen U57-HHV-7, F y R	250nM
Oligonucleótidos del gen LANA-VSK, F y R	250nM
Sonda BALF5- VEB FAM-BHQ1	125nM
Sonda IE- CMV HEX-BHQ1	125nM
Sonda U31-HHV-6 FAM-BHQ1	125nM
Sonda U57-HHV-7 HEX-BHQ1	125nM
Sonda LANA-VSK CY5-BHQ2	125nM
Sonda ACTB-beta-actina CY5-BHQ2	62.5nM

Tabla 12. Coeficientes de correlación (R) del número de copias virales obtenidas entre cada una de las reacciones de amplificación de los virus en formato individual con respecto a la multiplex.

Plásmido	Coefficiente de correlación (R)
pVEB	0.9994
pCMV	0.9904
pHHV-6	0.9998
pHHV-7	0.9980
pVSK	1

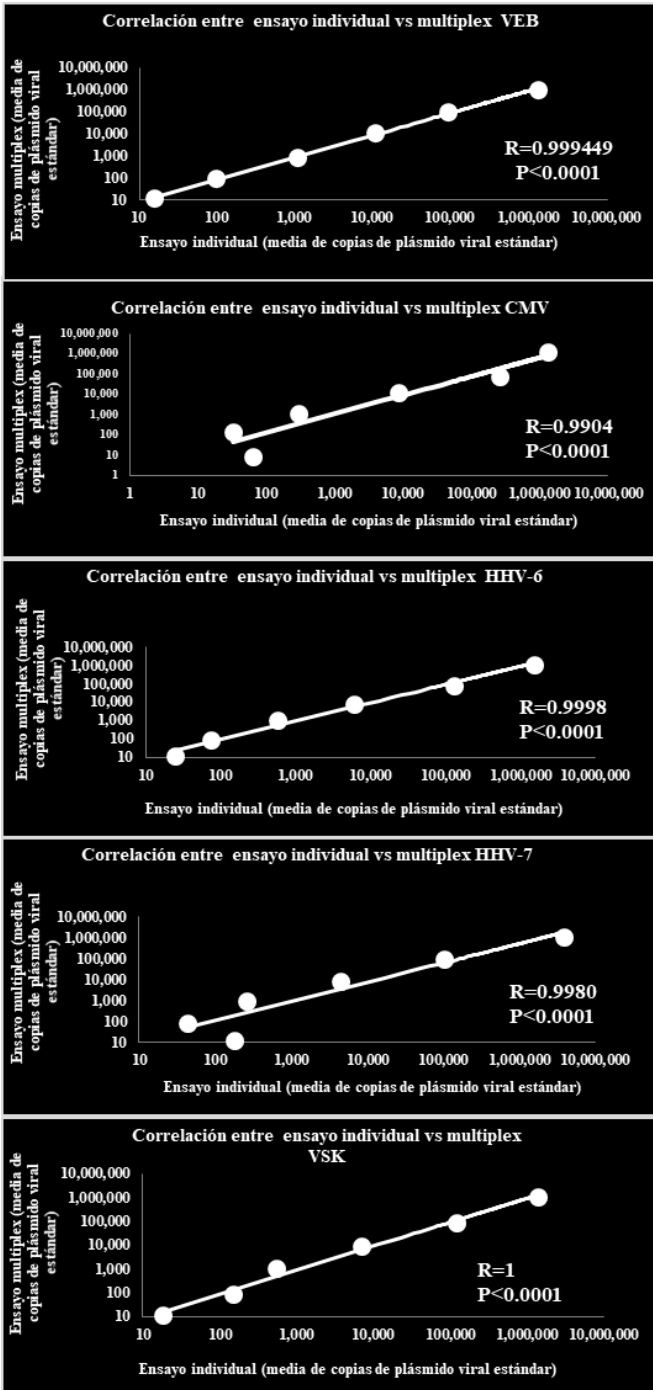


Figura 9. Correlación entre ensayos individuales y multiplex.

Curvas de correlación entre la media de las copias virales observadas en la reacción individual con respecto a las observadas en la reacción multiplex, para los cinco plásmidos virales. En el eje de las “X” se grafican los valores de carga viral obtenidos en la reacción individual y en el eje de las “Y” los valores de carga viral obtenidos en la reacción multiplex. De acuerdo a los coeficientes “R” cercanos a 1 que se obtuvieron, las reacciones individuales tienen una alta correlación con las reacciones multiplex.

8.4. Análisis de muestras de pacientes.

8.4.1. Colecta de muestras.

El presente estudio incluyó 28 pacientes pediátricos, 21 fueron sometidos a trasplante renal, las edades al trasplante oscilaron entre los 6 y los 17 años, con una mediana de 15 años. 67% fueron hombres y 33% mujeres. 57% de los órganos fueron dados por un donador cadavérico y el 43% por un donador vivo relacionado. El 67% de los pacientes fue diagnosticado con enfermedad crónica renal terminal (ERCT) de etiología desconocida, 9% con glomeruloesclerosis focal y segmentaria, 9% ERCT secundaria a uropatía compleja, 5% ERCT secundaria a hipoplasia, artritis reumatoide juvenil sistémica (ARJS), 5% poliangeítis microscópica y 5% valvas uretrales posteriores. Siete fueron pacientes sometidos a trasplante hepático, las edades oscilaron entre los 4 y los 14 años, con una mediana de 6 años; el 86% fueron mujeres y el 14% hombres; 86% de los órganos fueron dados por un donador cadavérico y el 14% por un donador vivo relacionado; 46% fueron diagnosticados con atresia de vías biliares, 14% hepatitis fulminante, 14% fibrosis hepática, 14% hepatitis neonatal de células gigantes, 14% colestasis familiar intrahepática progresiva (Tabla 13).

Se colectaron en total 415 muestras de sangre, 308 de trasplante renal con una mediana de 15 muestras por paciente y 107 de trasplante hepático con una mediana de 16 muestras por paciente. Las muestras de sangre se separaron en plasma y leucocitos, para un análisis final de 830 muestras de ADN. El tiempo de seguimiento de los paciente fue de entre 8 y 12 meses (22 de los pacientes se siguieron por 12 meses), con una periodicidad de aproximadamente cada 15 días los primeros 3 meses y de cada 30 días a partir del tercer mes, obteniendo una alta homogeneidad en la toma de muestras (Tabla 14 y Figura 10).

Tabla 13. Datos clínico-demográficos de los pacientes sometidos a trasplante.

Población de estudio		
Tipo de trasplante	Renal	Hepático
Nº de pacientes	21*	7*
Rango de edades al trasplante (mediana)	6-17 años (15 años)	4-14 años (6 años)
Sexo		
Femenino	33%	86%
Masculino	67%	14%
Tipo de donador		
Cadavérico	57%	86%
Donador vivo	43%	14%
Nº de muestras de sangre (mediana)	380 (15)	107 (16)
Diagnóstico pre trasplante	67% ERCT de etiología desconocida	44% Atresia de vías biliares
	9% Glomeruloesclerosis focal y segmentaria	14% Hepatitis fulminante
	9% ERCT secundaria a uropatía compleja	14% Fibrosis hepática
	5% ERCT secundaria a hipoplasia ARJ	14% Hepatitis neonatal de células gigantes
	5% Poliangeitis microscópica	14% Colestasis familiar intrahepática progresiva
	5% Valvas uretrales posteriores	

* Se eliminaron cuatro pacientes, dos por pérdida del injerto (TR3 y TR4) y dos por muestra pre-trasplante inadecuada (TH1 y TH2). ** ERTC: Enfermedad renal terminal crónica, ARJ artritis reumatoide juvenil

Tabla 14. Seguimiento de los pacientes.

Código Paciente	Meses de seguimiento	Número de muestras analizadas
TR1	12	17
TR2	12	14
TR5	12	16
TR6	12	17
TR7	12	16
TR8	12	15
TR9	12	15
TR10	12	15
TR11	12	15
TR12	12	14
TR13	12	17
TR14	12	15
TR15	12	15
TR16	12	15
TR17	12	16
TR18	12	12
TR19	12	16
TR20	11	13
TR21	10	13
TR22	8	11
TR23	8	11
TH3	12	17
TH4	12	16
TH5	12	16
TH6	12	15
TH7	12	16
TH8	11	15
TH9	8	12
Rango	8 a 12	415
Total		

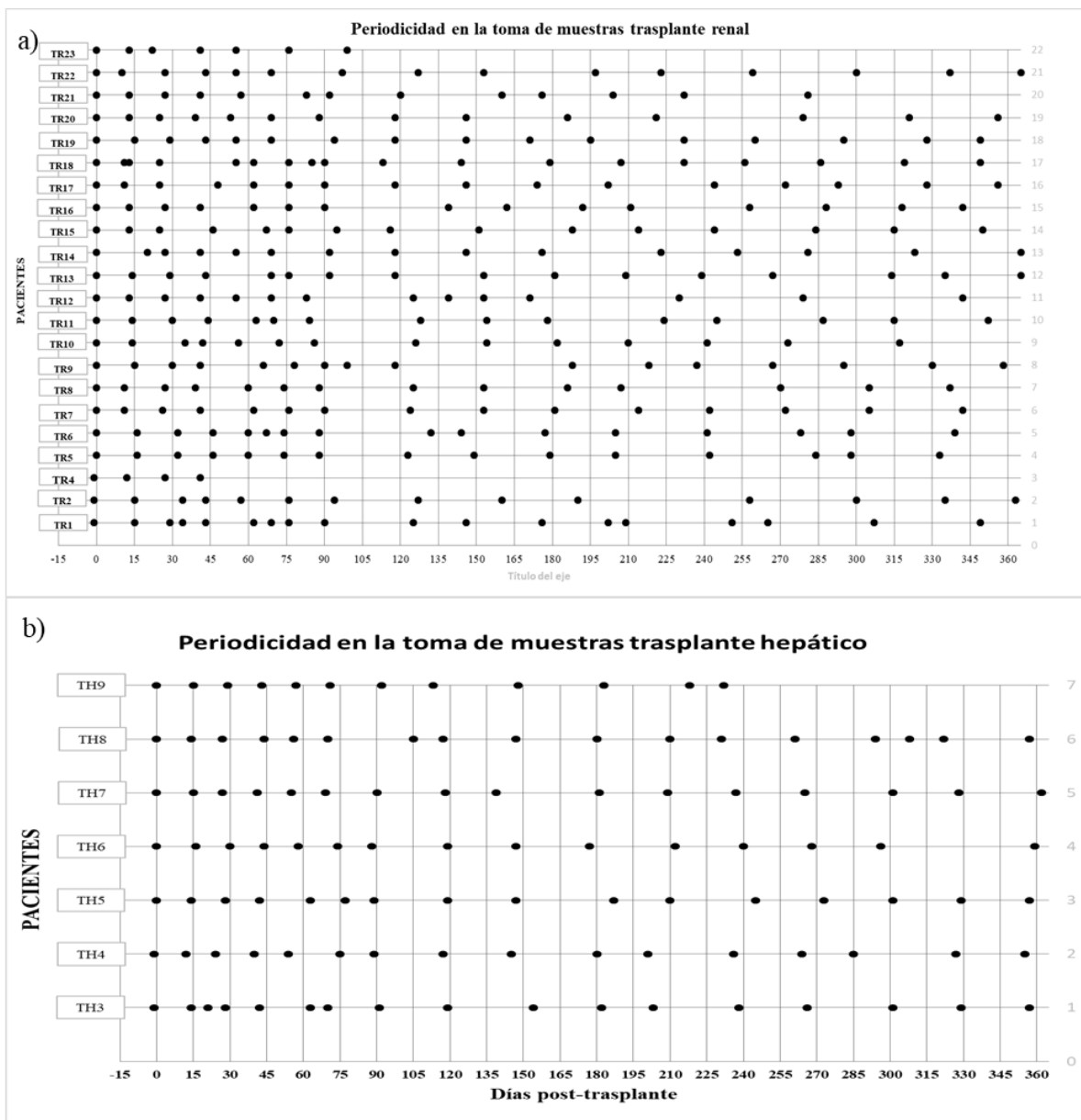


Figura 10. Periodicidad en la toma de muestras.

Gráficas de la periodicidad de la toma de muestras de los pacientes sometidos a trasplante renal (a) y hepático (b). En el eje de las “X” se grafican los días post-trasplante y en el eje de las “Y” los pacientes con su respectivo código, donde “El número (1-21) corresponde al orden en el cuál dichos pacientes se integraron al protocolo ya sea renal o hepático del presente estudio. Cada punto negro equivale a una muestra recibida y analizada.

8.4.2. Detección de la carga viral de los 5 herpesvirus de interés.

Se determinaron las cargas virales en leucocitos y plasma de los cinco herpesvirus en los 28 pacientes analizados. La separación en leucocitos y plasma nos permitirá entender mejor el

tipo de infección viral: asociado a células es principalmente latente (leucocitos) y virus libre en plasma sugiere infecciones líticas. Se destacaron cuatro criterios clave de interés sobre las cargas virales de las muestras analizadas, que se presentan a continuación.

8.4.2.1. Muestras positivas para al menos uno de los herpesvirus.

Sólo las muestras cuyas cargas virales rebasaron los límites de detección, señalados en la Tabla 12 se consideraron positivas y se tomaron en cuenta en el análisis. De las 415 muestras analizadas, 100 (24%), pertenecientes a 22 pacientes (79%), resultaron positivas al menos a uno de los cinco herpesvirus durante el seguimiento, en leucocitos o plasma (Tabla 15, filas no sombreadas).

Tabla 15. Resumen de muestras positivas por virus.

Paciente	N° de muestras analizadas	N° de muestras positivas	Número de muestras positivas por cada tipo de virus				
			VEB	CMV	HHV-6	HHV-7	VSK
TR1	17	12	5	0	0	15	0
TR2	14	4	0	1	1	2	0
TR5	16	5	3	4	0	1	0
TR6	17	12	6	4	3	3	0
TR7	16	5	1	0	1	3	0
TR8	15	4	1	1	0	3	0
TR9	15	1	0	0	0	1	0
TR10	15	4	3	0	0	3	0
TR11	15	0	0	0	0	0	0
TR12	14	1	1	0	0	0	0
TR13	17	2	2	0	1	1	0
TR14	15	2	1	1	0	0	0
TR15	15	14	3	0	3	14	0
TR16	15	1	0	0	2	0	0
TR17	16	10	4	5	3	3	0
TR18	12	2	0	2	0	0	0
TR19	16	0	0	0	0	0	0
TR20	13	0	0	0	0	0	0

TR21	13	0	0	0	0	0	0
TR22	11	2	0	4	0	0	0
TR23	11	0	0	0	0	0	0
TH3	17	2	0	2	0	0	0
TH4	16	1	1	0	0	0	0
TH5	16	2	1	1	2	0	0
TH6	15	5	0	0	0	6	0
TH7	16	7	7	0	0	4	0
TH8	15	0	0	0	0	0	0
TH9	12	2	2	0	0	0	0
total	415	100	41	25	16	58	0

Nota: cuando la suma de virus positivos es mayor al número de muestras positivas se debe a eventos de coinfección, que se detallan en el apartado 6.4.2.4.

La Tabla 16 ejemplifica los resultados obtenidos para uno de los pacientes de trasplante renal con un seguimiento de 12 meses. En dicha tabla se presentan las cargas virales en plasma y leucocitos de los cinco herpesvirus analizados en cada una de las muestras pertenecientes al paciente TR17. De 16 muestras analizadas durante el seguimiento: se encontraron 10 muestras con 15 cargas virales positivas, 4 para el VEB (2 en plasma y 2 en leucocitos), 5 para el CMV (1 en plasma y 4 en leucocitos), 3 para el HHV-6 (2 en plasma y 1 en leucocitos) y 3 para el HHV-7 (leucocitos), señaladas en la gráfica de la Figura 11. El resto de los pacientes se analizaron de la misma forma que como se describe para TR17.

Tabla 16. Cargas virales del paciente TR17.

Muestras	Días pos-trasplante	Leucocitos (número de copias virales/ μ g de ADN)					Plasma (número de copias virales/ml plasma)				
		VEB	CMV	HHV-6	HHV-7	VSK	VEB	CMV	HHV-6	HHV-7	VSK
TR17.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
TR17.1	11	0	0	0	290	0	0	0	0	0	
TR17.2	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
TR17.3	48	0	0	0	0	0	1620	0	0	0	
TR17.4	62	0	1170	0	0	0	0	0	88020	0	
TR17.5	76	0	3730	0	0	0	0	2040	0	0	

TR17.6	90	0	0	0	0	0	1620	0	0	0	0
TR17.7	118	270	0	0	220	0	0	0	0	0	0
TR17.8	146	390	0	0	340	0	0	0	0	0	0
TR17.9	174	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TR17.10	202	0	0	850	0	0	0	0	8160	0	0
TR17.11	244	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TR17.12	272	0	240	0	0	0	0	0	0	0	0
TR17.13	293	0	190	0	0	0	0	0	0	0	0
TR17.14	328	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TR17.15	356	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

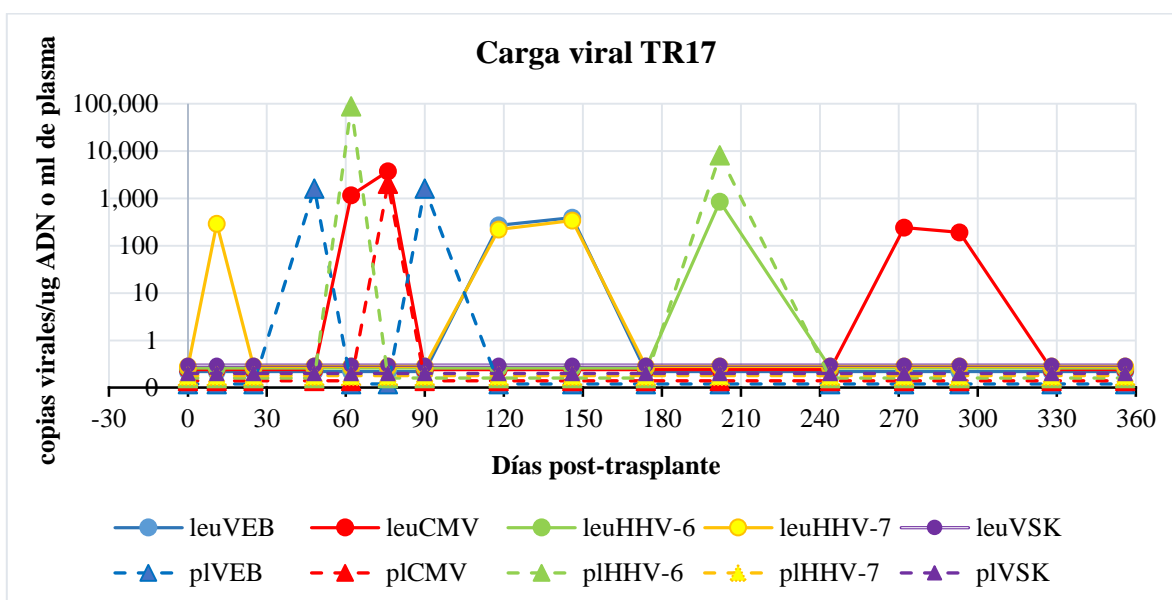


Figura 11. Gráfica de las cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR17.

(Décimo-séptimo paciente sometido a trasplante renal en participar en el protocolo). En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras de dicho paciente. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN que se encontró en cada muestra analizada del paciente. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl). El color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral: VEB (azul), CMV (rojo), HHV-6 (verde), HHV-7 (amarillo) y VSK (morado).

Encontramos que de las 100 muestras que resultaron positivas en leucocitos o plasma, el 42% (pertenecientes a 13 pacientes) fue para el HHV-7, seguido del VEB con el 29% (pertenecientes a 15 pacientes), el CMV con el 18% (pertenecientes a 10 pacientes) y

finalmente el HHV-6 con un 11% (pertenecientes a 8 pacientes), ninguna muestra resultó positiva al VSK (Figura 12).

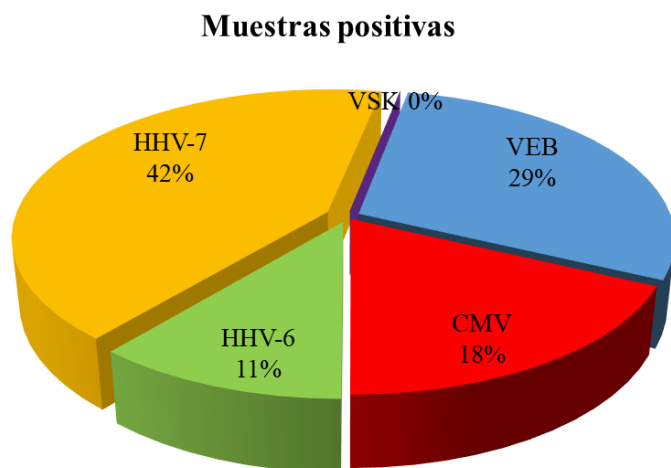


Figura 12. Muestras positivas por herpesvirus.

Proporción por tipo de herpesvirus de las muestras que resultaron positivas, de las cuales el 42% fueron positivas al HHV-7, seguido del VEB con un 29%, el CMV con un 18% y el HHV-6 con un 11%. Ninguna muestra analizada resultó positiva al VSK.

8.4.2.2. Rangos de detección y distribución de las cargas virales.

Las 100 muestras que resultaron positivas lo fueron para uno a cuatro herpesvirus simultáneamente, de manera que en total se detectaron 140 cargas virales positivas. De estas, 81 (58%) se encontraron en leucocitos y 59 (42%) en plasma. El VEB y el HHV-6 fueron principalmente detectados en plasma, mientras que el CMV y el HHV-7 fueron mayormente detectados en leucocitos (Figura 13). La frecuencia de muestras positivas se especifica en la Tabla 17.

Tabla 17. Rangos de detección de los herpesvirus beta y gamma en leucocitos y plasma.

Virus	N° de muestras positivas				Total de muestras positivas por virus
	Leucocitos (Total analizadas = 415)		Plasma (Total analizadas = 415)		
	n	%	n	%	
VEB	17	4.1	24	5.8	41
CMV	22	5.3	3	0.7	25
HHV-6	6	1.4	10	2.4	16

HHV-7	36	8.7	22	5.3	58
VSK	0	0	0	0	0
Total	81	58%	59	42%	140

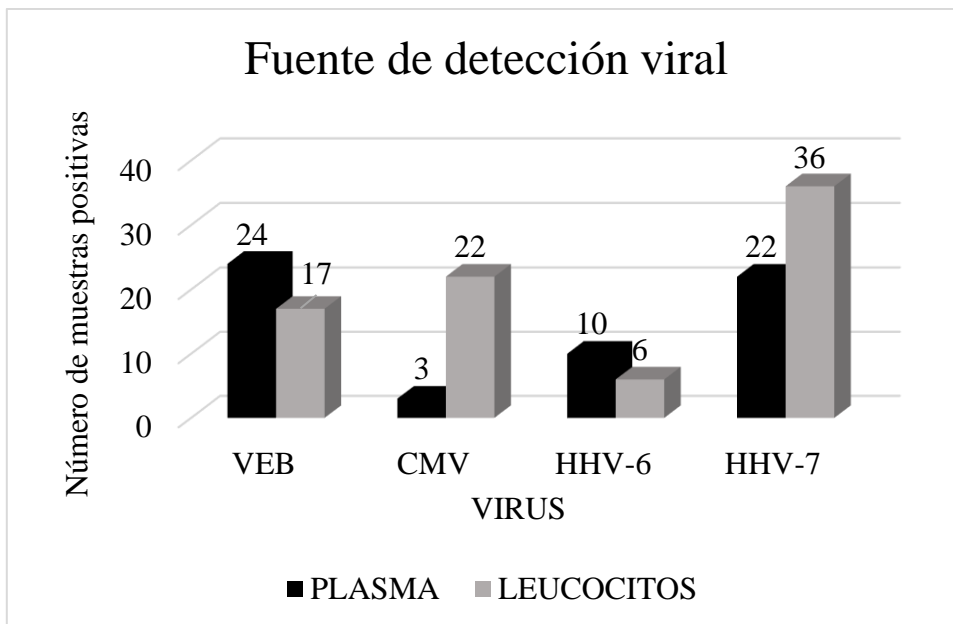


Figura 13. Número de muestras positivas observadas en leucocitos y en plasma por herpesvirus.

El rango de distribución de las cargas virales en este estudio fue muy amplio, de 120 a 82,470 copias virales por μg de ADN en leucocitos y de 1,260-3, 675,240 copias virales por ml de plasma. En la Tabla 18 se especifican los rangos de distribución en escala logarítmica (10) por tipo de virus y en la Tabla 19 se resumen las medianas y rangos de las cargas virales encontradas por tipo de virus. La mayoría de cargas virales encontradas en leucocitos se ubican en el $\log 10^2$ - 10^3 . El HHV-7 fue el virus con mayor carga viral en leucocitos. Mientras que, la mayoría de las cargas virales encontradas en plasma se ubicaron un log más arriba 10^3 - 10^4 . El HHV-6 fue el virus con mayor carga viral en plasma. Las cargas virales tanto en leucocitos como en plasma de los cuatro herpesvirus positivos se distribuyeron uniformemente, con la mayoría de cargas concentradas en un solo log y con las medianas similares si se comparan de acuerdo a la fuente de detección, excepto las cargas del HHV-6 en plasma, cuya distribución fue menos uniforme, con la mediana ubicada un log más arriba de todos los demás virus y con las cargas más altas obtenidas en este trabajo, detectadas en plasma (Figura 14 a y b).

Tabla 18. Rangos de distribución de las cargas virales de los herpesvirus en leucocitos y plasma.

Distribución de cargas virales								
Log	Leucocitos				Plasmas			
	VEB	CMV	HHV-6	HHV-7	VEB	CMV	HHV-6	HHV-7
10 ² -10 ³	17	15	4	30	0	0	0	0
10 ³ -10 ⁴	0	7	2	5	22	2	2	18
10 ⁴ -10 ⁵	0	0	0	1	1	1	2	3
10 ⁵ -10 ⁶	0	0	0	0	1	0	4	1
10 ⁶ -10 ⁷	0	0	0	0	0	0	2	0

Tabla 19. Medianas y rangos de las cargas virales de los herpesvirus en leucocitos y plasma.

Tipo de Virus	Fuente de detección			
	Leucocitos (copias virales/ug ADN)		Plasma (copias virales/ml plasma)	
	Mediana	Rango	Mediana	Rango
VEB	280	150-830	2,040	1,260-260,100
CMV	380	190-4,120	2,040	1,260-18,120
HHV-6	655	260-7,170	88,020	1,920-3,675,240
HHV-7	340	120-8,2470	2,640	1,320-828,360

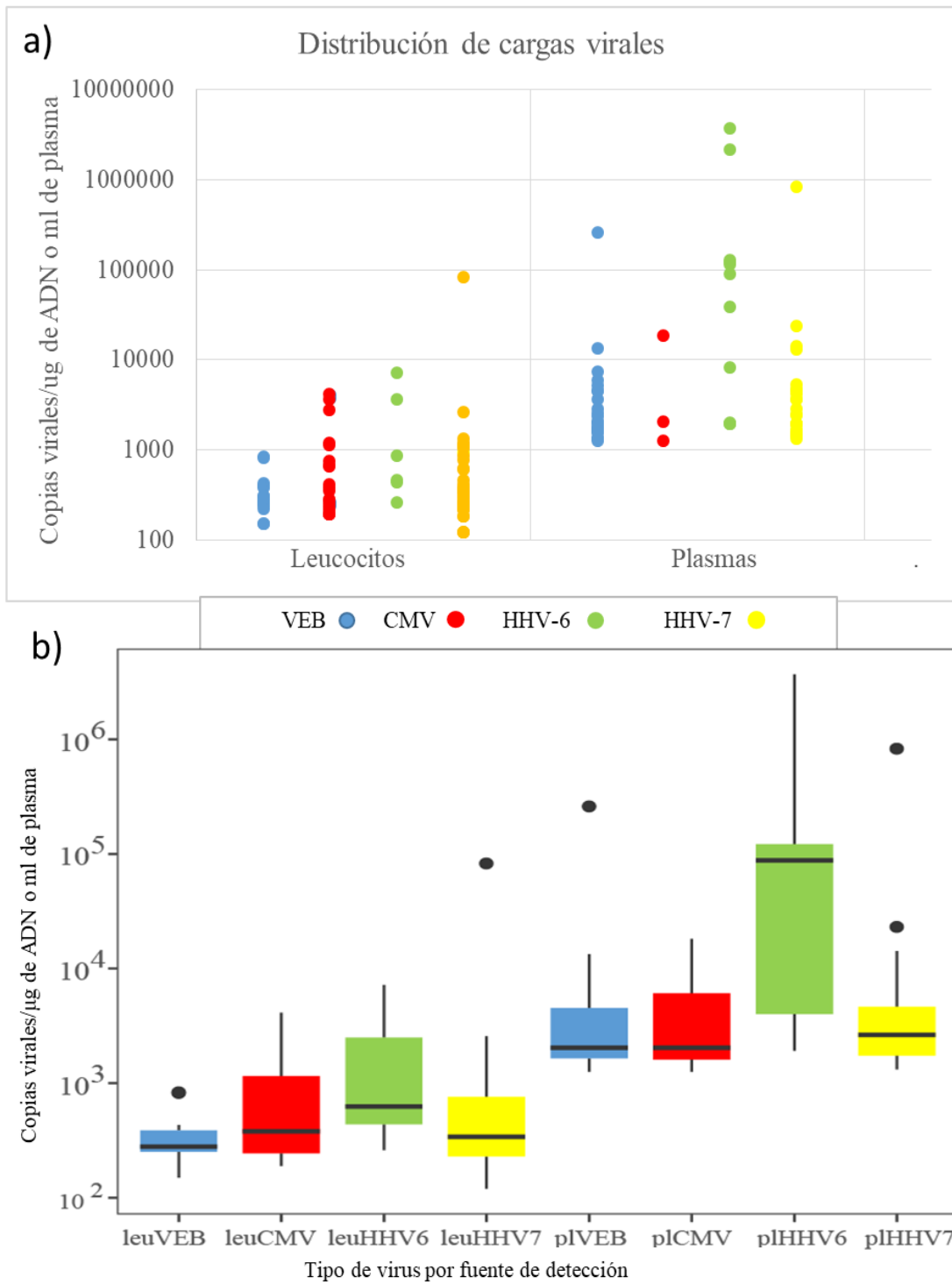


Figura 14. Distribución de las cargas virales.

Con la representación gráfica de cada muestra (a) y de manera conjunta mediante una caja de bigotes (b). En el eje de las X se grafican los virus que fueron positivos de acuerdo a su origen de detección. En el eje de las Y se grafican las cargas virales en escala logarítmica (log) de cada virus positivo de interés.

8.4.2.3. Cargas virales positivas sostenidas en el tiempo de manera consecutiva.

De los 28 pacientes analizados, 12 presentaron al menos dos muestras consecutivas cuyas cargas virales se mantuvieron positivas, 7 pacientes mantuvieron cargas continuas para el HHV-7, 6 para el VEB y 5 para el CMV, ningún paciente presentó cargas virales consecutivas para el HHV-6; 4 de estos pacientes mantuvieron cargas continuas para dos herpesvirus y uno para tres herpesvirus (Tabla 20 y anexo 10.2). El virus que presentó mayor número de cargas virales consecutivas fue el HHV-7 (Figura 15), con pacientes que sostuvieron la positividad de este virus en varias muestras, la gráfica de la Figura 16 ejemplifica estos resultados con el paciente TH6 el cual mostró cinco cargas positivas consecutivas para el HHV-7 en leucocitos; a partir del día 177 y hasta el día 296.

Tabla 20. Cargas virales positivas sostenidas.

Virus	No. de pacientes con cargas sostenidas	No. cargas sostenidas (Rango)
VEB	6	2-7
CMV	5	2-3
HHV-6	0	-
HHV-7	7	2-8

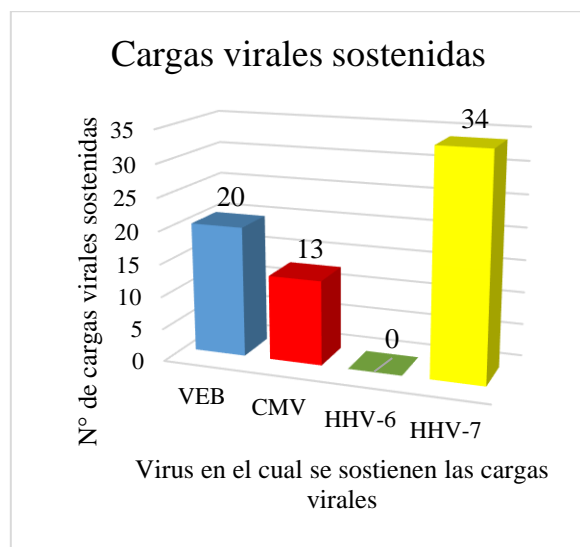


Figura 15. Cargas virales sostenidas en muestras consecutivas.

En el eje de las X se grafican los virus y en el eje de las Y el número de cargas virales sostenidas.

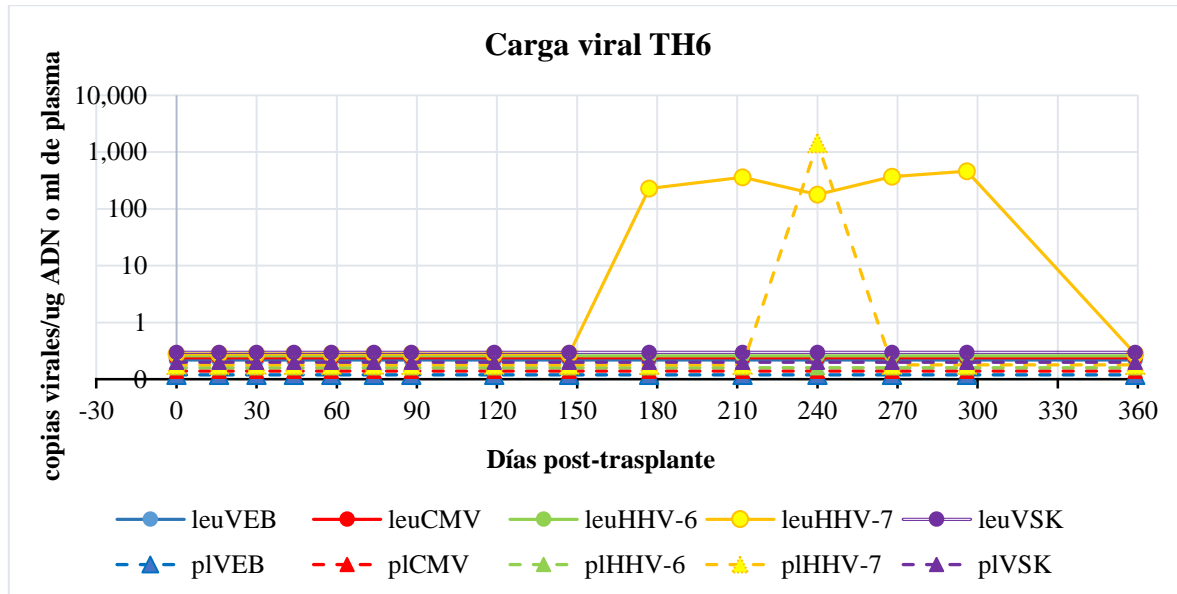


Figura 16. Gráfica de las cargas virales del paciente TH6.

En este paciente se observan cinco muestras consecutivas positivas al HHV-7 en leucocitos a partir del día 177 y hasta el día 296. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias por μg de ADN o ml de plasma. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.

8.4.2.4. Cargas virales positivas a más de un herpesvirus (eventos de coinfección).

De 415 muestras analizadas, 23 (6%) pertenecientes a 10 (36%) pacientes mostraron cargas virales positivas a más de un herpesvirus, la Tabla 21 resume los eventos de coinfección. En general, el VEB es el más frecuentemente encontrado en coinfección, con el HHV-7 en siete pacientes, con un rango de una a cuatro muestras (correspondientes al 65% de todos los eventos de coinfección); con el CMV (9%) y con el HHV-6 (9%) en dos muestras de dos pacientes. El CMV en coinfección con el HHV-7 y el HHV-6 en coinfección con el HHV-7 se encontraron elevados en una muestra de un paciente (4% para cada coinfección). Los pacientes TR13 y TR15 tuvieron una muestra cada uno con coinfección triple, entre el VEB, el HHV-6 y el HHV-7 (Figura 17). La Figura 18 resalta los herpesvirus encontrados más frecuentemente en los eventos de coinfección. La Figura 19 utiliza al paciente TR15 como ejemplo gráfico de los eventos de infección/coinfección.

Tabla 21. Eventos de coinfección.

Paciente	N° de eventos de coinfección	Días post-trasplante	Virus que coinfectan*
TR1	4	15	plVEB- leuHHV-7
		76	plVEB-plHHV-7
		90	plVEB-leuHHV-7
		265	leuVEB-leu/plHHV-7
TR5	2	88	plVEB-leuCMV
		123	plVEB-leuHHV-7
TR6	3	177	plVEB-plHHV-6
		205	plVEB-leuCMV
		241	leuCMV-plHHV-7
TR8	1	88	plVEB-plHHV-7
TR10	2	86	leu/plVEB-leuHHV-7
		317	plVEB-plHHV-7
TR13	1	29	leuVEB-leuHHV-6-leuHHV-7
TR15	3	76	plVEB-plHHV-7
		116	plHHV-6-plHHV-7
		188	plVEB-plHHV-6-leu/plHHV-7
TR17	2	118	leuVEB-leuHHV-7
		146	leuVEB-leuHHV-7
TH5	1	14	plVEB-leu/plHHV-6
TH7	4	69	leuVEB-leuHHV-7
		90	leuVEB-leuHHV-7
		118	leuVEB-leuHHV-7
		237	leuVEB-leuHHV-7

*"pl: plasma, leu: leucocitos.

Traslape de infecciones virales

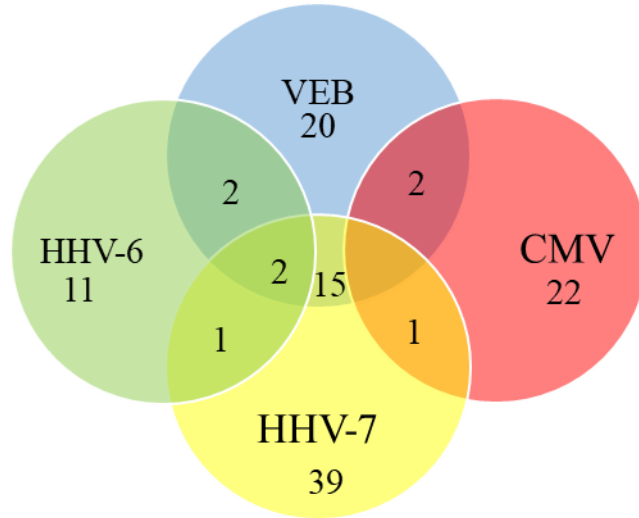


Figura 17. Eventos de infección individual y conjunta.

Diagrama de Venn que muestra el número de cargas virales positivas para cada uno de los herpesvirus de interés y el número de cargas virales positivas para más de un herpesvirus, señaladas en los puntos de traslape del diagrama, que corresponden a los distintos eventos de coinfección.

Eventos de Coinfección

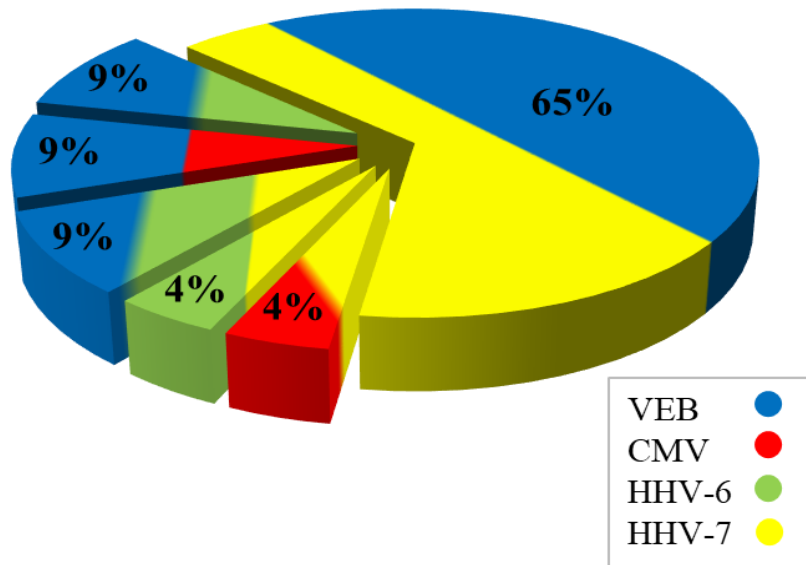


Figura 18. Proporción de los distintos eventos de coinfección, de acuerdo al tipo de herpesvirus.

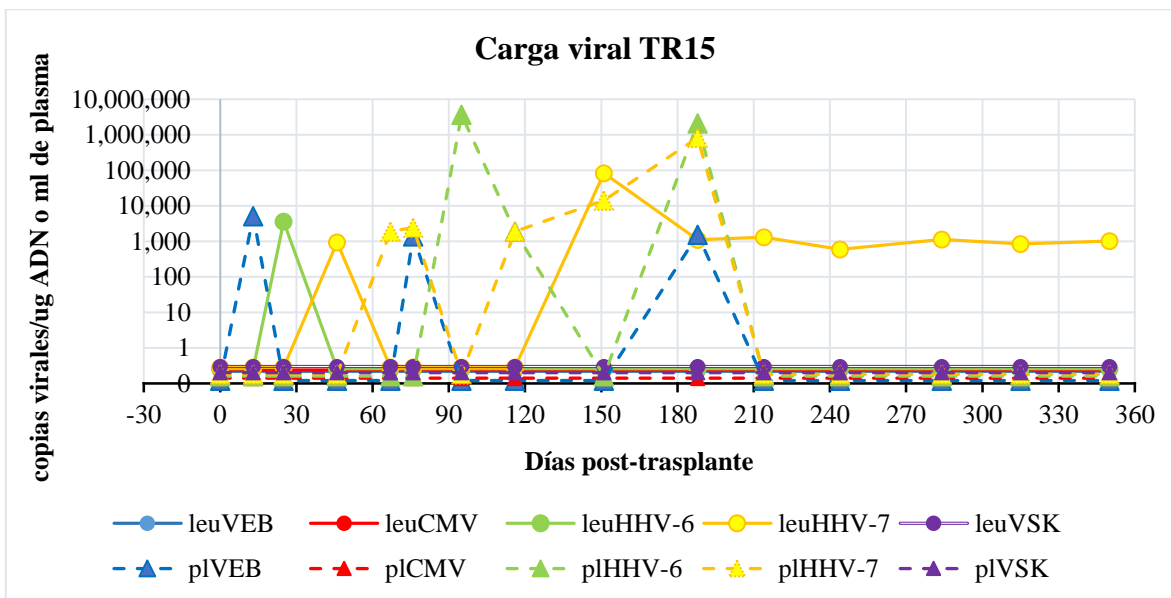


Figura 19. Gráfica de las cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR15.

Esta gráfica ejemplifica a los pacientes que presentaron eventos de coinfección, en este caso el paciente TR15 presentó tres eventos de coinfección en los días 76, 116 y 188 post-trasplante, entre los virus VEB-HHV-7, HHV-6-HHV-7 y una triple-infección entre el VEB, el HHV-6 y el HHV-7, respectivamente. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.

En la Figura 20 se grafica el universo muestral de este estudio, están representadas las 415 muestras analizadas de los 28 pacientes.

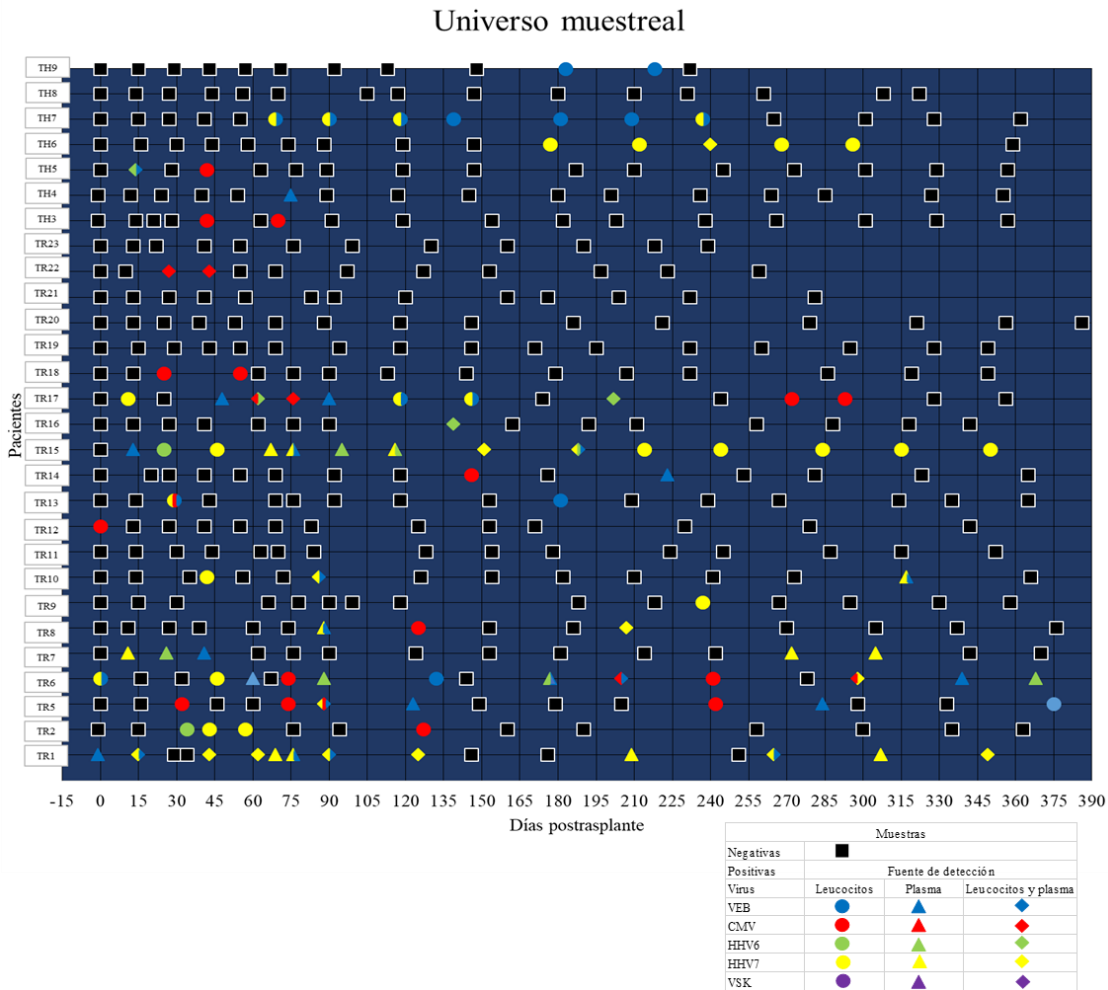


Figura 20. Gráfica del universo muestral.

En el eje de la “X” se grafican los días pos-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafican los pacientes analizados, el cuadrado representa las muestras que fueron negativas, el círculo las que fueron positivas detectadas en leucocitos, el triángulo las positivas detectadas en plasma y el rombo las positivas detectadas en ambas fuentes, ya sea para el mismo virus o para virus distintos; el color define que herpesvirus fue positivo en esa muestra. Los eventos de coinfección se representan con mezcla de colores de acuerdo a los tipos de virus que coinfectaron.

8.5. Asociación entre los niveles de infección viral y la dosis de inmunosupresión.

El factor más importante que determina la aparición de las infecciones ocasionadas por los herpesvirus de interés es la intensidad de la inmunosupresión, dada por la dosis y la farmacocinética del inmunosupresor de elección. A continuación se muestran las gráficas

que comparan las dosis de inmunosupresor (Tacrolimus) y las cargas virales de los seis pacientes seleccionados (Figura 21-26).

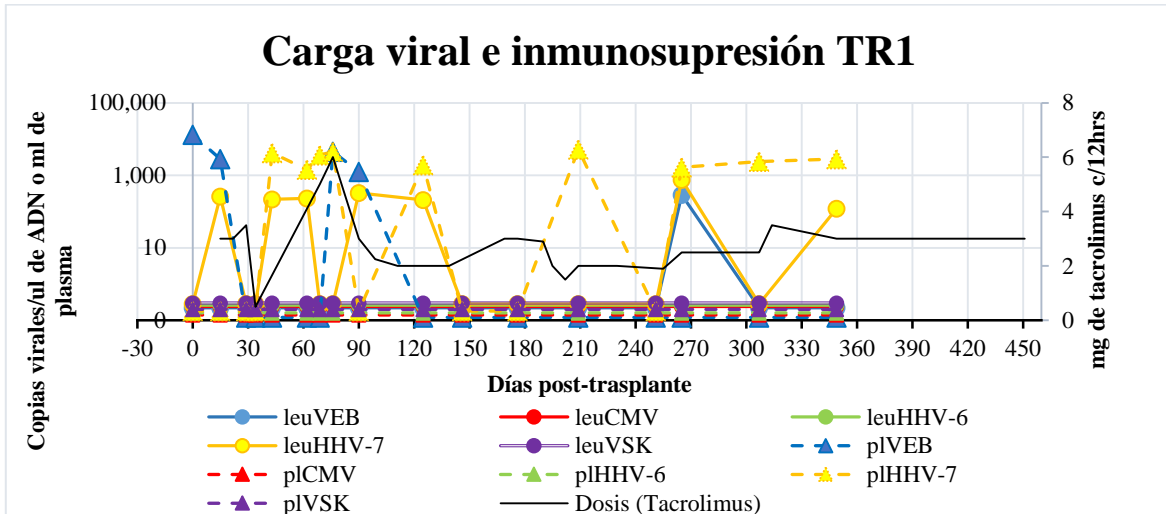


Figura 21. Cinética de las cargas virales en relación a la dosis de inmunosupresión del paciente TR1.

En el día 90 se observa un incremento del inmunosupresor (Tacrolimus) que correlaciona con el incremento de HHV-7 y VEB. Las cargas virales del HHV-7 se incrementan desde el día 30. Hasta que se incrementa VEB se observa una disminución posterior del inmunosupresor. Al día 307 se observa otro incremento de cargas virales tanto de VEB como de HHV-7 que no correlaciona con la cinética del inmunosupresor.

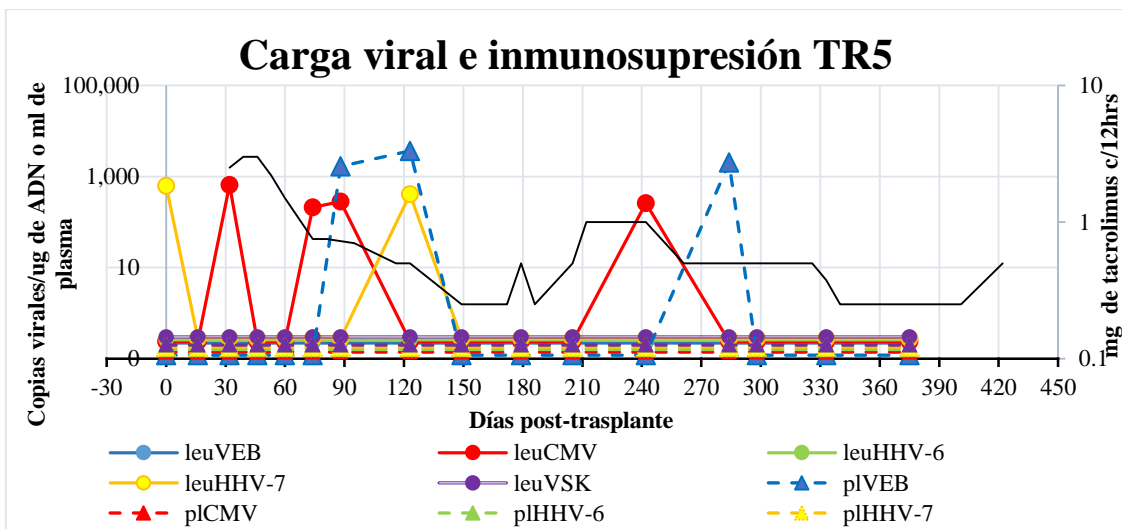


Figura 22. Cinética de las cargas virales en relación a la dosis de inmunosupresión del paciente TR5.

El primer pico de CMV al día 30 correlaciona con la dosis de inmunosupresor (Tacrolimus) más elevada, la cual se disminuye. Luego se distinguen dos periodos de elevación de las cargas virales principalmente el VEB y el CMV (entre los días 74 y 123, y entre los días 240 y 284) que correlacionan con una disminución posterior de las dosis de inmunosupresión.

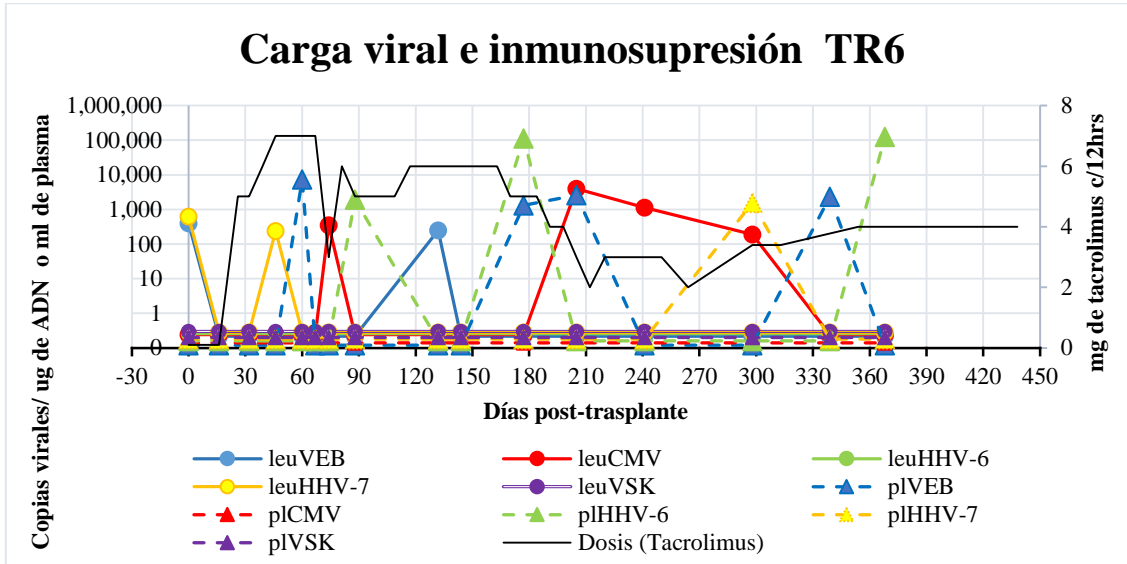


Figura 23. Cinética de las cargas virales en relación a la dosis de inmunosupresión del paciente TR6.

El incremento de la inmunosupresor (Tacrolimus), parece correlacionar con el aumento en las cargas virales de los cuatro herpesvirus analizados. Sin embargo, solo el incremento del VEB y el CMV parece correlacionar con una disminución posterior de la dosis de inmunosupresión.

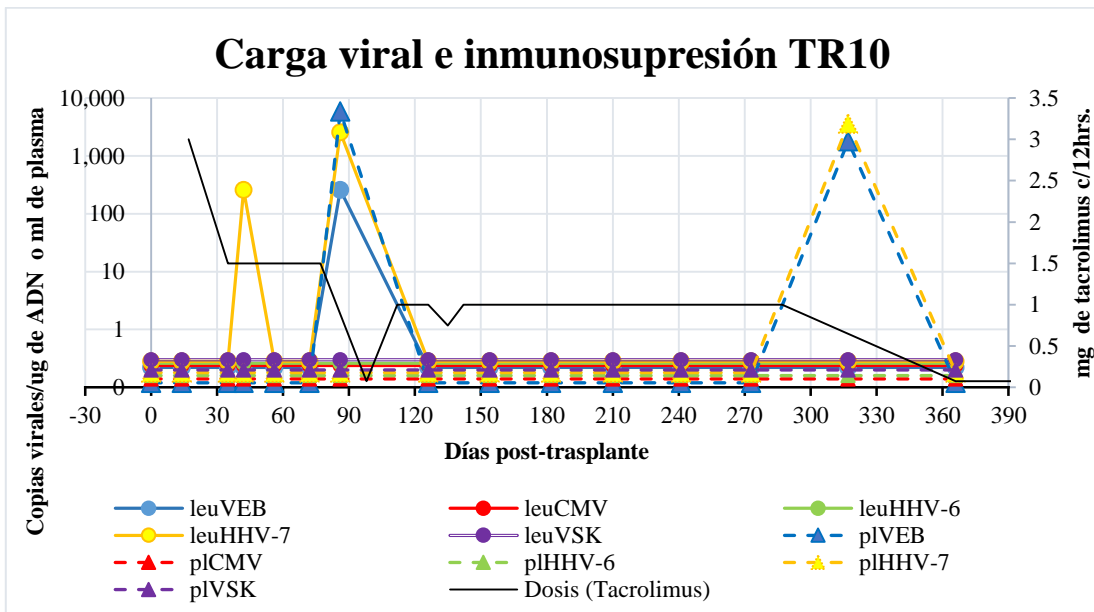


Figura 24. Cinética de las cargas virales en relación a la dosis de inmunosupresión del paciente TR10.

Se observan dos picos de coinfección que se correlaciona con una disminución en las dosis de inmunosupresor (Tacrolimus). Una observación importante en este paciente es que la disminución de la inmunosupresión ocurre

gradualmente e inicia antes de los picos de coinfección, siendo el HHV-7 el único herpesvirus positivo en los primeros días post-trasplante.

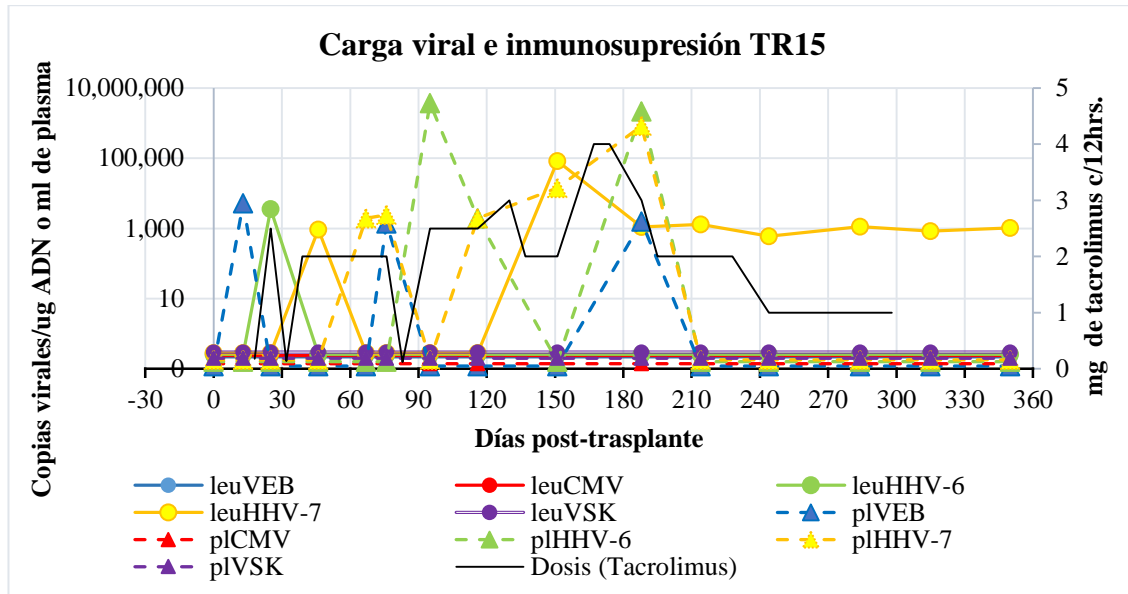


Figura 25. Cinética de las cargas virales en relación a la dosis de inmunosupresión del paciente TR15.

El incremento de las dosis del inmunosupresor (Tacrolimus) correlacionan con el aumento de las cargas virales. De manera casi proporcional con el HHV-7. Se observan cuatro caídas importantes en las dosis de inmunosupresión a los días 32, 83 y 195, que coinciden con el incremento previo del VEB, y al día 244 que coincide con cargas sostenidas del HHV-7.

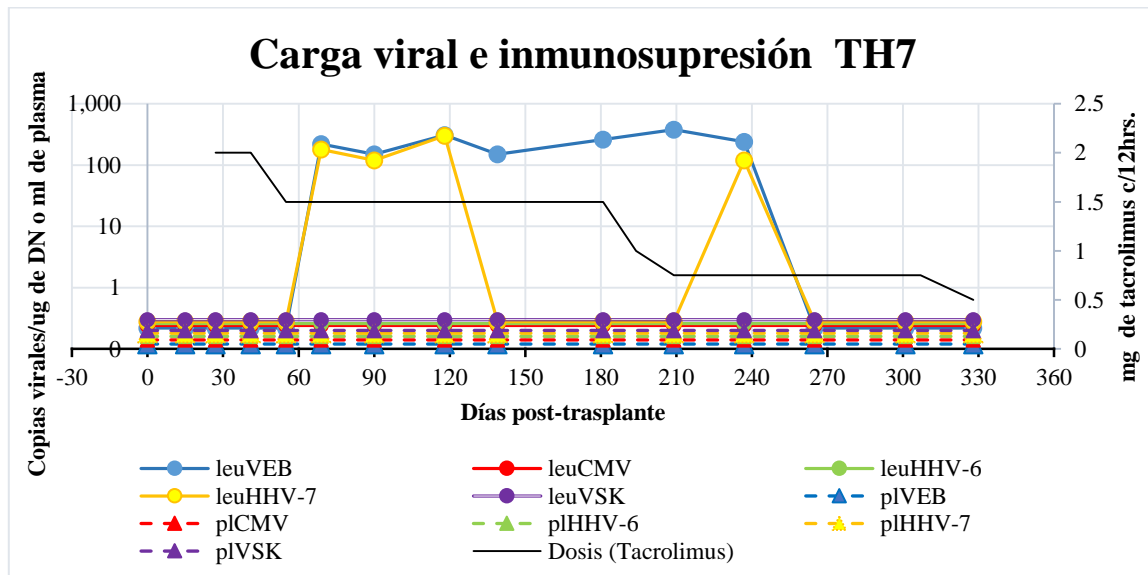


Figura 26. Cinética de las cargas virales en relación a la dosis de inmunosupresión del paciente TH7.

Cargas virales del VEB sostenidas aunque sean bajas, correlacionan con una disminución en la inmunosupresión (Tacrolimus).

De manera general, el incremento del inmunosupresor parece correlacionar con un aumento en las cargas virales de los herpesvirus analizados. Sin embargo, sólo el incremento del VEB y el CMV correlaciona con una consecuente disminución de la dosis de inmunosupresor. Para ejemplificar estos resultados, las cargas virales del paciente TR6 se dividieron en dos gráficas con virus específicos (Figura 27). Aunque en la mayoría de las cargas virales de estos pacientes hay coincidencia entre el incremento del HHV-6 y el HHV-7 y el aumento ya sea del VEB o el CMV, cuando esto no ocurre, los incrementos del HHV-6 y el HHV-7 no son seguidos por una disminución en la dosis de inmunosupresión. Los resultados de los pacientes TR5 y TR6 sugieren que la aparición consecutiva o en conjunto entre el VEB y el CMV coincide con una disminución en la inmunosupresión mucho más pronunciada que de manera individual (Figura 22 y 23). Sin embargo, se observó que la disminución del nivel del fármaco supresor en el paciente TR15, en el día 228 post-trasplante, no coincide con cargas ni para el VEB, ni para el CMV, pero si con cargas sostenidas del HHV-7. Una observación importante en cuatro de los cinco paciente analizados es que el HHV-7 ya sea de manera individual o en conjunto es el herpesvirus positivo en los primeros días post-trasplante precediendo el incremento de otros herpesvirus. Este análisis preliminar nos permite visualizar de manera general la relación entre carga viral e inmunosupresión farmacologica. Sin embargo, es necesario un análisis completo que nos arroje mayor evidencia y permita conclusiones mejor fundamentadas.

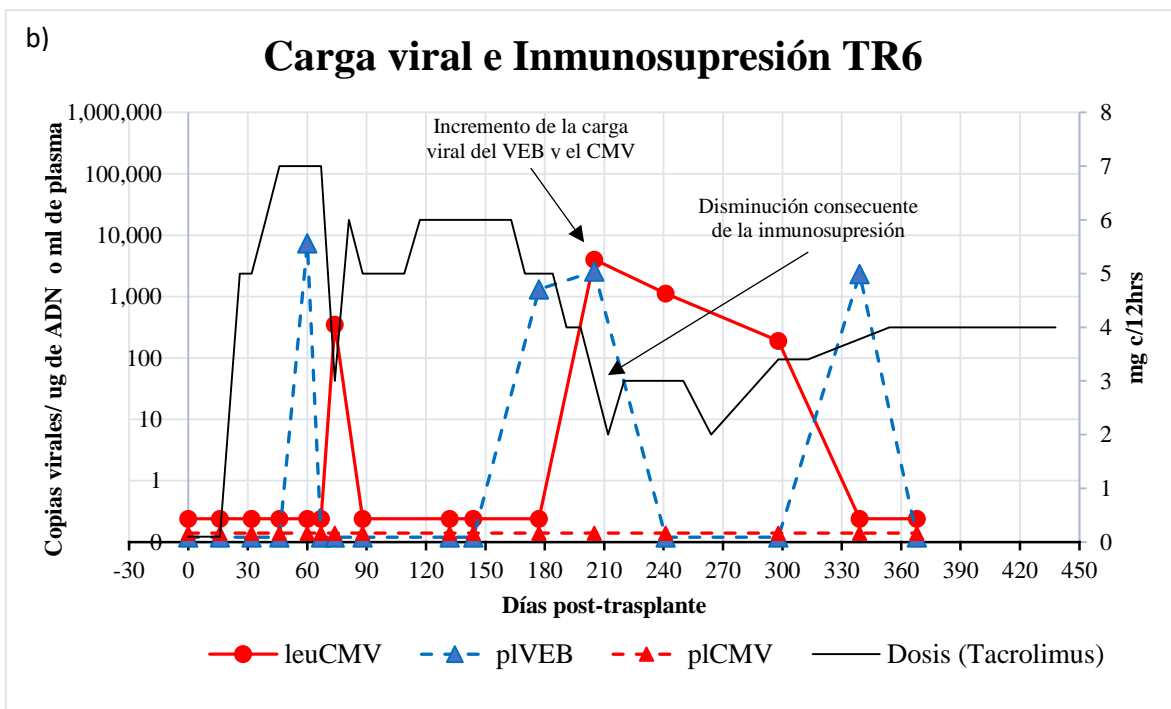
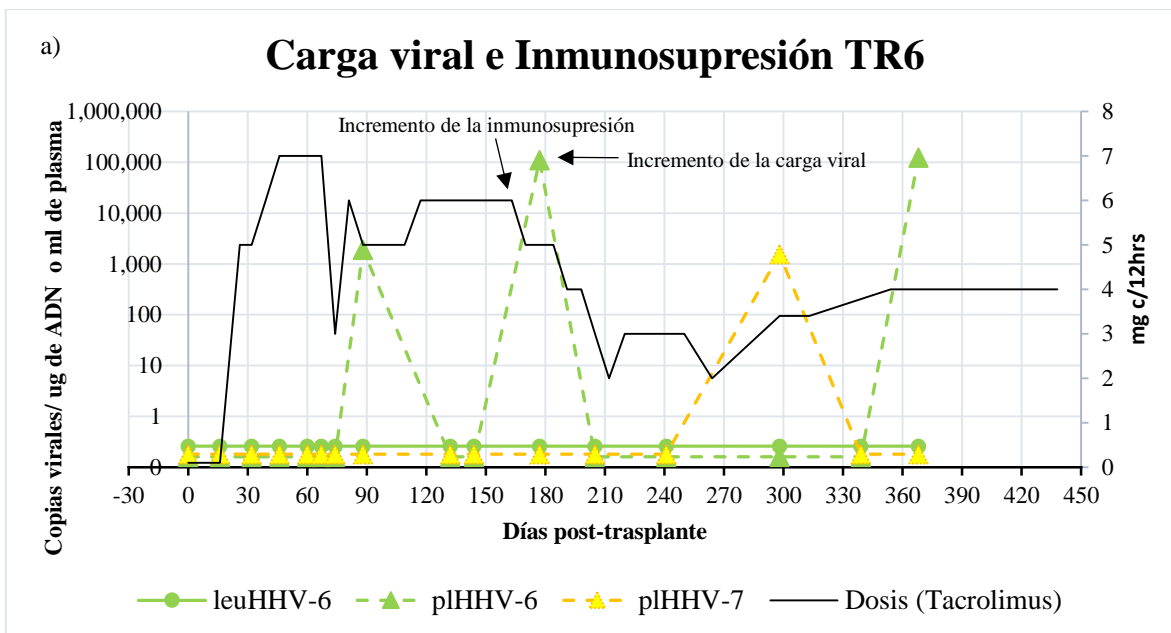


Figura 27. Cinética de las cargas virales en relación a la dosis de inmunosupresión del paciente TR6. Este paciente ejemplifica la correlación entre el incremento del inmunosupresor (Tacrolimus) y el incremento de las cargas virales (a) y la disminución en la inmunosupresión posterior al incremento de las cargas del VEB y el CMV (b).

8.6. Asociación entre los niveles de infección viral y episodios de rechazo.

El principal objetivo de las terapias de inmunosupresión es evitar el rechazo del órgano. Cuatro pacientes presentaron un episodio de rechazo, de un total de 18 sometidos a trasplante renal, de los cuales se logró conseguir este dato clínico. El 75% de los pacientes que presentaron episodios de rechazo mostraron una asociación entre dichos episodios y picos en las cargas virales de los herpesvirus positivos analizados en este trabajo. El 50% de los episodios de rechazo se asociaron a eventos de coinfección. El paciente TR1 presentó una asociación entre un episodio de rechazo y el incremento sostenido del HHV-7, el cual además se presentó en coinfección con el VEB (Figura 28). El paciente TR5 presentó un episodio de rechazo que coincide con un incremento del CMV (Figura 29). El paciente TR13 presentó un episodio de rechazo que coincide con una triple-infección entre el VEB, el HHV-6 y el HHV-7; este es el único paciente que presentó un evento de coinfección en leucocitos (Figura 30). Los episodios de rechazo ocurrieron dentro de los primeros dos meses post-trasplante en los pacientes TR5 Y TR13, ambos pacientes mostraron incremento de herpesvirus en leucocitos. Por su parte, en el paciente TR1 el episodio ocurrió en los primeros tres meses post-trasplante, coincidiendo con incrementos en plasma.

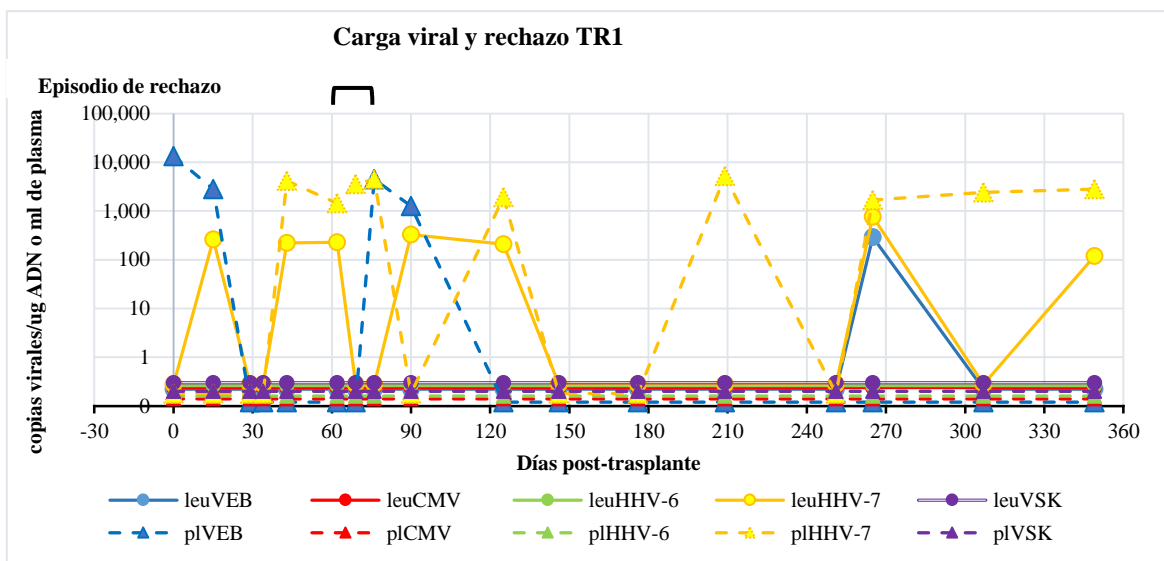


Figura 28. Cinética de las cargas virales y la asociación con episodios de rechazo del paciente TR1.

Este paciente presentó un episodio de rechazo dos meses después del trasplante entre el día 62 y 76 post-trasplante, señalado con un corchete horizontal. Dicho episodio coincide con cargas elevadas principalmente en el plasma del HHV-7 y el VEB. Encontrando incluso una co-infección entre ambos virus.

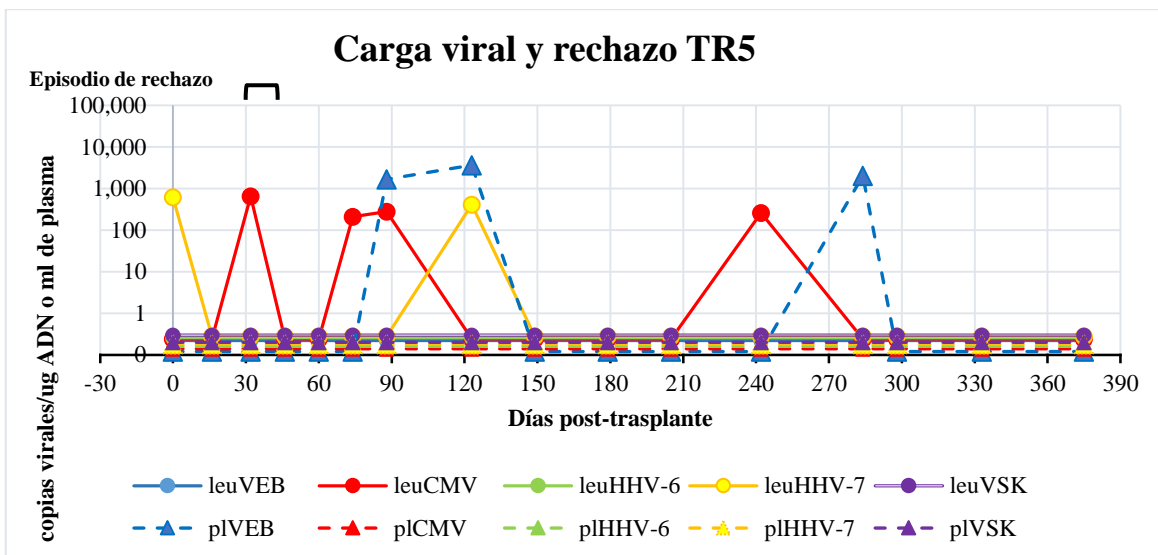


Figura 29. Cinética de las cargas virales y la asociación con episodios de rechazo del paciente TR5.

Este paciente presentó un episodio de rechazo un mes después del trasplante entre el día 32 y 46 post-trasplante, señalado con un corchete horizontal. Dicho episodio coincide con cargas elevadas del CMV en leucocitos.

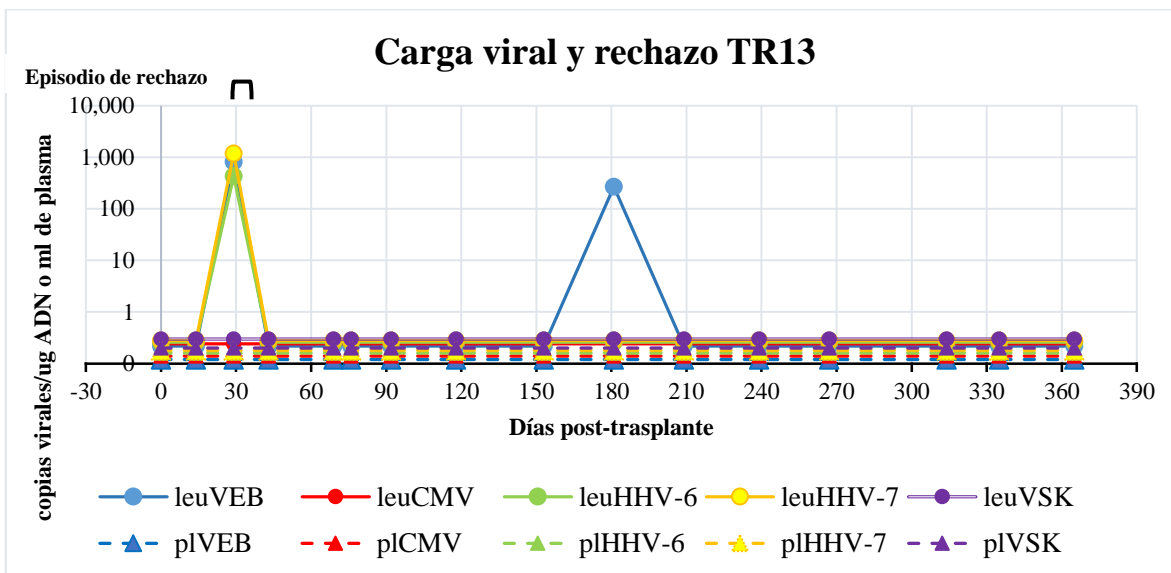


Figura 30. Cinética de las cargas virales y la asociación con episodios de rechazo del paciente TR13.

Este paciente presentó un episodio de rechazo un mes después del trasplante entre el día 29 y 43 post-trasplante, señalado con un corchete horizontal. Dicho episodio coincide con cargas elevadas de una triple-infección entre el VEB, el HHV-6 y el HHV-7 en leucocitos.

9. DISCUSIÓN

9.1. Pruebas de PCR multiplex en tiempo real para la detección simultánea de secuencias virales.

La mayoría de las técnicas multiplex hasta la fecha desarrolladas que detectan de manera simultánea, desde tres hasta los seis miembros de las subfamilias beta y gamma, son técnicas cualitativas, que utilizan una estrategia anidada ^[92-96]. Este tipo de estrategias pueden aumentar la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación y también puede complicar la automatización ^[87]. Además, estas técnicas sólo permiten conocer si el virus está o no presente en la muestra ensayada, sin que sea posible determinar el número de copias virales presentes, lo cual es altamente inconveniente en la determinación de virus que son muy prevalentes en la población. La detección cuantitativa de estos herpesvirus se ha asociado a algunos desordenes linfoproliferativos y a enfermedad por CMV, y ha sido fundamental en la prevención de rechazo al injerto. En pacientes inmunocomprometidos ha permitido un manejo más eficaz de terapias inmunosupresoras y antivirales ^[65, 104-110].

De acuerdo a lo anterior, las técnicas cuantitativas de PCR en tiempo real, en formato multiplex resultan una mejor opción para el monitoreo de herpesvirus beta y gamma. Las PCR multiplex en tiempo real que detectan de manera simultánea herpesvirus de las subfamilias beta y gamma, detectan solamente tres y dos herpesvirus humanos de interés ^[97, 98], dejando fuera otros herpesvirus que como ya mencionamos son de gran importancia, principalmente en el manejo de pacientes inmunocomprometidos. Por otro lado, esta metodología en la que se determina la presencia de genomas virales en células de la sangre, requiere una prueba adicional en la que se evalúe la calidad de la muestra en términos de integridad del ADN y de la presencia de inhibidores de la PCR, lo cual requiere mayor tiempo y costo de realización así como mayor cantidad de muestra biológica. Nuestra técnica además de los seis miembros de las dos subfamilias virales de interés, incluye un gen celular que sirve como control de integridad del ADN e inhibidores de la PCR.

Las técnicas ya desarrolladas reportan alta especificidad, la cual fue determinada solamente mediante ensayos de reactividad cruzada, con cepas estándar. Una de las PCR desarrolladas presentó reactividad cruzada entre el HVS1 y el HVS2^[98]. La especificidad de nuestra técnica se validó por varios ensayos: Análisis *in silico* utilizando el programa “BLAST”. Enzimas de restricción comprobando los tamaños clonados esperados. Perfil de fusión con un análisis

de disociación de curvas MELT, que comprobó la especificidad en un contexto de ADN celular humano de fondo. Secuenciación por el método Sanger. Ensayos de reactividad cruzada, utilizando a los mismos herpesvirus como cepas estándar. Todos estos ensayos demostraron que nuestra técnica presenta una alta especificidad, sin reactividad cruzada, lo que supera a las otras técnicas desarrolladas. En contraste con las otras técnicas capaces de detectar entre 2 a 4 copias virales nuestra técnica fue capaz de detectar hasta 5 copias virales. Sin embargo, la sensibilidad analítica determinada por el límite de detección fue de 18 a 25 copias virales por reacción.^[90] Sólo una de las técnicas desarrolladas reportó valores de eficiencia, confiabilidad predictiva y precisión que fueron altos y muy similares a los obtenidos por nuestra técnica, con eficiencias de entre 91 y 100%, confiabilidad predictiva del 99% y precisión de 95%. De acuerdo a la literatura, dependiendo del ADN templado utilizado para generar las curvas patrón de calibración, el rango dinámico debe cubrir al menos tres órdenes de magnitud e idealmente debería extenderse a cinco o seis concentraciones \log_{10} ^[90]. El rango dinámico en nuestra técnica abarca seis órdenes de magnitud, similar a los reportados por las técnicas desarrolladas.

Los resultados muestran que esta técnica multiplex fue tan sensible y específica como las simples, capaz de detectar hasta 5 copias virales. Es altamente precisa, eficiente, y confiable en la detección y cuantificación de copias virales. Gracias a esta técnica se logró reducir el tiempo de análisis de manera considerable, ya que en una sola corrida se puede detectar y cuantificar simultáneamente las cargas virales de cinco herpesvirus y al mismo tiempo es posible detectar un gen endógeno celular que sirve como control de la calidad del ADN de la muestra. Además, la cantidad de muestra y de reactivos necesarios para el análisis se disminuyeron, lo cual redujo los costos tanto económicos como biológicos, además de ahorro en tiempo y esfuerzo. Esto permitió resultados eficientes y rápidos que pueden contribuir en el diagnóstico oportuno de varias enfermedades asociadas a estos herpesvirus.

9.2. Comparación de las cargas virales entre leucocitos y plasma.

Un objetivo del presente estudio fue comparar las cargas virales de los herpesvirus de interés a partir de dos fracciones de la sangre, leucocitos y plasma, ya que la importancia de detectar estos herpesvirus en diferentes compartimentos sanguíneos es controversial. Los herpesvirus beta y gamma se distinguen por un ciclo de vida bifásico, con un ciclo latente principalmente

en células hematopoyéticas y un ciclo lítico principalmente en epitelio. Es por esto que se ha propuesto que cargas elevadas de estos virus asociadas a células sanguíneas son indicativas de un descontrol del ciclo latente, mientras que cargas elevadas en suero/plasma son indicativas de un descontrol de ciclo lítico. Los herpesvirus de la familia gamma (VEB y VSK) establecen infecciones persistentes infectando de forma latente principalmente a linfocitos B. Para el VEB se ha demostrado en estudios *in vitro* su capacidad de inmortalizar los linfocitos B infectados, permitiendo el establecimiento de líneas celulares linfoblastoides. Esta capacidad le confiere un gran potencial oncogénico, el VEB se considera el agente biológico carcinogénico más poderoso conocido [7, 8]. Para el VSK su capacidad de inmortalización/transformación es menos clara, pero su genoma también codifica varios oncogenes. Es por ello que ambos virus se asocian a varios tipos de linfomas incluyendo la ELPT y sarcomas. Como la ELPT está asociada a la fase latente viral, los leucocitos pudieran ser la mejor fuente para detectar y cuantificar las cargas virales de los herpesvirus gamma en los pacientes post-trasplantados. Es por esto que la detección del VEB se realiza principalmente en leucocitos o alternativamente en sangre total [61, 101, 104, 108, 111]. Por el contrario, cargas elevadas en suero/plasma pudieran ser indicativas de expansiones líticas/replicativas [112], que también pudieran estar asociadas a daño local o rechazo del órgano trasplantado, o que pudieran preceder a la ELPT.

En un análisis que se realizó en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea e hígado, se obtuvieron mayores rangos de detección del VEB en sangre total que plasma^[97]. En contraste, nuestros resultados muestran que el VEB presentó ligeramente un mayor rango de detección en plasma (5.5%) que en leucocitos (4.1%). Un estudio analizó la importancia clínica de detectar ADN del VEB en plasma y células mononucleares de sangre periférica de 402 pacientes con morbilidad asociada al VEB y 1395 sin asociación con este virus, se concluyó que el plasma es una mejor fuente de detección, pues su carga viral reflejó una mejor especificidad y sensibilidad con patologías asociadas al virus, que la carga asociada a leucocitos [112]. Al igual que este análisis existen otros que sugirieren la utilidad potencial de las muestras de plasma en la detección del VEB [106, 113, 114].

Los herpesvirus beta, se asocian principalmente a enfermedades y manifestaciones clínicas durante su ciclo lítico, y es por esto que es importante buscarlos en plasma o suero [61, 63, 98,

^{105, 109, 115]}. Sorprendentemente, nuestros resultados muestran que CMV fue mayormente detectado en leucocitos. Existe un reporte de rangos de detección mayores en sangre total que en plasma ^[97]. Para el CMV que es el herpesvirus beta más estudiado, también se han encontrado cargas virales elevadas asociadas a la ELPT. Cargas elevadas del CMV mayores en sangre total que en plasma estarían de acuerdo con esto porque serían un indicativo de la presencia del virus en ambos compartimentos, asociado a células y libre en plasma. Interesantemente, a pesar de la similitud biológica entre los tres herpesvirus beta, y más aún para los dos roseolovirus (6 y 7), su comportamiento en estos pacientes pediátricos post-trasplante fue muy diferente. El HHV-7 al igual que el CMV fue mayormente detectado en leucocitos, mientras que HHV-6 se detectó más en plasma. Desgraciadamente es poco lo que se sabe del HHV-6 y el HHV-7, de su ciclo de vida y de su comportamiento en individuos sanos o en morbilidad asociada, por lo que en estos momentos es difícil entender el significado del comportamiento observado. El VSK es endémico de países del mediterráneo y árabes. En Latinoamérica un estudio lo encontró altamente prevalente en Perú. De México no existen datos, pero nuestros resultados apuntan a que no es endémico en esta región, aunque esta conclusión debiera ser confirmada con estudios serológicos más sensibles ^[109, 116].

9.3. Asociación clínica de las cargas virales.

Como ya se señaló los herpesvirus son ubicuos, presentes en la mayor parte de la población, por lo que su presencia no significa necesariamente infección activa o que tenga relevancia clínica, pero en individuos inmunosuprimidos como en los paciente trasplantados, determinadas cargas virales pueden representar un alto riesgo de asociarse a patologías. Por lo tanto, es necesaria la medición de la carga viral y el establecimiento de umbrales clínicos que resulten relevantes para pronosticar o diagnosticar enfermedades asociadas. Los reportes sobre las cargas virales del VEB que resultan de relevancia clínica son diversas. Wada y colaboradores reportaron rangos de cargas desde 200 hasta 8.6 millones copias/ml en sangre total y de 250 a 75,000 copias/ml en plasma. En dicho estudio no proponen un umbral de carga viral de relevancia clínica, aunque si reportan una correlación entre el número de copias y sintomatología clínica asociada a una infección por el VEB ^[97]. Por su parte, Ono y colaboradores reportaron un rango de 1.4 a 81,000 copias/ μ g de ADN de células

mononucleares de sangre periférica, estableciendo un umbral arbitrario de 200 copias/ μ g de ADN, aunque no encontraron asociación entre cargas virales y rechazo celular agudo ^[61]. Las cargas virales elevadas del VEB en el presente estudio se distribuyeron con un rango, entre 150 y 830 copias/ μ g de ADN de leucocitos y de 1,260 a 260,100 copias/ml de plasma. Cargas virales en estos mismos rangos se asociaron a síntomas clínicos en el 83% de una cohorte de pacientes sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, en pacientes con mononucleosis infecciosa y con algunos desordenes linfoproliferativos de células T y NK. Se ha propuesto que 500 copias/ μ g de ADN es un umbral adecuado para distinguir una infección asintomática de una infección crónica activa con mayor riesgo de evolucionar a ELPT ^[101, 104, 117]. Existen otros reportes que sitúan el umbral clínico para el VEB en números, mucho mayores. Wadowsky y colaboradores categorizaron las cargas virales en cuatro grupos, el grupo I (<10 copias virales/ μ g de ADN) representa un valor indetectable o no confiable, similar a los valores observados en la infección latente en individuos inmunocompetentes; el grupo II (10-3,999 copias virales/ μ g de ADN) refleja valores mayores de los esperados en una infección latente normal, pero que no necesariamente se asocia con sintomatología clínica en pacientes trasplantados; el grupo III (4,000-29,999 copias virales/ μ g de ADN) y IV (\geq 30,000 copias virales/ μ g), son valores que se consideran altamente y extremadamente elevados, respectivamente, y los grupos que presentan estas cargas virales se han asociado con un mayor riesgo de tener o desarrollar una infección por el VEB sintomática o ELPT ^[108]. De acuerdo con estos reportes el valor predictivo de la carga del VEB en el trasplante de órganos sólidos es por lo tanto controversial y poco claro, algunos pacientes de trasplante tienen “altas” cargas del VEB y permanecen estables durante meses o años sin desarrollar ELPT. Es por esto el énfasis en nuestro estudio, de evaluar eventos de coinfección con otros herpesvirus similares que pudieran estar sinergizando el efecto patogénico del VEB o el CMV.

Los rangos que obtuvimos de cargas virales para el CMV se distribuyeron entre 190- 4120 copias virales/ μ g de ADN de leucocitos y 260-18,120 copias virales/ml de plasma. Zipeto y colaboradores analizaron una cohorte de pacientes inmunodeficientes positivos al VIH, encontrando diferencias significativas en las cargas virales de aquellos que desarrollaron enfermedad por CMV de los que no, tanto en leucocitos como en plasma, con una mediana

de 23,647 copias por ml de sangre y 1,253 copias por ml de plasma respectivamente ^[109]. Esto contrasta con nuestros resultados, ya que sus cargas virales fueron mayores en leucocitos que en plasma y sus medianas mayores que las nuestras. Probablemente, estos valores nos permiten un acercamiento inicial sobre los valores de cargas virales en pacientes inmunodeficientes, pero no son exactamente comparables a nuestro modelo de estudio, ni sabemos cómo el valor de sangre total refleja la sumatoria de leucocitos y plasma.

Respecto a trasplante de órgano sólido, algunos estudios reportan cargas similares a las nuestras pero no reportan asociaciones clínicas ^[61]. Sin embargo, en un estudio de pacientes sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas que desarrollaron enfermedad por CMV, encontraron una mediana de 1,700 copias/ml de plasma (rango 50 a 5.5×10^7), mientras que los individuos sanos control presentaron una mediana de 50 copias/ml de plasma (rango, 50-350) ^[105]. En comparación con este estudio nuestra mediana en las muestras positivas fue mayor (2,040 copias/ml de plasma). Sin embargo, el rango de las cargas encontradas es considerablemente mayor al de nuestro estudio y los resultados no pueden extrapolarse a nuestro trabajo, ya que las condiciones biológicas de un trasplante de órgano sólido son diferentes. Además, los rangos de cargas virales se traslaparon en dicho estudio, observándose altos valores de copias en algunos pacientes sin enfermedad y de bajos en algunos pacientes con enfermedad por CMV, tanto en los pacientes inmunodeficientes positivos al VIH como en los sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, lo que dificulta el establecimiento de umbrales. Es por esto que es importante la búsqueda de cofactores en el desarrollo de enfermedad asociada a los herpesvirus, por ejemplo las coinfecciones entre varios miembros de esta familia.

Las medianas obtenidas para el HHV-6 en nuestro trabajo fueron de 655 copias/ μ g de ADN (rango, 260-7,170) en leucocitos y 88,020 copias/ml de plasma (rango, 1,920- 3.7×10^6). Este herpesvirus fue el que presentó cargas virales más elevadas, particularmente en plasma. En pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido hay dos reportes que incluye al HHV-6, uno reporta cargas virales de 220 a 380,000 copias/ml de sangre y 200-85,000 copias/ml de plasma ^[97]; y el otro de 1.4 a 28,000 copias/ml de plasma ^[61]. Estos rangos están 3 log (10) debajo de los encontrados en este estudio. Dado que no hay asociaciones clínicas en estos reportes solo podemos concluir que nuestros pacientes presentan cargas virales en plasma

mayores que otros pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido. En trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas se observó una asociación entre la detección de más de 1000 copias/millón de leucocitos del HHV-6, con la aparición de al menos un síntoma clínico (fiebre aislada, erupción cutánea o neumonitis) o evento biológico (anemia, leucopenia o trombocitopenia) principalmente mielo-supresión parcial. Por otra parte, una carga media de 7,971 copias/millón de leucocitos (rango, 1,974–19,149) se asoció con una severa enfermedad de injerto contra huésped ^[110]. Un análisis del HHV-6 en individuos con sospecha de encefalitis reveló una viremia con una mediana de 18,041 copias/ml de plasma (rango, 40-100,000). En contraste, un grupo control de individuos sanos resultaron negativos al HHV-6 ^[98].

El HHV-7 presentó medianas de 340 copias/μg de ADN (rango 120-82,470) de leucocitos y 2,640 copias/ml de plasma (rango 1,320-830,000). En pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido reportaron cargas virales mayores a 1000 copias/ml de sangre total e intentaron correlacionarlas con rechazo agudo y el desarrollo de la enfermedad por CMV, sin embargo no encontraron correlación ^[118]. En un estudio en pacientes sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas se encontraron cargas con una mediana de 541 copias/millón de leucocitos (rango, 53-11,370), sin encontrar asociaciones clínicas a estas cargas ^[110]. En otro estudio en donde se analizó la asociación de los herpesvirus beta con la enfermedad por CMV se propuso que cargas virales mayores a 35,000 copias/μg de ADN pueden predecir la ocurrencia de la enfermedad por CMV ^[65]. La escasa literatura sobre asociaciones clínicas y carga del HHV-7 no permite predecir el significado clínico de los datos arrojados en nuestro estudio para este herpesvirus. De manera general, la mayoría de nuestras cargas virales se encuentran en los rangos reportados, en los cuales no se encontraron asociaciones clínicas. De particular importancia son los pacientes con cargas superiores a 35,000 copias/μg de ADN. De interés también sería estudiar las cargas virales de portadores sanos y que pudiera explicar biológicamente las cargas virales tan elevadas de este virus sin que exista una aparente morbilidad.

En la actualidad no se cuenta con un consenso general acerca de cuáles son las cargas virales que deben considerarse de relevancia clínica para los herpesvirus de la familia beta y gamma.

Para el VEB y el CMV, que son los herpesvirus que se monitorean en pacientes inmunocomprometidos, hay algunos reportes al respecto. La literatura es muy heterogénea en varios aspectos, como en el tipo de muestra utilizada, existen reportes de medición de las cargas virales en plasma, en suero, en células mononucleares, en leucocitos o en sangre total. La manera en la que se reporta la carga viral también es heterogénea, puede ser en copias virales por μg de ADN, por ml de sangre total o de suero/plasma o por número de células. Esto pudiera explicar que los umbrales clínicos en los que se observan asociaciones clínicas sean tan variables, pudiendo ir desde 200 copias/ μg de ADN hasta 1400 copias/ μg de ADN, con varios reportes que señalan valores intermedios, y que son justificados por las asociaciones clínicas observadas. Estas diferencias en los valores de cargas virales de importancia clínica entre los laboratorios podrían ser el resultado de la heterogeneidad entre los procedimientos de manejo de muestras y protocolos de cuantificación. Por lo que resulta urgente homogeneizar criterios y establecer umbrales que permitan la comparación de resultados. El determinar los valores umbrales de importancia clínica para los cuatro herpesvirus positivos en este trabajo dependerá de las asociaciones a patologías o síntomas clínicos que encontremos, por lo tanto es necesario y muy importante realizar un análisis propio de asociación clínica.

9.4. Cargas virales positivas sostenidas en el tiempo de manera consecutiva.

En el monitoreo del VEB y el CMV se consideran importantes dos episodios consecutivos con carga elevada para iniciar tratamientos antagónicos ^[119-121]. En esta cohorte de pacientes pertenecientes al HIMFG, se monitorean de rutina al VEB y al CMV. Por lo que esperaríamos que el HHV-6 y el HHV-7 que no se vigilan, y que por lo tanto los pacientes trasplantados no tienen intervenciones médicas en función de sus cargas virales, mostrarán las cargas virales más elevadas y continuas. El primer argumento si se cumple, el HHV-6 presenta la mediana de cargas virales más elevada, seguida del HHV-7, el CMV y el VEB. Sin embargo, el segundo criterio solo se cumple para el HHV-7, el cual se mostró positivo en un mayor número de muestras consecutivas, seguido por el VEB. En pacientes pediátricos sometidos a trasplante hepático y primo infectados por el VEB debido al trasplante, se reportó una asociación entre cargas virales sostenidas del VEB con una infección crónica ^[122]. Cargas virales sostenidas del CMV se han asociado con un mayor riesgo de retinitis por este virus

[123]. Por su parte, el HHV-6 fue el único de los herpesvirus positivos analizados en este trabajo, que no mostró cargas sostenidas, lo que pudiera deberse a una asociación con rechazo al injerto o algún otro síntoma clínico, que este propiciando que el médico varíe la dosis del inmunosupresor. El HHV-6 fue el herpesvirus menos encontrado, al detectarse solo en 13 muestras, sin embargo, el hecho de que el HHV-7 si se observe en infecciones sostenidas y el HHV-6 se eleve en picos aislados ya se había reportado en otro estudio [118], por lo que podría representar el comportamiento biológico de estos herpesvirus.

9.5. Eventos de coinfección.

En este trabajo encontramos veintitrés eventos de coinfección predominando principalmente la coinfección dual entre el VEB y el HHV-7. También encontramos coinfecciones entre VEB-CMV, VEB-HHV-6, CMV-HHV-7 y HHV-6-HHV-7. Nuestros resultados sugieren que los procesos de activación viral compartidos entre los 5 herpesvirus analizados son relativamente comunes. Se ha reportado que el HHV-7 es capaz de reactivar al VEB e inducir una enfermedad similar a la mononucleosis infecciosa [124]. Asimismo, la infección doble activa por el VEB y el HHV-6 se asocia al síndrome agudo de mononucleosis infecciosa [125] y a un mayor riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes [126]. Se ha encontrado que el HHV-6 y el HHV-7 promueven la replicación del CMV llevando al desarrollo de la enfermedad por citomegalovirus [62-65]. La coinfección entre el VEB y el CMV se asocia al incremento en el riesgo de contraer infecciones múltiples de virus respiratorios, en la severidad de síntomas clínicos y en la duración de la estancia hospitalaria [59]. Estos reportes sugieren que la cooperación viral entre estos herpesvirus tiene implicaciones clínicas importantes, que podrían estar ocurriendo en los diez pacientes que de acuerdo a nuestros resultados presentaron eventos de coinfección. Sin embargo es necesario un análisis que nos permita concluir la relevancia clínica de estas coinfecciones. Estos datos también resaltan la importancia del diagnóstico simultáneo de los herpesvirus beta y gamma en un espectro de enfermedades mayor al de nuestra cohorte de estudios y que abarca otros tipos de inmunosupresión/inmunodeficiencias, pero también en individuos inmunocompetentes.

9.6. Asociación de los niveles de infección viral con la dosis de inmunosupresor.

La disminución de las dosis de inmunosupresor posterior a un incremento de las cargas virales de VEB y CMV, se explica debido a que estos dos herpesvirus son monitoreados rutinariamente en los pacientes post-trasplantados en el HIMFG, lo que le permite al médico un mejor control en el manejo de las dosis del inmunosupresor. El HHV-6 y el HHV-7 no son monitoreados de manera rutinaria. Por lo cual, el incremento de sus cargas virales no son sucedidas por disminución de la inmunosupresión. Estos resultados sugieren que no existe una clara asociación clínica entre el incremento de estos dos herpesvirus que llevara al médico a disminuir la inmunosupresión. La aparición consecutiva o en conjunto entre el VEB y el CMV coincide con una disminución en la inmunosupresión mucho más pronunciada, lo que podría sugerir que en conjunto estos herpesvirus exacerbaban sus efectos patogenicos. Ocasionando medidas drásticas en las terapias de inmunosupresión. También se observó que la disminución de la inmunosupresión coincide con cargas sostenidas del HHV-7, lo que nos permite especular que existe una asociación clínica cuando estos herpesvirus se sostiene temporalmente. Sin embargo, la evidencia es insuficiente, es necesario un análisis más exhaustivo que incluya a todos los pacientes.

9.7. Asociación de los niveles de infección viral con episodios de rechazo.

Nuestros resultados mostraron una asociación entre los episodios de rechazo renal y el incremento de cargas virales de algunos de los herpesvirus de interés. Los herpesvirus que incrementaron sus cargas fueron el CMV de forma individual, HHV-7 de forma tanto individual como en conjunto con el VEB y el HHV-6, en doble y triple infección.

La asociación encontrada entre el CMV y el rechazo renal en este trabajo es respaldada por la literatura. Se sabe que el CMV es el herpesvirus mayormente asociado a rechazo, varios estudios lo proponen como un factor que incrementa el riesgo de rechazo al injerto tanto agudo como crónico en pacientes de trasplante renal. La relación entre rechazo y el CMV parece ser bidireccional de forma que el CMV puede desencadenar rechazo y la inflamación causada por el rechazo puede aumentar la replicación viral [22, 24, 25, 82].

Se sugiere que la reactivación del VEB puede estar involucrada en la patogénesis de la lesión tardía del injerto renal. Se ha reportado asociación entre dicha reactivación y episodios de rechazo renal. Aunque se propone que probablemente no sea el VEB quien induce el rechazo,

sino que debido al rechazo se incrementa la inmunosupresión, lo que permite la reactivación viral. Esto debido a que en la mayoría de los casos de asociación VEB/rechazo, el rechazo precedió a la reactivación. No obstante, también hubo casos donde la reactivación del VEB precedió el episodio de rechazo ^[127]. Por lo anterior, es posible que exista una relación bidireccional como ocurre con el CMV, aunque no hay reportes que sustenten esto. La infección del HHV-6 puede estar relacionada con rechazo. Aunque, también hay reportes en donde no se observó correlación entre la infección de HHV-6 y rechazo renal agudo ^[38-41]. Por su parte HHV-7 se propone que puede potencialmente exacerbar el rechazo del injerto renal ^[128]. Estos reportes de asociación entre la infección individual del VEB, el HHV-6 y el HHV-7 con episodios de rechazo renal son controversiales y poco contundentes. Nuestros resultados apuntan a que existe una asociación entre estos tres herpesvirus y episodios de rechazo renal, pero en un contexto de coinfección. Esto, debido a que en ambos episodios de rechazo, en los que se asocian estos tres herpesvirus ocurrió coinfección. Lo cual, apoyaría la propuesta de que estos herpesvirus pueden exacerbar sus propios efectos, incluyendo su asociación con el rechazo renal. Estas características de infección tanto individual como en conjunto no son el único factor que se asocia a los episodios de rechazo observados, pues hay pacientes con cinéticas de las cargas virales similares que no presentaron episodios de rechazo.

10. CONCLUSIONES

En conclusión se estandarizó una técnica de PCR multiplex en tiempo real que permite la detección y cuantificación simultánea de los herpesvirus de las subfamilias beta y gamma (HHV-4 a HHV-8). Se demostró que la técnica fue específica, con alta sensibilidad analítica, confiable, eficiente, precisa y con amplio rango dinámico. Similar a las técnicas de PCR tiempo real simples. Las más de 100 curvas patrón realizadas y utilizadas como control para la cuantificación y detección de las cargas virales en nuestro modelo de estudio, mantuvieron confiabilidades y eficiencias próximas al 100%, lo que indicó que la técnica de PCR multiplex mantuvo los parámetros establecidos en un modelo aplicado, resultando funcional y eficiente.

Esta técnica fue probada en una cohorte de pacientes pediátricos sometidos a trasplante hepático y renal. Se observó un alto índice de infección de los herpesvirus analizados en los

pacientes post-trasplantados, ya que el 79% (22 pacientes) resultó positivo al menos a uno de los herpesvirus analizados. De estos pacientes el 54% (12 pacientes) presentó muestras consecutivas cuyas cargas virales se mantuvieron positivas para el mismo herpesvirus; y el 45% (10 pacientes) presentó cargas virales a más de un herpesvirus.

El HHV-7 fue el herpesvirus más frecuentemente encontrado y el que mantuvo el rango más amplio de cargas virales sostenidas, y en conjunto con VEB el de mayor frecuencia en los eventos de coinfección viral. El HHV-6 fue el herpesvirus que alcanzó los valores de carga viral más altos, (3.7 millones de copias por ml de plasma). El VSK no fue detectado en este estudio, sugiriendo una baja prevalencia en nuestra población. Al parecer sería importante incluir al HHV-6 y HHV-7 en el monitoreo rutinario de los pacientes pediátricos post-trasplante del HIMFG, aunque hace falta realizar un análisis de asociación clínica. En estos pacientes el VEB y el HHV-6 son principalmente líticos mientras que CMV y HHV-7 son principalmente latentes, ya que fueron mayormente detectados en plasma y leucocitos respectivamente. El rango de distribución de los valores de las cargas virales fue muy amplio observando que fueron mayores en plasma. Se deben monitorear los herpesvirus de interés en ambas fracciones sanguíneas.

El incremento del inmunosupresor parece correlacionar con un aumento en las cargas virales de los cuatro herpesvirus analizados. Sin embargo, sólo el incremento del VEB y el CMV correlaciona con una consecuente disminución de la dosis de inmunosupresor. Existe una asociación entre el incremento de carga viral de los herpesvirus positivos y episodios de rechazo. Principalmente en un contexto de coinfección.

10.1. Limitantes de estudio y perspectivas.

La asociación de nuestros resultados a patologías y síntomas clínicos es de vital importancia. Los datos clínicos permitirán conclusiones más firmes sobre el papel patogénico de las cargas virales observadas, en un punto o sostenidas, de un solo virus o de varios de ellos y sobre la relevancia de la activación del HHV-6 y el HHV-7 en la morbilidad de los pacientes post-trasplante inmunocomprometidos farmacológicamente. Igualmente, los expedientes de los pacientes permitirán conocer si han sido sometidos a intervenciones médicas que expliquen las variaciones encontradas entre tomas consecutivas o entre pacientes.

11. LITERATURA CITADA

1. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields virology*. 2007, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
2. Bascones-Martínez, A. and X. Pousa-Castro, *Herpesvirus*. Avances en Odontoestomatología, 2011. **27**: p. 11-24.
3. Roizman, B., *The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11307-12.
4. Jha, H.C., Y. Pei, and E.S. Robertson, *Epstein-Barr Virus: Diseases Linked to Infection and Transformation*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 1602.
5. HENLE, G., et al., *Antibodies to Epstein-Barr Virus in Burkitt's Lymphoma and Control Groups*. Natl Cancer Inst., 1969. **43**: p. 1147-1157.
6. Henle, G., W. Henle, and V. Diehl, *Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-ypse virus to infectious mononucleosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1968. **59**(1): p. 94-101.
7. *Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8. Lyon, France, 17-24 June 1997*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1997. **70**: p. 1-492.
8. Pope, J.H., M.K. Horne, and W. Scot, *Transformation of foetal human leukocytes invitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus*. Int. J. Cancer, 1968. **3**: p. 857-866.
9. Neparidze, N. and J. Lacy, *Malignancies Associated With Epstein-Barr Virus: Pathobiology, Clinical Features, and Evolving Treatments*. Vol. 12. 2014. 358-371.
10. Kang, M.-S. and E. Kieff, *Epstein-Barr virus latent genes*. Experimental & Molecular Medicine, 2015. **47**: p. e131.
11. Defelitto R. Jorge, M.C., F. Mattera, E. de Santibáñes y D. Surur., *Trasplante de órganos, in Cirugía, bases clínicas y terapéuticas*. , A.H.C. Defelitto R. Jorge, Editor. 2013, Servicio de Difusión de la Creación Intelectual (SEDICI): Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de la Plata. Argentina. p. 411-461.
12. Yuste, J.R., et al., *[The most common infections in the transplanted patient]*. An Sist Sanit Navar, 2006. **29 Suppl 2**: p. 175-205.
13. Varela F. G., R.P.D., A. P. Hernández, P. M. Castañeda, V. G. Fuentes, J.Z. Nieto., *Trasplante hepático en niños*. Investigación Clínica, 2005. **57**(2): p. 273-282.
14. Hecker, M., et al., *Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors*. Vox Sang, 2004. **86**(1): p. 41-4.
15. Michaelis, M., H.W. Doerr, and J. Cinatl, *The Story of Human Cytomegalovirus and Cancer: Increasing Evidence and Open Questions*. Neoplasia (New York, N.Y.), 2009. **11**(1): p. 1-9.
16. Cinatl, J., et al., *Molecular mechanisms of the modulatory effects of HCMV infection in tumor cell biology*. Trends Mol Med, 2004. **10**(1): p. 19-23.
17. Reeves, M.B., et al., *An in vitro model for the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation in dendritic cells by chromatin remodelling*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 11): p. 2949-54.
18. Reinke, P., et al., *Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients*. Transplant Infectious Disease, 1999. **1**(3): p. 157-164.
19. Sinclair, J., *Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage*. J Clin Virol, 2008. **41**(3): p. 180-5.
20. Cinatl, J., Jr., et al., *Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cells*. Intervirology, 1996. **39**(4): p. 259-69.

21. Cinatl, J., Jr., et al., *Oncomodulatory signals by regulatory proteins encoded by human cytomegalovirus: a novel role for viral infection in tumor progression*. FEMS Microbiol Rev, 2004. **28**(1): p. 59-77.
22. Fishman, J.A., *Infection in Organ Transplantation*. Am J Transplant, 2017. **17**(4): p. 856-879.
23. Razonable, R.R., A. Humar, and A.S.T.I.D.C.o.P. the, *Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation*. American Journal of Transplantation, 2013. **13**(s4): p. 93-106.
24. Aumente, M.D., *Trasplantes*, in *Farmacía Hospitalaria* M.C.G. Planas, Editor. 2002, Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria: Madrid, España. p. 1563-1600.
25. Sánchez F. Al. , P.D., *Rechazo y otras complicaciones*. Clínicas Urológicas de la Complutense, 1999. **7**: p. 435-462.
26. Ljungman, P., P. Griffiths, and C. Paya, *Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients*. Clinical Infectious Diseases, 2002. **34**(8): p. 1094-1097.
27. Helanterä, I., I. Lautenschlager, and P. Koskinen, *The risk of cytomegalovirus recurrence after kidney transplantation*. Transpl Int, 2011. **24**(12): p. 1170-8.
28. Humar, A., et al., *An Assessment of Herpesvirus Co-infections in Patients with CMV Disease: Correlation with Clinical and Virologic Outcomes*. American Journal of Transplantation, 2009. **9**(2): p. 374-381.
29. Okuno, T., et al., *Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults*. J Clin Microbiol, 1989. **27**(4): p. 651-3.
30. Zerr, D.M., et al., *A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection*. N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 768-76.
31. Flamand, L., et al., *Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation*. Blood, 1995. **85**(5): p. 1263-71.
32. Ogata, M., *Human herpesvirus 6 in hematological malignancies*. J Clin Exp Hematop, 2009. **49**(2): p. 57-67.
33. Kondo, K., et al., *Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages*. J Gen Virol, 1991. **72** (Pt 6): p. 1401-8.
34. Luppi, M., et al., *Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo*. J Virol, 1999. **73**(1): p. 754-9.
35. Braun, D.K., G. Dominguez, and P.E. Pellett, *Human herpesvirus 6*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(3): p. 521-67.
36. Yadav, M., et al., *Human herpesvirus-6 (HHV-6) DNA and virus-encoded antigen in oral lesions*. J Oral Pathol Med, 1997. **26**(9): p. 393-401.
37. Mullins, T.B. and K. Krishnamurthy, *Roseola Infantum*, in *StatPearls*. 2017: Treasure Island (FL).
38. Singh, N., *Infections in solid organ transplant recipients*. Curr Opin Infect Dis, 2000. **13**(4): p. 343-347.
39. Acott, P.D., et al., *Infection concomitant with pediatric renal allograft rejection*. Transplantation, 1996. **62**(5): p. 689-91.
40. OKUNO, T., et al., *HUMAN HERPESVIRUS 6 INFECTION IN RENAL TRANSPLANTATION*. Transplantation, 1990. **49**(3): p. 519-522.
41. Yoshikawa, T., et al., *A prospective study of human herpesvirus-6 infection in renal transplantation*. Transplantation, 1992. **54**(5): p. 879-83.
42. Black, J.B. and P.E. Pellett, *Human herpesvirus 7*. Rev Med Virol, 1999. **9**(4): p. 245-62.
43. Wyatt, L.S. and N. Frenkel, *Human herpesvirus 7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva*. J Virol, 1992. **66**(5): p. 3206-9.

44. Wyatt, L.S., et al., *Human herpesvirus 7: antigenic properties and prevalence in children and adults*. J Virol, 1991. **65**(11): p. 6260-5.
45. Ablashi, D.V., et al., *Human herpesvirus-7 (HHV-7): current status*. Clin Diagn Virol, 1995. **4**(1): p. 1-13.
46. Kempf, W., et al., *Persistence of human herpesvirus 7 in normal tissues detected by expression of a structural antigen*. J Infect Dis, 1998. **178**(3): p. 841-5.
47. Caselli, E. and D. Di Luca, *Molecular biology and clinical associations of Roseoloviruses human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7*. New Microbiol, 2007. **30**(3): p. 173-87.
48. Caserta, M.T., et al., *Primary human herpesvirus 7 infection: a comparison of human herpesvirus 7 and human herpesvirus 6 infections in children*. J Pediatr, 1998. **133**(3): p. 386-9.
49. Tanaka, K., et al., *Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exanthem subitum)*. J Pediatr, 1994. **125**(1): p. 1-5.
50. Ponti, R., et al., *Human herpesvirus 7 detection by quantitative real time polymerase chain reaction in primary cutaneous T-cell lymphomas and healthy subjects: lack of a pathogenic role*. Br J Dermatol, 2008. **159**(5): p. 1131-7.
51. Barba, J.R.E., *Herpes virus 8: Sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman y linfoma de efusión primario*. Rev Latinoamer Patol Clin, 2012. **59**(1): p. 43-55.
52. Ortiz, R.d.L., D.M. Gil, and S. Jiménez. *Herpesvirus humano 8: Implicaciones patógenas y diagnóstico*. Control de calidad, SEIMC. 2004 [cited 2017].
53. Mutlu, A.D., et al., *In vivo-restricted and reversible malignancy induced by human herpesvirus-8 KSHV: a cell and animal model of virally induced Kaposi's sarcoma*. Cancer Cell, 2007. **11**(3): p. 245-58.
54. Wen, K.W. and B. Damania, *Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV): Molecular Biology and Oncogenesis*. Cancer letters, 2010. **289**(2): p. 140-150.
55. Alkan, S., et al., *Human herpesvirus-8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in organ transplant patients with immunosuppression*. Br J Haematol, 1997. **96**(2): p. 412-4.
56. Horenstein, M.G., et al., *Epstein-Barr virus latent gene expression in primary effusion lymphomas containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8*. Blood, 1997. **90**(3): p. 1186-91.
57. Siegal, B., et al., *Kaposi's sarcoma in immunosuppression. Possibly the result of a dual viral infection*. Cancer, 1990. **65**(3): p. 492-8.
58. Vieira, J., et al., *Activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) lytic replication by human cytomegalovirus*. J Virol, 2001. **75**(3): p. 1378-86.
59. Wang, X., et al., *Coinfection with EBV/CMV and other respiratory agents in children with suspected infectious mononucleosis*. Virology Journal, 2010. **7**: p. 247-247.
60. Abate, F., et al., *Distinct Viral and Mutational Spectrum of Endemic Burkitt Lymphoma*. PLoS Pathog, 2015. **11**(10): p. e1005158.
61. Ono, Y., et al., *Simultaneous monitoring by real-time polymerase chain reaction of epstein-barr virus, human cytomegalovirus, and human herpesvirus-6 in juvenile and adult liver transplant recipients*. Transplant Proc, 2008. **40**(10): p. 3578-82.
62. Harma, M., et al., *HHV-6 and HHV-7 antigenemia related to CMV infection after liver transplantation*. J Med Virol, 2006. **78**(6): p. 800-5.
63. Humar, A., et al., *An assessment of herpesvirus co-infections in patients with CMV disease: correlation with clinical and virologic outcomes*. Am J Transplant, 2009. **9**(2): p. 374-81.

64. Lautenschlager, I., et al., *CMV infection is usually associated with concurrent HHV-6 and HHV-7 antigenemia in liver transplant patients*. Journal of Clinical Virology, 2002. **25**(Supplement 2): p. 57-61.
65. Mendez, J.C., et al., *Human beta-herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients*. J Infect Dis, 2001. **183**(2): p. 179-184.
66. Carmona Mar, Á.M., Marco Jaime y Mahillo Beatriz, *Informe anual 2015. GODT Global Observatory on Donation and Transplantation 2017*.
67. Trasplantes, C.C.N.d., *Reporte Nacional 2015 de la donación y trasplantes*. 2016.
68. Varela F.G, P.J.H., J. N. Zermeno, JM. A. Fierros, V. G. Fuentes, P. M. Castaneda, P. M. Valencia, JM. R. Salgado, *Programa de trasplante hepático pediátrico en el Hospital Infantil de México Federico Gómez*. Investigación Clínica, 2011. **63**(1): p. 57-61.
69. *Real Academia Española*, in *Diccionario de la lengua española 2014*: Madrid, España.
70. Benfield, M.R., *Current status of kidney transplant: update 2003*. Pediatric Clinics of North America, 2003. **50**(6): p. 1301-1334.
71. Medeiros D. M., B.N.R., S. R. Valverde, R. Delgadillo, G.F. Varela, R. A. Muñoz., *Trasplante renal en pediatría*. Investigación Clínica, 2005. **57**(2): p. 230-236.
72. Rand B. E., K.M.O., *Overview of pediatric liver transplantation*. Gastroenterology Clinics of North America, 2003. **32**(3): p. 913-929.
73. Varela F.G., R.P.D., J. Z. Nieto, E. B. Bracho, V. G. Fuentes, P. M. Castaneda, MA. G. Abarca, V. L. Oliva, R. S. Caltenco, H. V. Palafox, JA. P. Hernandez, JM. M. Tovilla, P. del V. Lezama, P. M. Valencia., *Experience of a successful pediatric liver transplant program in Mexico*. Transplant Proc, 2005. **37**(2): p. 1201-2.
74. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, *Basic immunology : functions and disorders of the immune system*. 3rd ed. 2009, Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier. viii, 312 p.
75. Bellanti, J.A., A. Escobar-Gutiérrez, and G.C. Tsokos, *Immunology IV : clinical applications in health and disease*. 2012, Bethesda, Md.: I Care Press. xxxiii, 1063 p.
76. Kino, T., et al., *FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics*. J Antibiot (Tokyo), 1987. **40**(9): p. 1249-55.
77. Weikert, B.C. and E.A. Blumberg, *Viral infection after renal transplantation: surveillance and management*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3 Suppl 2**: p. S76-86.
78. M., G.F., *Trasplante y rechazo*, in *Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas* R.G. S., Editor. 2009: España.
79. Murphy K., P.T., M. Walport *Autoimmunity and Transplantation*, in *Janeway's Immunobiology*. 2008, Garland p. 637-648.
80. L., A.F., *Patología del trasplante renal*, in *Nefropatología*, A.F. L., Editor. 2006, Universidad Antioquia: Medellin Colombia.
81. Wikipedia. *Trasplante* s.f. [cited 2017 05 Agosto 2017]; Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/Trasplante_%28medicina%29#cite_note-aumente-7.
82. Almond PS, A.M., KJ. Gillingham, D. L. Dunn, W. D. Payne, P. Gores, R. Gruessner and J. S. Najarian. , *Risk factor for chronic rejection in renal allograft recipients*. Transplantation, 1993. **55**(4): p. 751-757.
83. Dharnidharka, V.R., et al., *Post-transplant lymphoproliferative disorders*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 15088.
84. Jamali, F.R., et al., *An overview of the pathogenesis and natural history of post-transplant T-cell lymphoma*. Leuk Lymphoma, 2007. **48**(6): p. 1237-41.

85. Swerdlow, S.H., *T-cell and NK-cell posttransplantation lymphoproliferative disorders*. Am J Clin Pathol, 2007. **127**(6): p. 887-95.
86. Taylor, A.L., R. Marcus, and J.A. Bradley, *Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after solid organ transplantation*. Crit Rev Oncol Hematol, 2005. **56**(1): p. 155-67.
87. Elnifro, E.M., et al., *Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(4): p. 559-70.
88. Wittwer, C.T., et al., *Real-time multiplex PCR assays*. Methods, 2001. **25**(4): p. 430-42.
89. Bolivar, A.M., A. Rojas, and P. Garcia Lugo, *PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización*. Avances en Biomedicina, 2014. **3**(1): p. 25-33.
90. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
91. Vaerman, J.L., P. Saussoy, and I. Ingargiola, *Evaluation of real-time PCR data*. J Biol Regul Homeost Agents, 2004. **18**(2): p. 212-4.
92. Tenorio, A., et al., *Detection and typing of human herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction*. J Virol Methods, 1993. **44**(2-3): p. 261-9.
93. Casas, I., et al., *Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for entero- and herpesviruses in a prospective study*. J Med Virol, 1999. **57**(2): p. 145-51.
94. Casas, I., et al., *Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification*. J Virol Methods, 1997. **66**(1): p. 39-50.
95. Pozo, F. and A. Tenorio, *Detection and typing of lymphotropic herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction*. J Virol Methods, 1999. **79**(1): p. 9-19.
96. Tanaka, T., et al., *Rapid and simultaneous detection of 6 types of human herpes virus (herpes simplex virus, varicella-zoster virus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human herpes virus 6A/B, and human herpes virus 7) by multiplex PCR assay*. Biomed Res, 2009. **30**(5): p. 279-85.
97. Wada, K., et al., *Simultaneous quantification of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human herpesvirus 6 DNA in samples from transplant recipients by multiplex real-time PCR assay*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(5): p. 1426-32.
98. Wada, K., et al., *Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7*. Microbiol Immunol, 2009. **53**(1): p. 22-9.
99. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
100. Tanaka, N., et al., *Monitoring four herpesviruses in unrelated cord blood transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2000. **26**(11): p. 1193-7.
101. Kimura, H., et al., *Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus Load by Using a Real-Time PCR Assay*. Journal of Clinical Microbiology, 1999. **37**(1): p. 132-136.
102. Tanaka, N., et al., *Quantitative analysis of cytomegalovirus load using a real-time PCR assay*. J Med Virol, 2000. **60**(4): p. 455-62.
103. Hara, S., et al., *Detection of herpesvirus DNA in the serum of immunocompetent children*. Microbiol Immunol, 2002. **46**(3): p. 177-80.
104. Hoshino, Y., et al., *Prospective monitoring of the Epstein-Barr virus DNA by a real-time quantitative polymerase chain reaction after allogenic stem cell transplantation*. Br J Haematol, 2001. **115**(1): p. 105-11.
105. Limaye, A.P., et al., *Cytomegalovirus (CMV) DNA load in plasma for the diagnosis of CMV disease before engraftment in hematopoietic stem-cell transplant recipients*. J Infect Dis, 2001. **183**(3): p. 377-82.

106. Niesters, H.G., et al., *Development of a real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(2): p. 712-5.
107. Soriano-Lopez, D.P., et al., *A Scheduled Program of Molecular Screening for Epstein-Barr Virus Decreases the Incidence of Post-transplantation Lymphoproliferative Disease in Pediatric Liver Transplantation*. Transplant Proc, 2016. **48**(2): p. 654-7.
108. Wadowsky, R.M., et al., *Measurement of Epstein-Barr virus DNA loads in whole blood and plasma by TaqMan PCR and in peripheral blood lymphocytes by competitive PCR*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(11): p. 5245-9.
109. Zipeto, D., et al., *Human cytomegalovirus (CMV) DNA in plasma reflects quantity of CMV DNA present in leukocytes*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(10): p. 2607-11.
110. Boutolleau, D., et al., *Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7: two closely related viruses with different infection profiles in stem cell transplantation recipients*. J Infect Dis, 2003. **187**(2): p. 179-86.
111. Stevens, S.J.C., et al., *Comparison of Quantitative Competitive PCR with LightCycler-Based PCR for Measuring Epstein-Barr Virus DNA Load in Clinical Specimens*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**(11): p. 3986-3992.
112. Kanakry, J.A., et al., *The clinical significance of EBV DNA in the plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with or without EBV diseases*. Blood, 2016. **127**(16): p. 2007-17.
113. Limaye, A.P., et al., *Detection of Epstein-Barr virus DNA in sera from transplant recipients with lymphoproliferative disorders*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(4): p. 1113-6.
114. Lo, Y.M., et al., *Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma*. Cancer Res, 1999. **59**(6): p. 1188-91.
115. Tedder, R.S., et al., *Development and evaluation of an internally controlled semiautomated PCR assay for quantification of cell-free cytomegalovirus*. J Med Virol, 2002. **66**(4): p. 518-23.
116. Gerna, G., et al., *Comparative quantitation of human cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of transplant and AIDS patients*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(11): p. 2709-17.
117. Kimura, H., et al., *Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease*. Rev Med Virol, 2008. **18**(5): p. 305-19.
118. Razonable, R.R., et al., *Herpesvirus infections in solid organ transplant patients at high risk of primary cytomegalovirus disease*. J Infect Dis, 2005. **192**(8): p. 1331-9.
119. Aguayo-Hiraldo, P., R. Arasaratnam, and R.H. Rouse, *Recent advances in the risk factors, diagnosis and management of Epstein-Barr virus post-transplant lymphoproliferative disease*. Boletín Médico del Hospital Infantil de México, 2016. **73**(1): p. 31-40.
120. Liu, Q., et al., *Molecular monitoring and stepwise preemptive therapy for Epstein-Barr virus viremia after allogeneic stem cell transplantation*. Am J Hematol, 2013. **88**(7): p. 550-5.
121. Torre-Cisneros, J., et al., *[Impact of initial cytomegalovirus viral load on efficacy of preemptive therapy with ganciclovir in allogeneic stem cell transplant recipients]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2010. **28**(1): p. 6-12.
122. D'Antiga, L., et al., *Sustained Epstein-Barr virus detection in paediatric liver transplantation. Insights into the occurrence of late PTLD*. Liver Transpl, 2007. **13**(3): p. 343-8.
123. Boeckh, M. and G. Boivin, *Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications*. Clinical Microbiology Reviews, 1998. **11**(3): p. 533-554.
124. Chiu, H., et al., *Mononucleosis syndrome and coincidental human herpesvirus-7 and Epstein-Barr virus infection*. Archives of Disease in Childhood, 1998. **78**(5): p. 479-480.

125. Bertram, G., et al., *Frequent double infection with Epstein-Barr virus and human herpesvirus-6 in patients with acute infectious mononucleosis*. *In Vivo*, 1991. **5**(3): p. 271-9.
126. Rahal, E.A., et al., *Epstein-Barr Virus and Human herpes virus 6 Type A DNA Enhance IL-17 Production in Mice*. *Viral Immunol*, 2015. **28**(5): p. 297-302.
127. Hornef, M.W., et al., *Coincidence of Epstein-Barr virus reactivation, cytomegalovirus infection, and rejection episodes in renal transplant recipients*. *Transplantation*, 1995. **60**(5): p. 474-80.
128. Kidd, I.M., et al., *Prospective study of human betaherpesviruses after renal transplantation: association of human herpesvirus 7 and cytomegalovirus co-infection with cytomegalovirus disease and increased rejection*. *Transplantation*, 2000. **69**(11): p. 2400-4.

12. ANEXOS

12.1. Carta de Asentimiento Informado.

NOMBRE DEL ESTUDIO: “CARGA VIRAL DE LOS HERPESVIRUS HUMANOS 4, 5, 6, 7 Y 8 E INFLAMACIÓN SISTÉMICA COMO MARCADORES DE PRONÓSTICO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS POST-TRASPLANTE”

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

Unidad de Investigación en Virología y Cáncer

Hola, mi nombre es Abigail Morales Sánchez. Quiero invitarte a participar en un estudio en donde medimos la cantidad de virus y algunas sustancias que están presentes en todas las personas, dichas sustancias se llaman citocinas. Estos virus y citocinas podrían variar en una persona que como tú recibe un trasplante.

Tu mamá/papá autorizó el que tú participes en el estudio y si tú estás de acuerdo en participar nosotros usaremos una parte de la sangre que tu médico necesita para estar vigilando tu estado de salud antes y después de que se te realice el trasplante. Este estudio durará 2 años.

La única molestia que sentirás es por la toma de las muestras de sangre ya que te puede doler el piquete y tal vez te cause temor, pero el dolor desaparecerá rápidamente.

Participar en esta investigación podría brindar información a tu médico respecto a tu estado de salud después de que se realice el trasplante. Al mismo tiempo la información obtenida en este estudio nos ayudará a saber más sobre cómo afectan algunos virus y citocinas la evolución de los pacientes que reciben un trasplante por lo que podría usarse en otros niños que sean sometidos a algún trasplante en el futuro. Al término del estudio, si sobrara muestra, ésta podría ser utilizada para otros estudios.

Tú no tienes que participar en esta investigación si no quieres. Y si decides participar, durante el transcurso del estudio puedes dejar de hacerlo cuando quieras, con toda libertad, nada malo

va a suceder y los médicos que te atienden seguirán prestándote los mismos servicios. Tú puedes negarte a formar parte del estudio incluso si tu mamá/papá nos dio su autorización para tu participación.

Toda la información que nos des y todos los resultados que obtengamos de ti son confidenciales. Esto quiere decir que no diremos a nadie los resultados de las pruebas, y sólo lo sabremos los investigadores de este proyecto. Si tienes alguna duda sobre el estudio, por favor háblame a cualquiera de los siguientes teléfonos: 5228 9917, extensión 2129 o al 4434 9663, en un horario de 8 de la mañana a 4 de la tarde. Si quieres hablar con otra persona acerca de este estudio, puedes hablar a los mismos teléfonos con el Dr. Ezequiel Fuentes Pananá. Puedes llamarnos para hacer preguntas durante todo el periodo de duración del estudio.

Si entiendes lo que está escrito en este formato y decides que sí quieres participar en el estudio, por favor, marca con una X la casilla donde dice Sí quiero participar en el estudio, de lo contrario no entregues este formato.

Sí, quiero participar en el estudio

Nombre completo del paciente _____

Firma del paciente _____

Fecha de firma del paciente (escrita por el paciente): _____

PERSONA QUE OBTIENE EL ASENTIMIENTO

Nombre completo del investigador _____

Firma del investigador _____

Fecha de firma del investigador (escrita por el investigador): _____

12.2. Carta de Consentimiento Informado.

“CARGA VIRAL DE LOS HERPESVIRUS HUMANOS 4, 5, 6, 7 Y 8 E INFLAMACIÓN SISTÉMICA COMO MARCADORES DE PRONÓSTICO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS POST-TRASPLANTE”

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

Unidad de Investigación en Virología y Cáncer

Lo (a) estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo en la Unidad de Investigación en Virología y Cáncer del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

El estudio tiene como propósito evaluar la presencia de virus y sustancias llamadas citocinas en pacientes que han sido trasplantados. Usted ha sido invitado (a) a participar en este estudio porque su niño (a) forma parte del programa de trasplantes del Hospital Infantil de México, por lo que pensamos que pudiera ser un buen candidato para participar en este proyecto. Al igual que usted, aproximadamente 70 personas más serán invitadas a participar.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos, y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.

1. Procedimientos

Si usted acepta participar ocurrirá lo siguiente:

Se usará parte de la sangre que le es tomada a su niño para los estudios que solicita su médico rutinariamente antes y después del trasplante, no será necesario ninguna toma adicional. El estudio durará dos años. Con esta sangre se realizará un estudio de biología molecular que tiene el propósito de detectar virus y algunas sustancias en la sangre que se llaman citocinas que pueden aumentar o disminuir sus niveles cuando ocurre un proceso infeccioso o debido al uso de medicamentos como los que se utilizan para que su hijo reciba adecuadamente el órgano o tejido trasplantado. Con estos estudios conoceremos más sobre las complicaciones o padecimientos que pueda tener su hijo que ha sido trasplantado.

Su muestra será cuidadosamente resguardada en la Unidad de Investigación en Virología y Cáncer. Al término del análisis y publicación del estudio, si sobrara muestra, ésta podría ser utilizada para otros estudios.

2. Posibles riesgos y molestias

Las molestias durante la toma de muestra de sangre son mínimas, en algunas ocasiones el procedimiento para tomarle una muestra de sangre puede causar un poco de dolor o una discreta molestia, es posible que se le pueda formar un moretón. No obstante la muestra para nuestro estudio será tomada cuando se requiera porque así lo indica su médico tratante y como parte del manejo y control médico que se les da a los pacientes que como su hijo han sido trasplantados. En ningún caso haremos una toma de muestra de sangre más allá de la que se requiera para el diagnóstico y control del padecimiento de su hijo(a). Nosotros estamos en coordinación con el personal médico y de laboratorio para tomar la parte de la muestra que nos sea asignada. La cantidad de muestra puede variar en función del sobrante pero podría estar en el rango de 0.5-1.5 ml.

3. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio

No recibirá un pago por su participación en este estudio, ni implica gasto alguno para usted. Un beneficio de su participación en este estudio es que el resultado de las pruebas que realizaremos le proporcionará información a su médico tratante sobre el pronóstico y evolución de su hijo en el periodo posterior al trasplante. La identificación de los virus y las citocinas que estamos buscando le permitirá a su médico hacer una evaluación de potenciales riesgos de infección e inflamación subsecuente que su hijo pudiera presentar. La presencia de estos virus y citocinas no implica necesariamente un riesgo para la salud de su hijo, por lo que su sola presencia sin la manifestación de datos clínicos de enfermedad relacionada a estos virus y citocinas no amerita que su hijo reciba tratamiento médico. No obstante su médico conocerá el tipo de agentes y sustancias que sean identificados en su hijo y él se encuentra en completa libertad de hacer ajustes al manejo del paciente que considere pertinentes y que comentará en su momento con usted.

Este estudio podría dar pautas en la identificación de algunos virus relacionados a la presentación de complicaciones que ocurren en el periodo posterior al trasplante como enfermedad injerto contra huésped, enfermedad linfoproliferativa y cáncer.

4. Resultados

Los resultados del estudio serán entregados al médico tratante, el cual es el único capacitado y con la autoridad para señalar de acuerdo a los resultados si se modifica el tratamiento. Adicionalmente, durante todo el estudio puede usted solicitarnos información acerca de los datos que se vayan obteniendo.

5. Participación o retiro.

Queremos hacer de su conocimiento, el compromiso que tenemos de dar respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide no participar, de cualquier manera recibirá la atención médica que suele recibir en esta Institución Hospitalaria. Esto es, no afectará su relación con este hospital y tampoco afectará su derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibe de este hospital.

Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en el momento que quiera no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como paciente de esta Institución.

6. Privacidad y confidencialidad.

La información que nos sea proporcionada por el médico tratante que pudiera ser utilizada para identificar a su hijo(a) como su nombre será guardada de manera confidencial y por separado al igual que los resultados de sus pruebas clínicas, para garantizar su privacidad.

El equipo de investigadores, su médico tratante en el Servicio de Trasplantes y algunas personas del área del Laboratorio clínico sabrán que usted está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información que usted proporcione durante su participación en este estudio. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o

presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos.

7. Personal de contacto para dudas y aclaraciones

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 8:00 a 16:00 hrs, de lunes a viernes a los siguientes teléfonos: 52-28-99-17 ext. 2129 y 44349663 (teléfono directo) con la Dra. Abigail Morales Sánchez, que es la investigadora responsable del estudio o el Dr. Ezequiel M. Fuentes Pananá quien es el Jefe de la Unidad de Investigación en Virología y Cáncer, la cual se encuentra en el segundo piso del Edificio Federico Gómez del Hospital Infantil de México Federico Gómez ubicado en Calle Dr. Márquez No. 162 Col. Doctores, Del Cuauhtémoc. CP. 06720, México D. F.

8. Declaración de consentimiento informado

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

Nombre del Paciente

Nombre del papá o Tutor

Firma del papá o Tutor

Fecha

Nombre de la mamá o Tutora

Firma de la mamá o Tutora

Fecha

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Creo que él/ella entiende la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

Firma del encargado de obtener el CI

Fecha

Firma de los testigos

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

Nombre del Testigo 1

Parentesco con participante

Dirección del testigo 1

Firma del Testigo 1

Fecha

Nombre del Testigo 2

Parentesco con participante

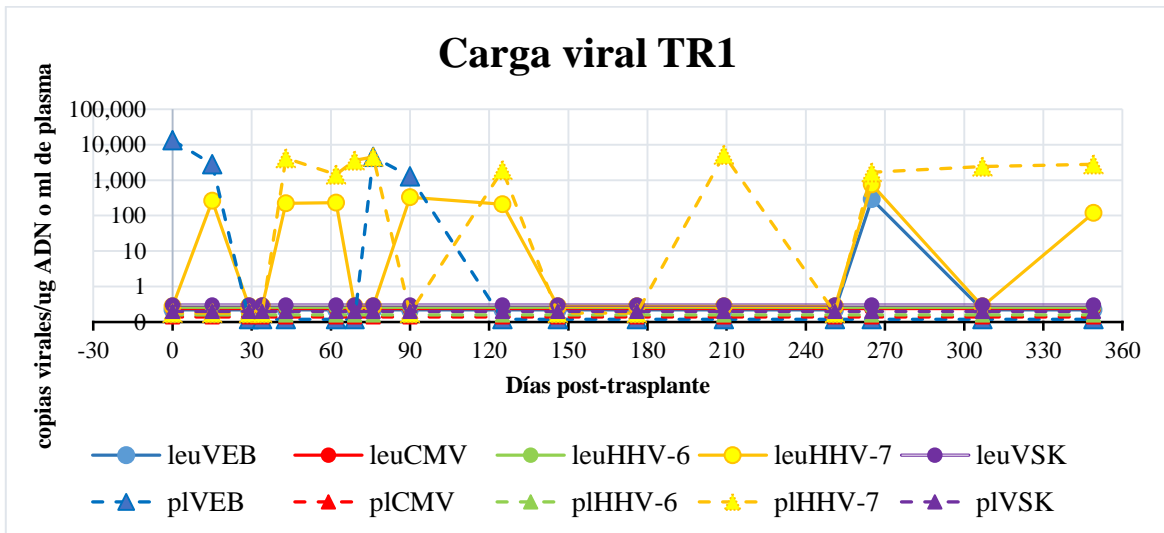
Dirección del testigo 2

Firma del Testigo 2

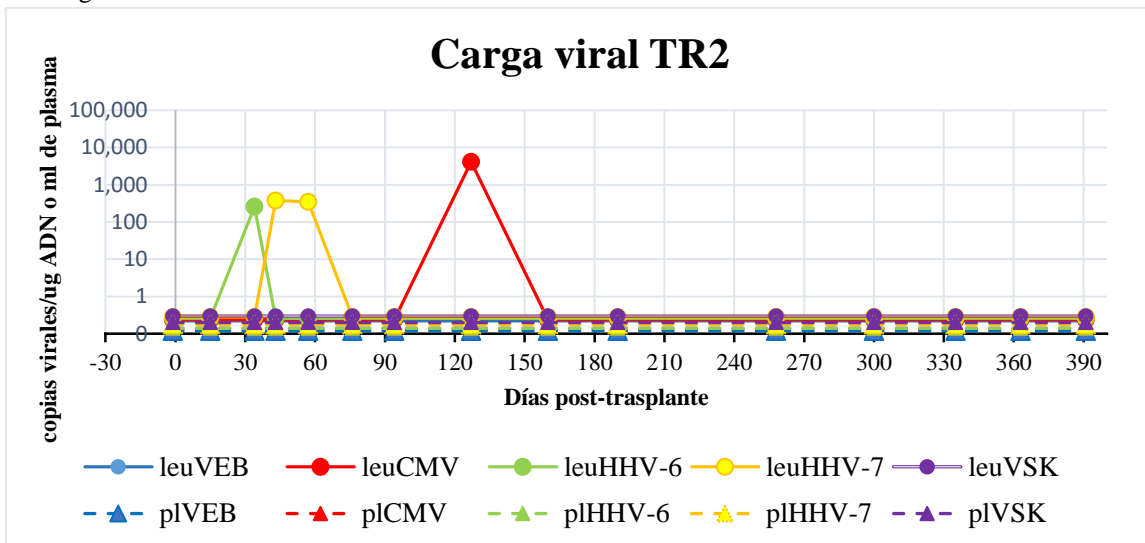
Fecha

Con copia para el paciente.

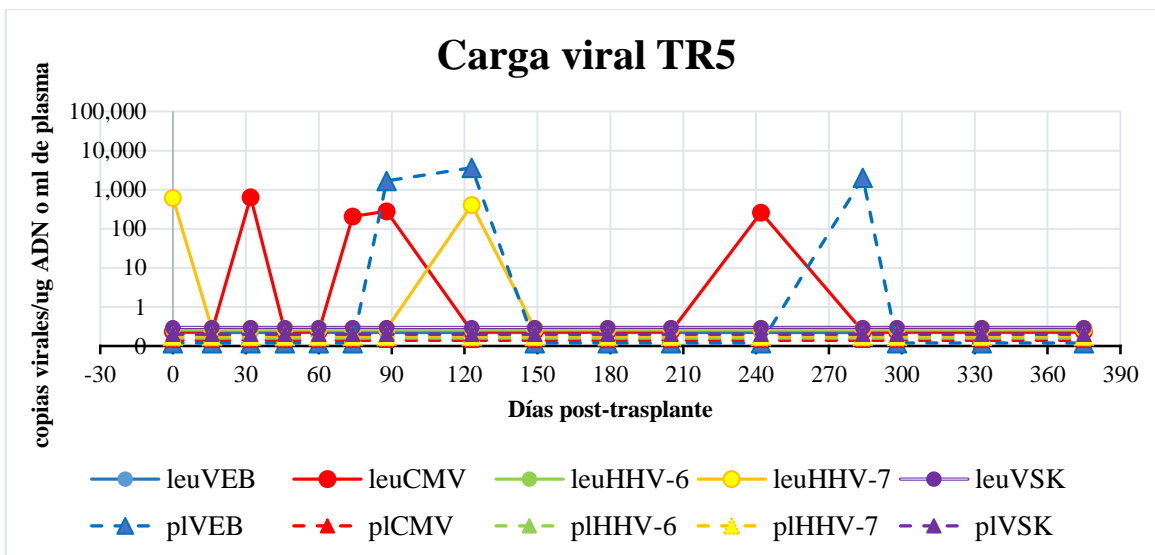
12.3. Gráficas de las cargas virales de los pacientes positivos.



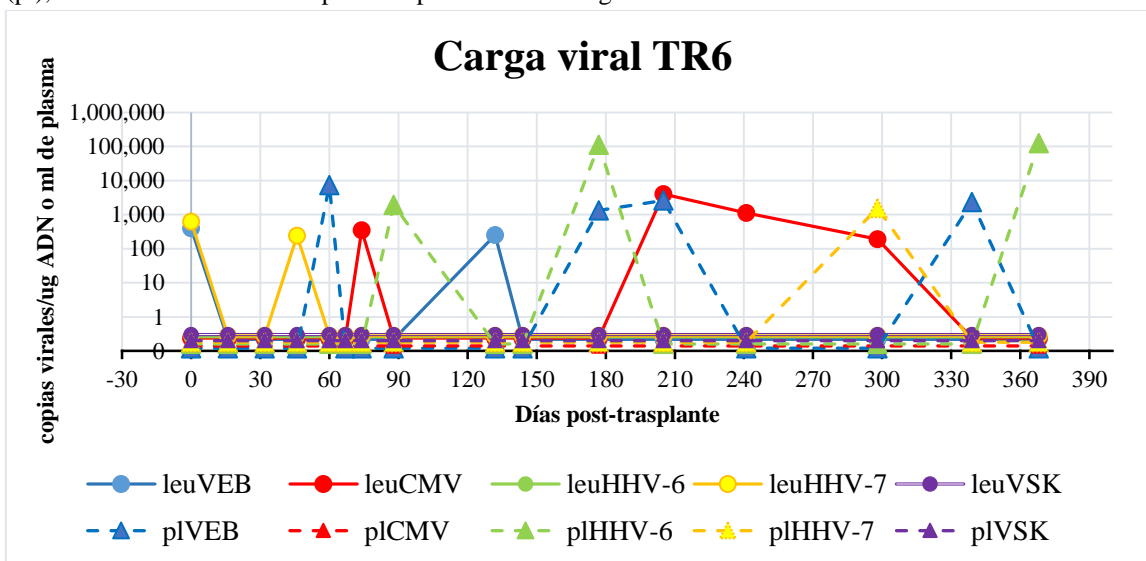
Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR1, quien presentó veintiuna cargas positivas tanto en leucocitos como en plasma, cinco para el VEB y dieciséis para el HHV-7, de las cuales nueve fueron continuas para el HHV-7 en dos periodos separados y dos cargas fueron continuas para el VEB. Presentó cuatro eventos de coinfección entre el VEB y el HHV-7. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μ g de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.



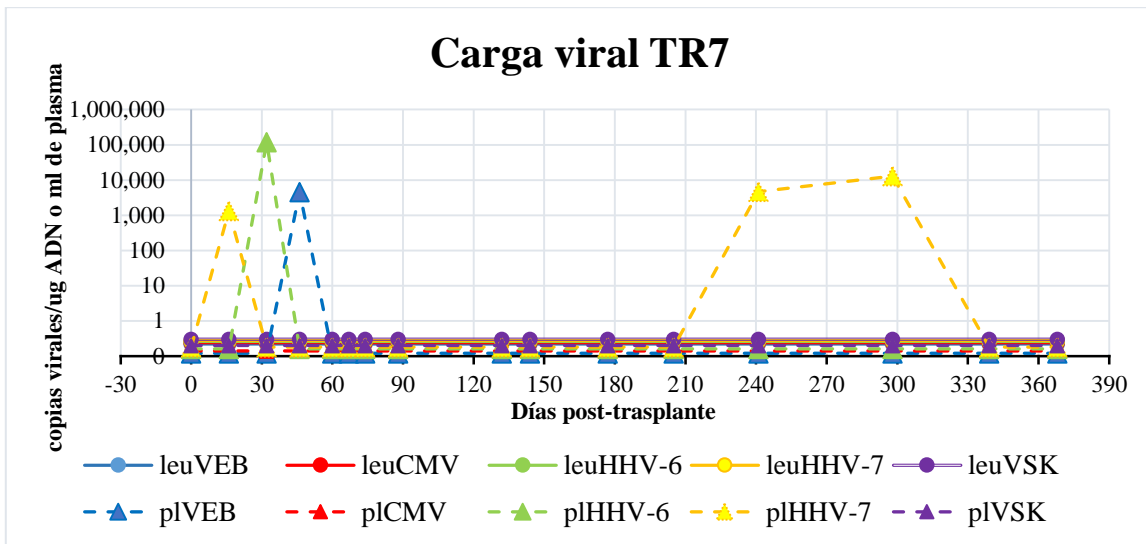
Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR2, quien presentó cuatro cargas positivas dos para el HHV-7, una para el CMV y una para el HHV-6, presentó dos cargas continuas para el HHV-7. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μ g de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.



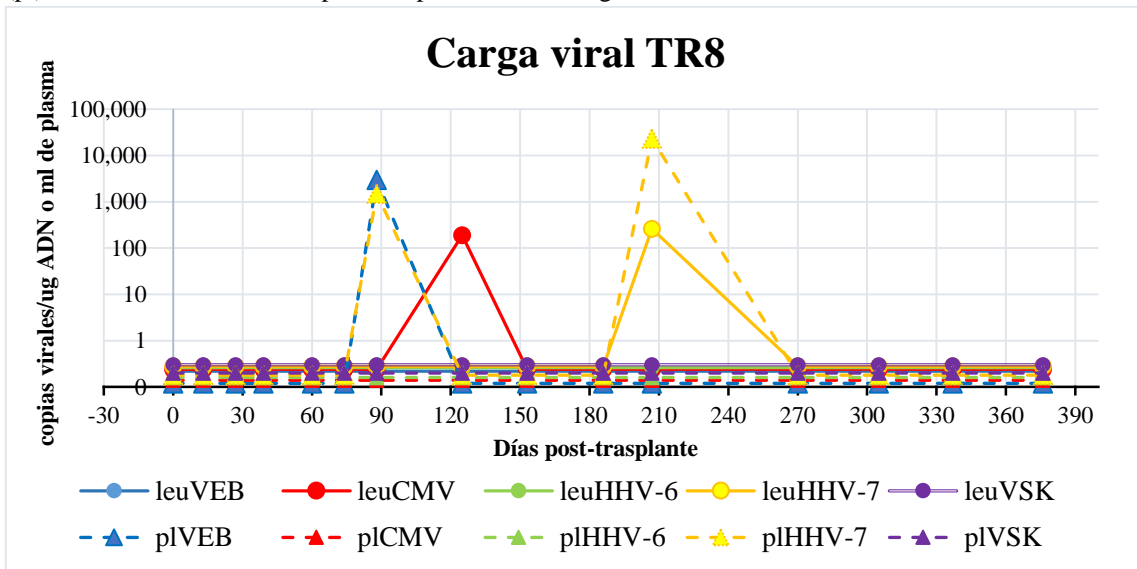
Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR5, quien presentó nueve cargas positivas tres para el CMV, dos para el HHV-7 y dos para el VEB, presentó cuatro cargas continuas, dos para el VEB y dos para el CMV. Presentó dos eventos de coinfección, entre el VEB y el CMV y entre el VEB y el HHV-7. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.



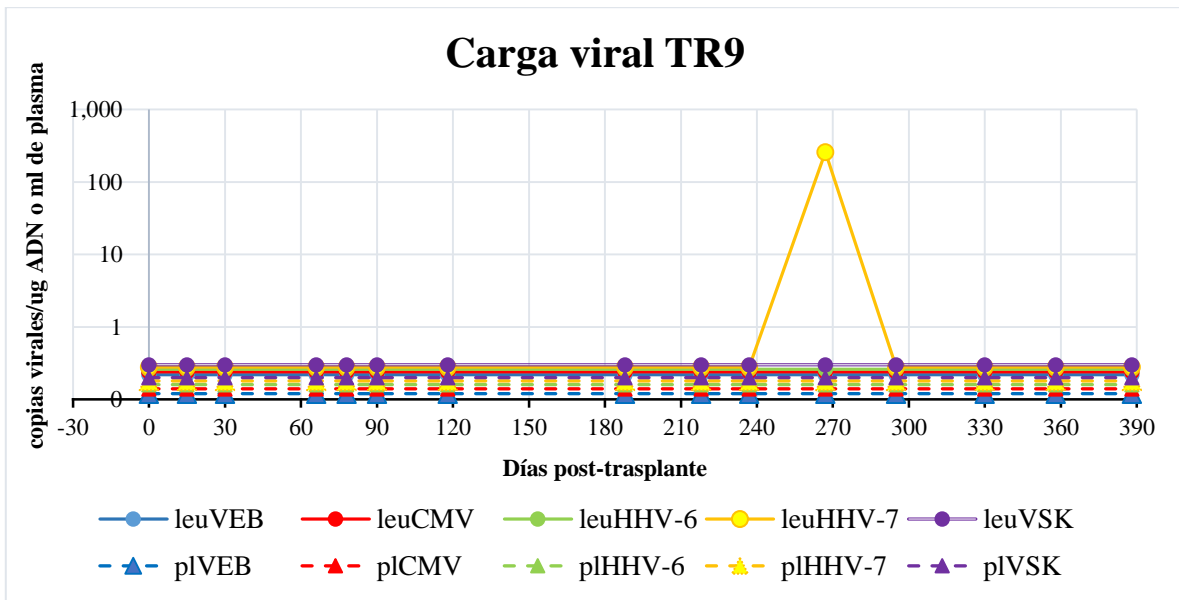
Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR6, quien presentó dieciséis cargas positivas, seis para el VEB, cuatro para el CMV, tres para el HHV-6 y tres para el HHV-7. Presentó cinco cargas continuas, dos para el VEB y tres para el CMV. Presentó cuatro eventos de coinfección, entre el VEB y el HHV-7, entre el VEB y el HHV-6, entre el VEB y el CMV y entre el CMV y el HHV-7. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.



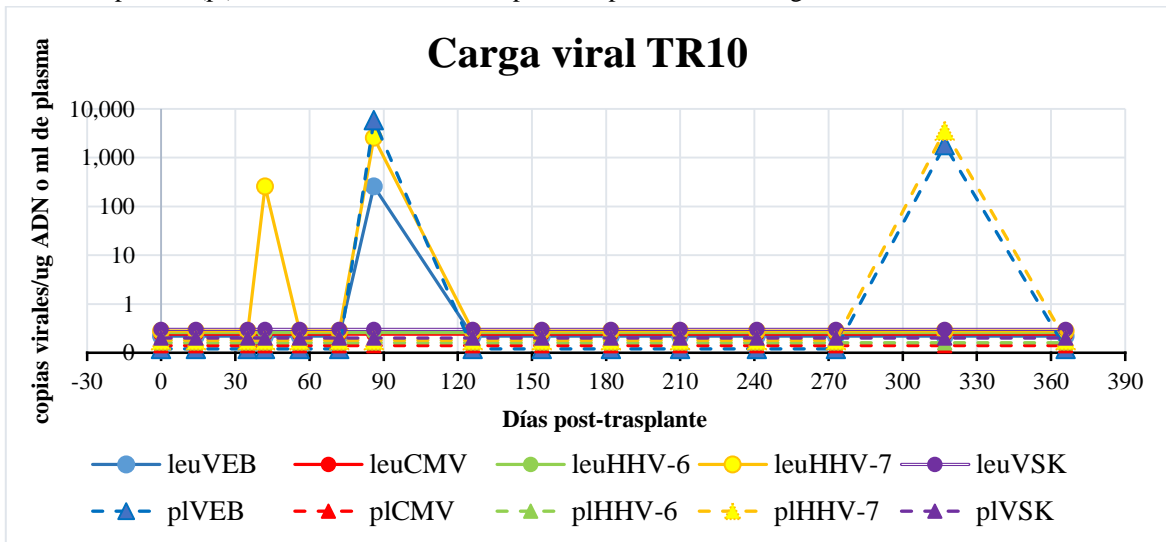
Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR7, quien presentó cinco cargas positivas, tres para el HHV-7, una para el VEB y una para el HHV-6. Presentó dos cargas continuas para el HHV-7. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.



Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR8, quien presentó cinco cargas positivas, tres para el HHV-7, uno para el VEB y uno para el CMV. Presentó un evento de coinfección, entre el VEB y el HHV-7. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.

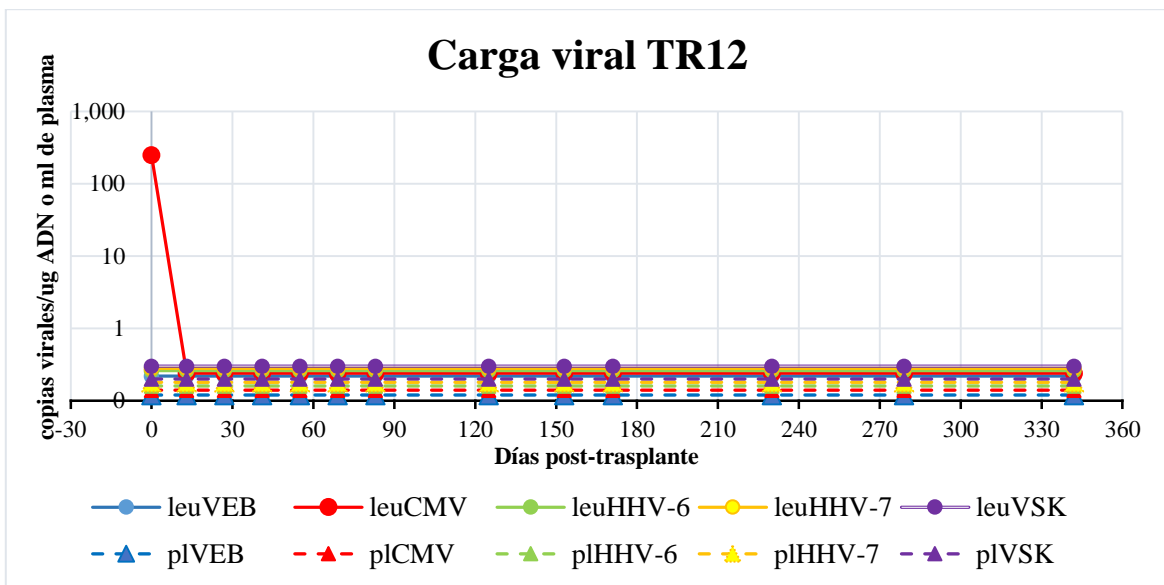


Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR9, quien presentó una carga positiva para el HHV-7. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.

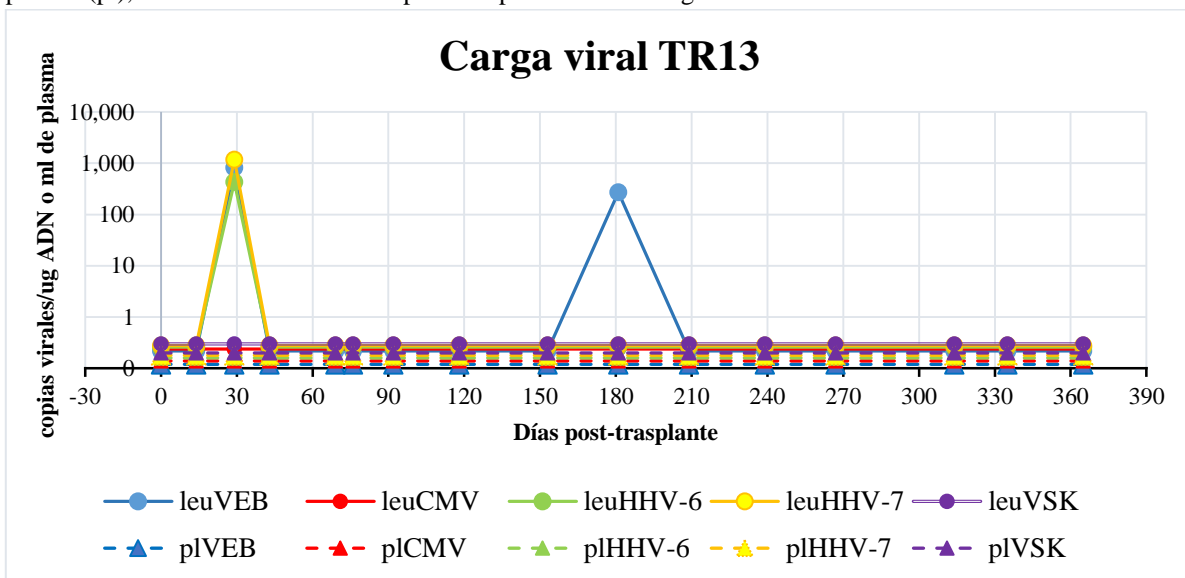


Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR10, quien presentó seis cargas positivas, tres para el VEB y tres para el HHV-7. Presentó dos eventos de coinfección entre el VEB y el HHV-7. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.

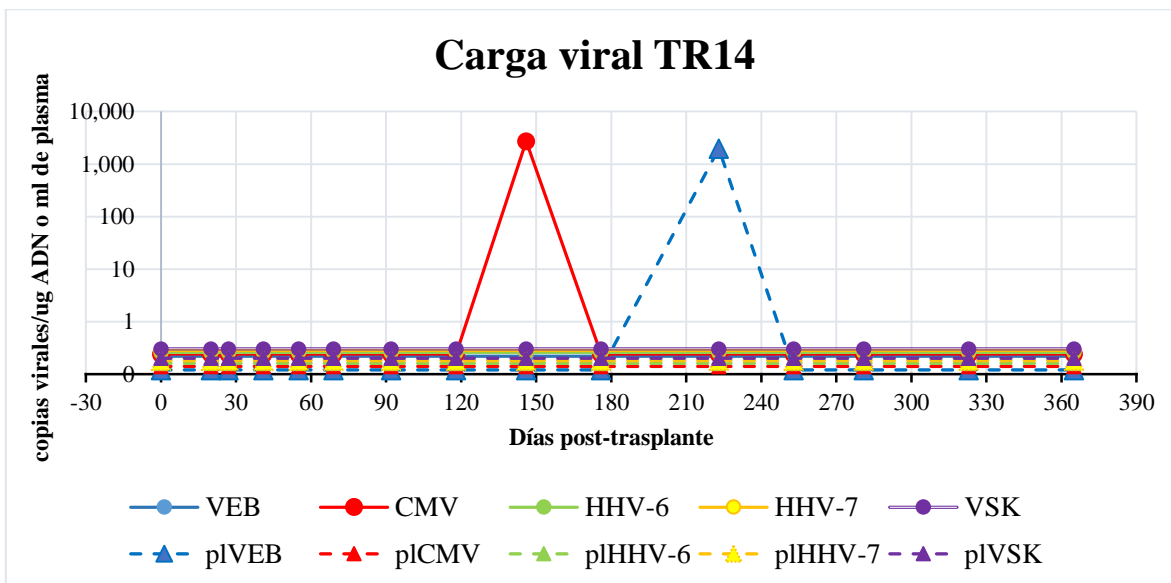
El paciente TR11 no presentó muestras positivas.



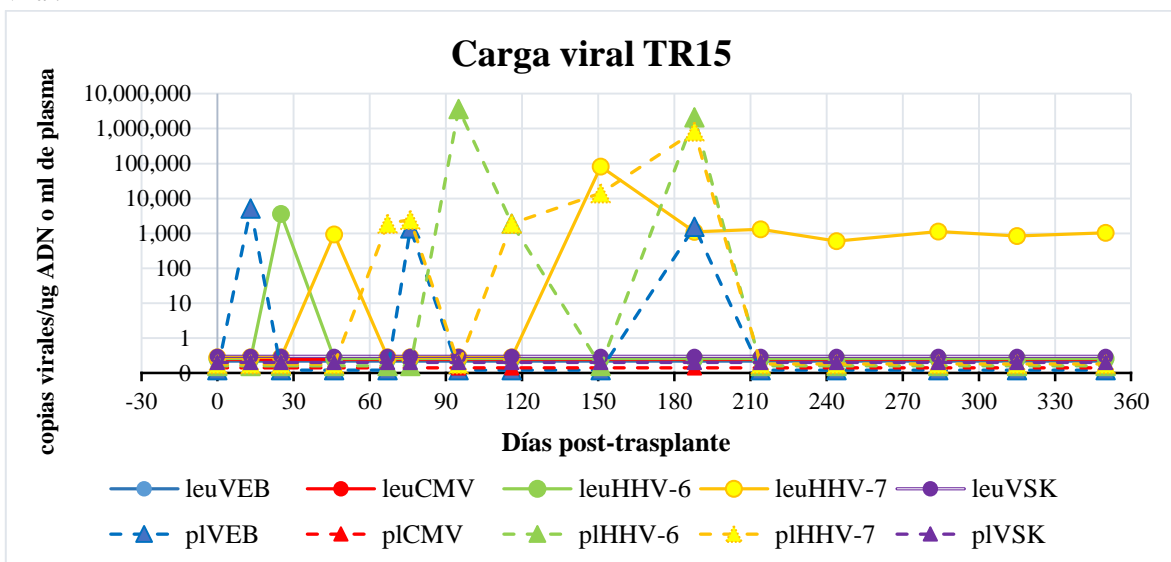
Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR12, quien presentó una carga viral para el CMV. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.



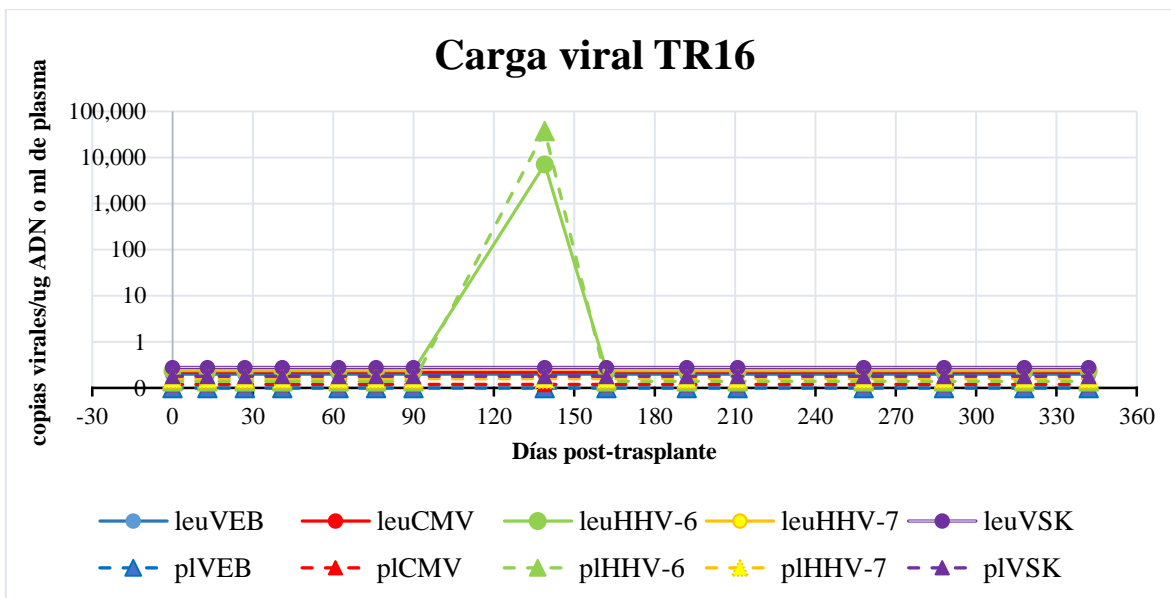
Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR13, quien presentó cuatro cargas positivas, dos para el VEB, una para el HHV-6 y una para el HHV-7. Presentó un evento de coinfección entre el VEB, el HHV-6 y el HHV-7. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.



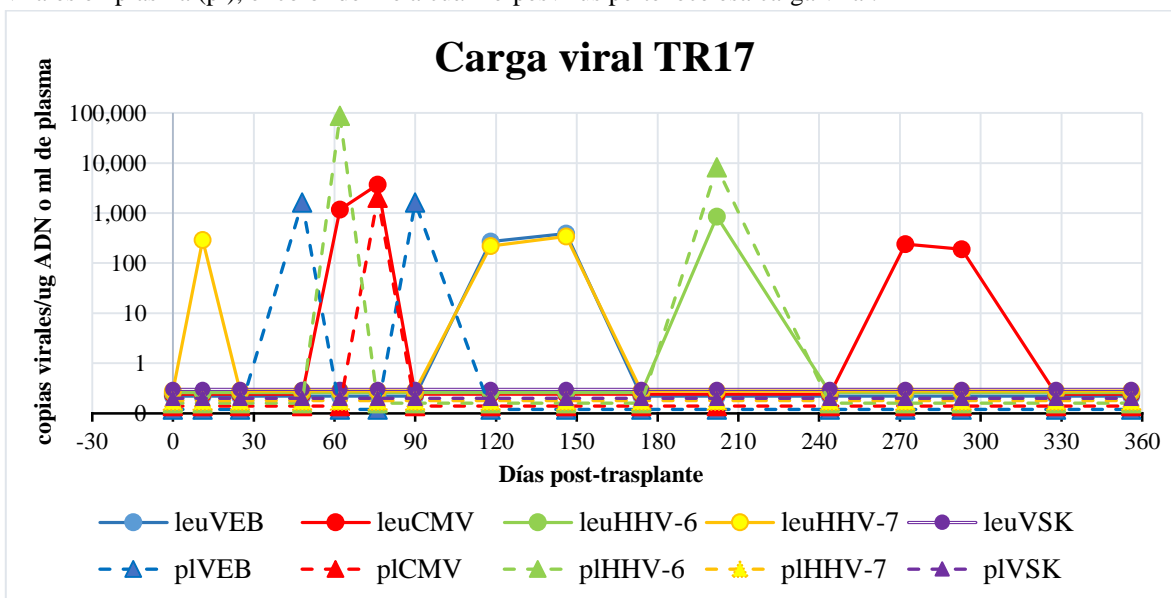
Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR14, quien presentó dos cargas virales positivas, una para el VEB y una para el CMV. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.



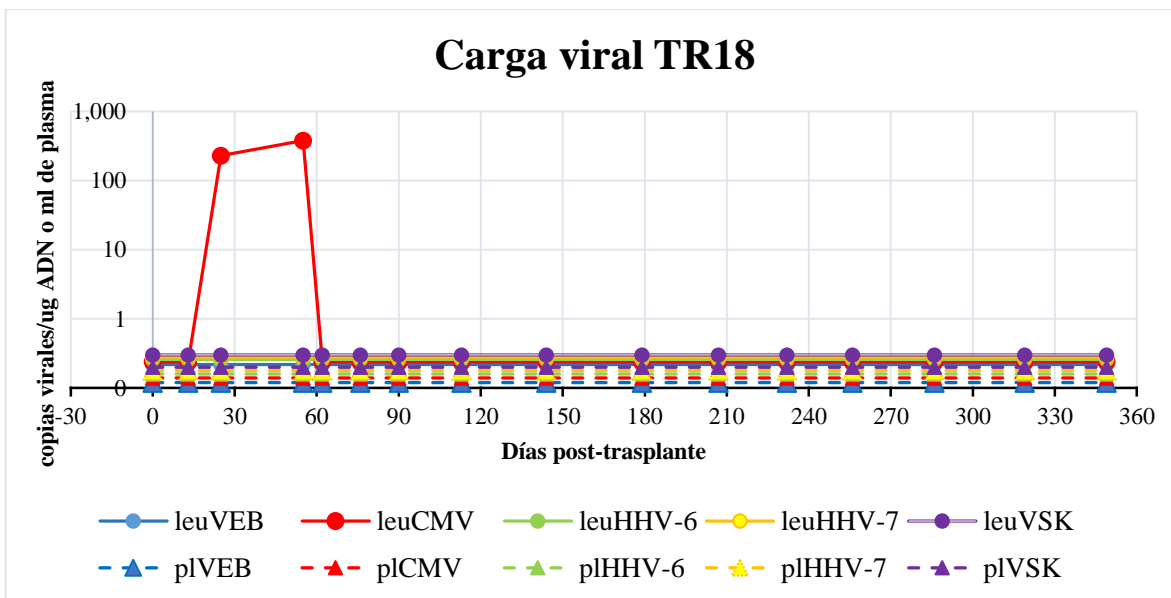
Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR15, quien presentó diecinueve cargas positivas tanto en leucocitos como en plasma, trece para el HHV-7, tres para el VEB y tres para el HHV-6. Presentó once cargas continuas para el HHV-7 en dos periodos separados. Presentó tres eventos de coinfección entre el VEB y el HHV-7, entre el HHV-6 y el HHV-7, y una triple infección entre el VEB, el HHV-6 y el HHV-7. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.



Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR16, quien presentó dos cargas virales positivas para el HHV-6. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.

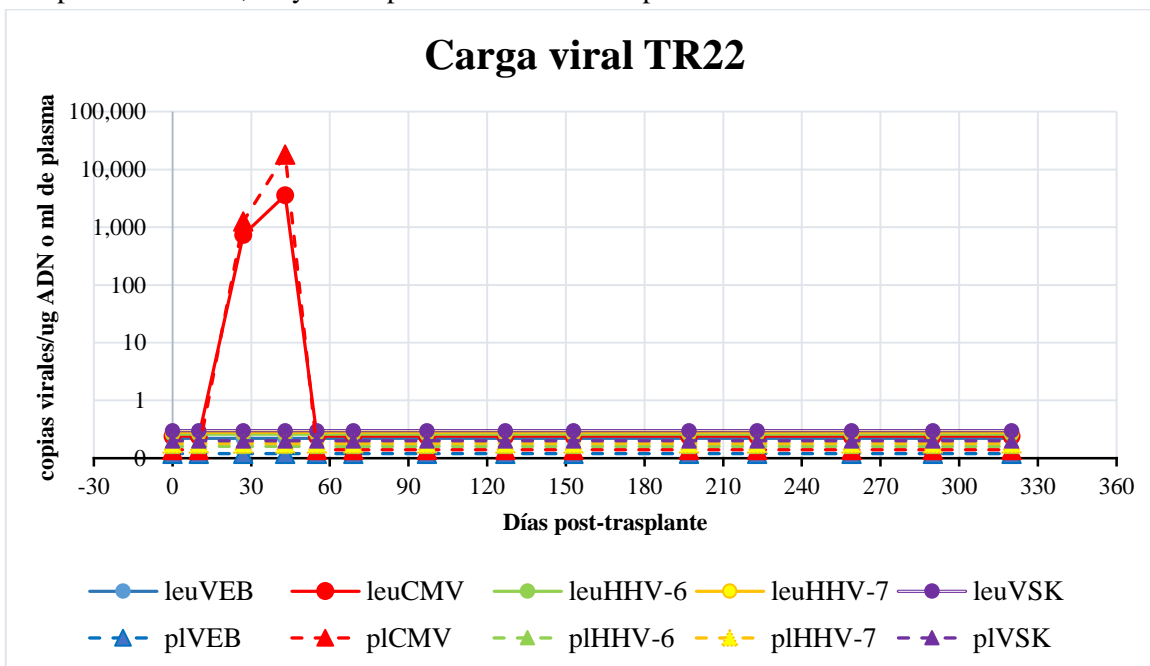


Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR17, quien presentó quince cargas positivas tanto en leucocitos como en plasma, cinco para el CMV, cuatro para el VEB, tres para el HHV-7 y tres para el HHV-6. Presentó seis cargas continuas, cuatro para el CMV en dos periodos separados y dos para el HHV-7. Presentó tres eventos de coinfección, dos entre el VEB y el HHV-7 y uno entre el CMV y el HHV-6. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.



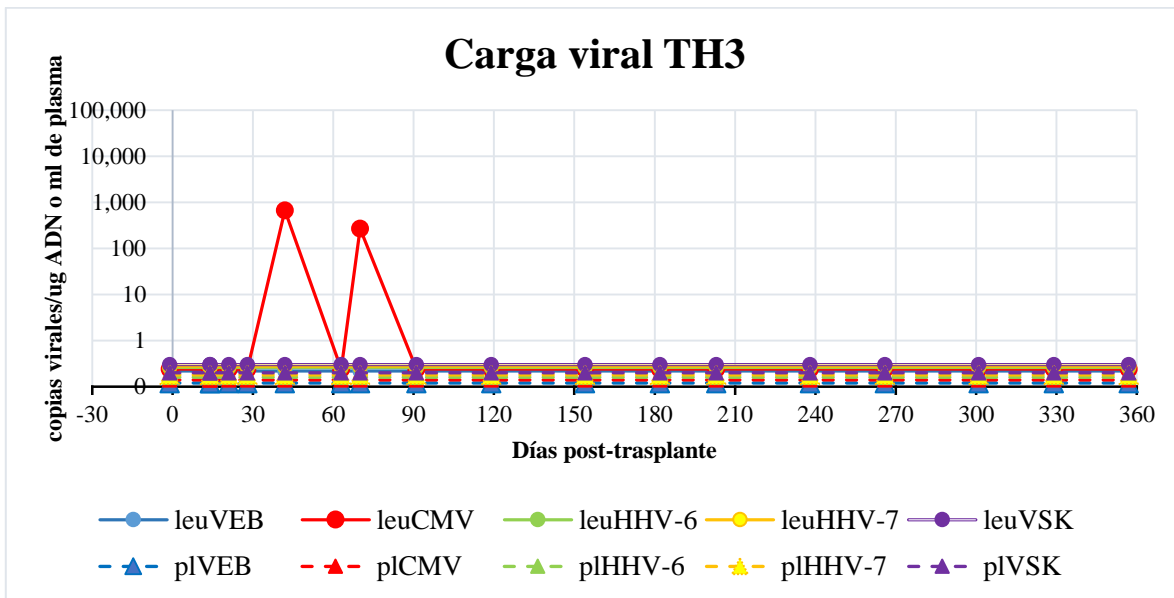
Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR18, quien presentó dos cargas positivas para el CMV. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.

Los pacientes TR19, 20 y 21 no presentaron muestras positivas.

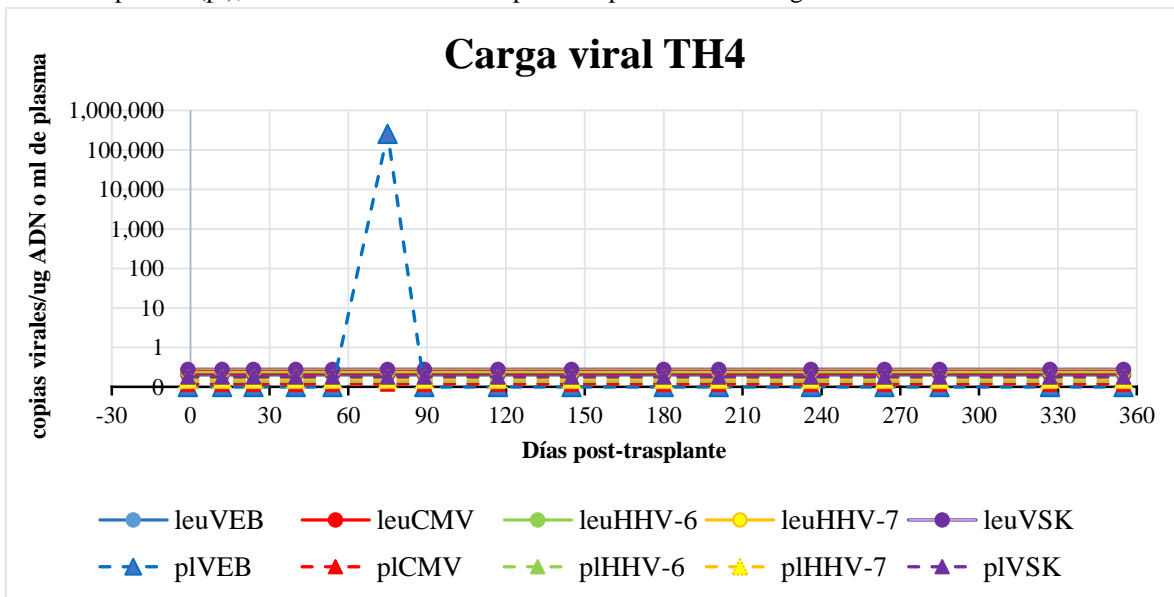


Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TR22, quien presentó cuatro cargas positivas para el CMV. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.

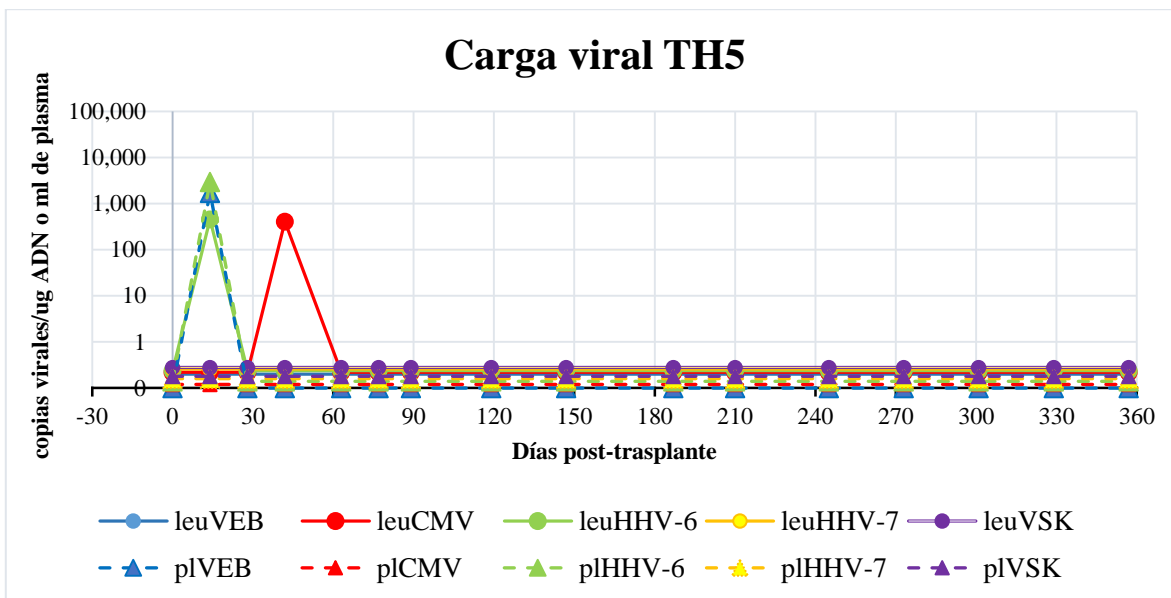
El paciente TR23 no presentó muestras positivas.



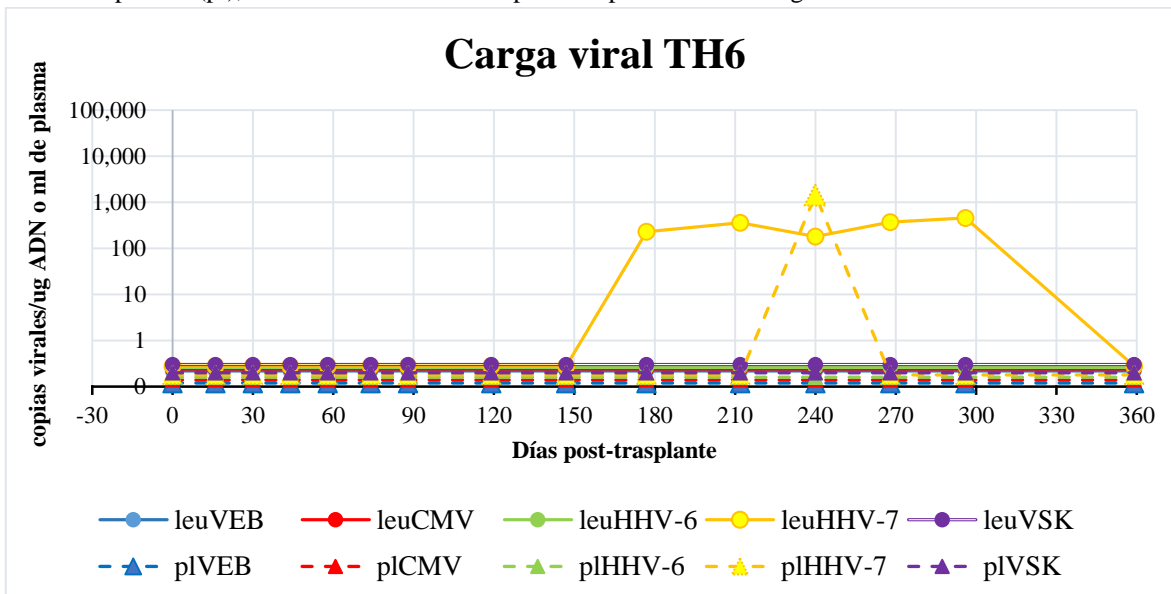
Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TH3, quien presentó dos cargas positivas para el CMV. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.



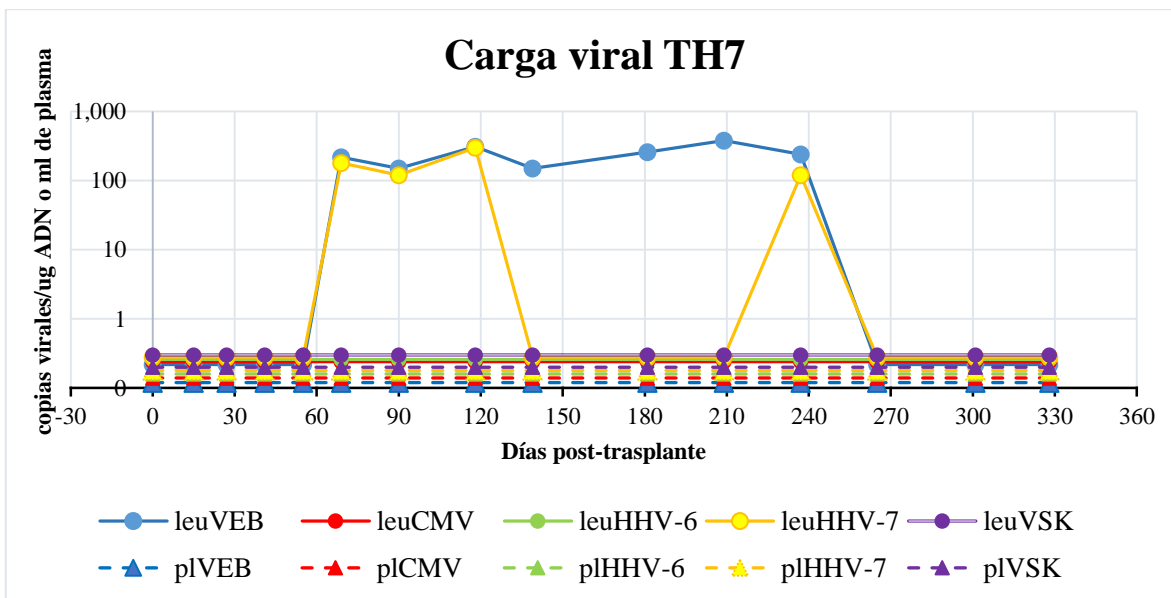
Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TH4, quien presentó una carga positiva para el VEB. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.



Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TH5, quien presentó cuatro cargas positivas, dos para el HHV-6, una para el VEB y una para el CMV. Presentó un evento de coinfección entre el HHV-6 y el VEB. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.

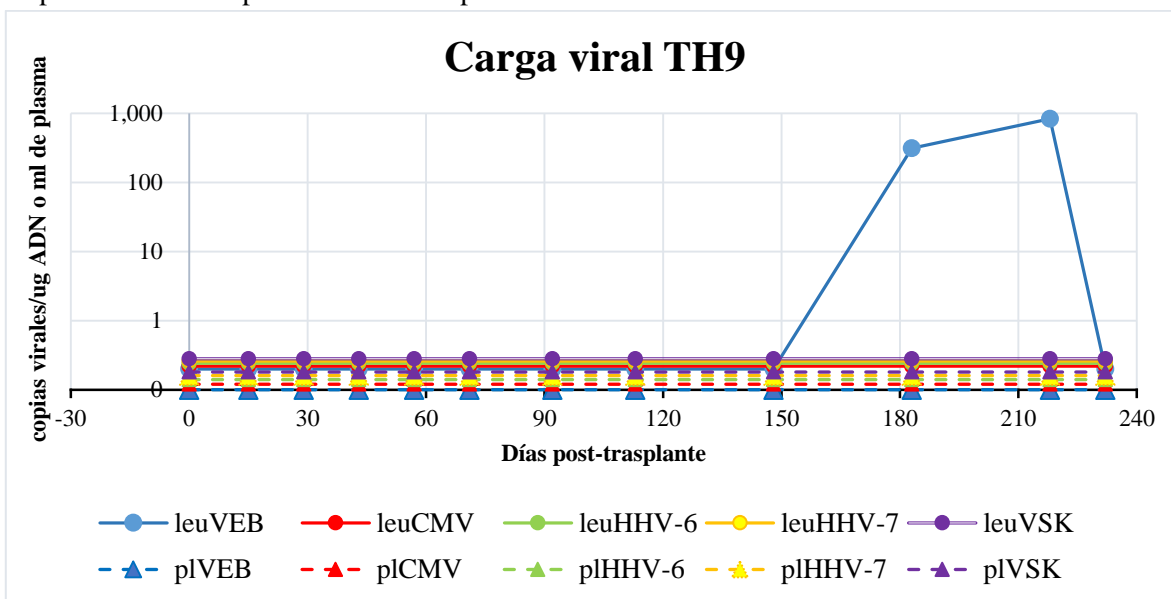


Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TH6, quien presentó seis cargas positivas para el HHV-7, cinco de las cuales fueron continuas. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.



Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TH7, quien presentó once cargas positivas, siete para el VEB y cuatro para el HHV-7. Presentó diez cargas continuas siete para el VEB y tres para el HHV-6. Presentó cuatro eventos de coinfección entre el VEB y el HHV-7. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.

El paciente TH8 no presentó muestras positivas.



Cargas virales de los cinco herpesvirus del paciente TH9, quien presentó dos cargas positivas y continuas para el VEB. En el eje de la “X” se grafican los días post-trasplante en los que se obtuvieron cada una de las muestras. En el eje de las “Y” se grafica la carga viral en copias virales por μg de ADN. Los círculos con líneas continuas representan las cargas virales en leucocitos (leu), los triángulos con líneas discontinuas representan las cargas virales en plasma (pl), el color define a cuál herpesvirus pertenece esa carga viral.

12.4. Cuadro comparativo de los herpesvirus humanos.

Virus	Sub-familia	Género	Tamaño en Kb	Tropismo	Seroprevalencia	Vía de Propagación	Replicación	Principales asociaciones clínicas
VEB	Gamma	Linfocriptovirus	184	Principalmente linfocitos B, también puede infectar células epiteliales, linfocitos T, células NK.	Más del 90% de los adultos son seropositivos.	Saliva.	Se replica en células epiteliales de la orofaringe y establece una latencia a largo plazo en linfocitos B de memoria.	Linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfomas de células T y de células NK, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma gástrico y enfermedad linfoproliferativa post-trasplante.
CMV	Beta	Citomegalovirus	241	Células epiteliales, endoteliales, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas.	Entre el 52-99% de los adultos son seropositivos.	Saliva, orina, semen o secreciones cervicales.	Se replica en células epiteliales de glándulas salivales y renales, mientras que de manera latente se aloja en células progenitoras hematopoyéticas.	Neuroblastomas, gliomas, sarcoma de Kaposi, carcinoma de colon, adenocarcinoma de próstata, carcinoma cervical, tumor de Wilm's, linfoma cutáneo de células T y enfermedad por citomegalovirus.
HHV-6	Beta	Roseolovirus	170	Principalmente linfocitos T, también puede infectar linfocitos B, monocitos/macrófagos, células NK, linfocitos T γ/δ , células dendríticas y células endoteliales.	Infecta a más del 90% de las personas en los primeros 9 meses de vida.	Saliva.	Los linfocitos T CD4+ representan la población celular en la que el HHV-6 se replica de manera más eficiente. Los sitios candidatos para la persistencia son las glándulas salivales, tejido cerebral, monocitos y células progenitoras de la médula ósea.	Linfoma No-Hodgkin, enfermedad linfoproliferativa crónica de células T, carcinoma de glándulas salivares, exantema súbito, síndrome de fatiga crónica, esclerosis múltiple, meningoencefalitis, neumonitis, hepatitis, aplasia medular rechazo de riñón.
HHV-7	Beta	Roseolovirus	145-153	Principalmente linfocitos T CD4+.	Infecta entre el 60-90% de la población.	Saliva.	Se cree que el sitio de infección latente es en los linfocitos T y que las células epiteliales de la glándula salival son el sitio de infección productiva y de esparcimiento viral.	Exantema súbito, altas fiebres, citopenia, leucopenia, hepatitis, linfadenopatías y síntomas neurológicos como convulsiones febriles.
VSK	Gamma	Rhadinovirus	165-170	Células endoteliales, linfocitos T y B, dendríticas, queratinocitos y fibroblastos.	Varía entre áreas geográficas, en países no endémico es de entre 1 a 3%. En países endémicos va desde 20% hasta 70%.	Sexual y materno-fetal.	Puede persistir en estado latente a niveles indetectables en los linfocitos B y monocitos circulantes.	Sarcoma de Kaposi, enfermedad multicéntrica de Castleman y linfoma de efusión primario.