



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**RELACIÓN ENTRE VIRUS ONCOGÉNICOS DE LAS FAMILIAS
HERPESVIRIDAE Y RETROVIRIDAE Y LA PRESENCIA DE
LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA INFANTIL
CON RE-ARREGLOS GÉNICOS ETV6-RUNX1 O MLL-AF4**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
ABIGAIL MORALES SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL:
DR. JUAN MANUEL MEJÍA ARANGURÉ
FACULTAD DE MEDICINA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. CESAR RAÚL GONZALEZ BONILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DR. PATRICIO GARIGLIO VIDAL
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO D. F. AGOSTO DE 2014



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.

Agradecimientos

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la oportunidad de pertenecer a su distinguido programa y por los apoyos económicos otorgados mediante el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (No. de becario: 210493).

Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por la beca otorgada (No. de becario: 2011-009) y por el financiamiento otorgado para realizar esta tesis mediante el protocolo “Relación entre factores ambientales y el rearreglo génico TEL/AML1 en el desarrollo de la leucemia aguda infantil” con No. de Registro 2009-785-001 y en el FIS FIS/IMSS/PROT/G10/846.

A mi tutor principal:

Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré

A mi comité tutor:

Dr. César R. González Bonilla y Dr. Patricio Gariglio Vidal

A mi tutor invitado:

Dr. Ezequiel M. Fuentes Pananá.

Este trabajo no hubiera sido posible sin su co-dirección.

Agradecimientos

A la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría, CMN SXXI, IMSS, por haberme permitido realizar la mayor parte de mis experimentos en sus instalaciones. Gracias al jefe de la Unidad: Dr. Javier Torres Lopez.

A la Unidad de Investigación en Virología y Cáncer del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” por permitirme usar sus instalaciones durante la parte final del proyecto.

A mi tutor, el Dr. Ezequiel Fuentes Pananá por recibirme en su laboratorio y guiar este trabajo de principio a fin. Gracias por tu tiempo y dedicación en formarme como investigadora. Sobre todo gracias por tu ejemplo.

A las Dras. Martha Ruiz y Ericka Pompa por su valiosa colaboración en el proyecto.

*A mi familia por ser parte fundamental
en la realización de este trabajo.
Gracias por el apoyo que me han dado
siempre en todos los aspectos de mi vida.*

*Especialmente dedicada a mi mamá
por ser además de madre: amiga, guía,
apoyo incondicional y ejemplo de vida.*

CONTENIDO

	Pág.
Índice de tablas y figuras.....	3
Índice de abreviaturas.....	4
Resumen.....	6
Abstract.....	7
1. Introducción y planteamiento del problema.....	8
1.1 Biología y Epidemiología de la Leucemia Aguda Linfoblástica Infantil (LAL).....	8
1.2 Re-arreglos génicos ETV6-RUNX1 y MLL-AF4.....	9
1.3 Virus oncogénicos humanos y sus mecanismos de acción.....	11
1.4 Carcinogénesis directa vs indirecta.....	14
1.5 Virus oncomoduladores.....	17
1.6 Infecciones virales en la etiología de la LAL Infantil. Hipótesis y evidencias.....	18
1.6.1 Hipótesis de la infección tardía de Greaves.....	19
1.6.2 Hipótesis de las mezclas poblacionales de Kinlen.....	21
1.6.3 Hipótesis de la leucemogénesis viral directa de Smith.....	23
1.7 Virus oncogénicos candidatos en el desarrollo de LAL Infantil.....	26
1.7.1 Familia Herpesviridae.....	26
1.7.2 Familia Retroviridae.....	29
2. Justificación.....	32
3. Objetivos.....	33
4. Materiales y métodos.....	34
Estrategia metodológica.....	34
4.1 Declaración de ética.....	35
4.2 Pacientes y muestras biológicas.....	35
4.3 Obtención de DNA control.....	37
4.3.1 Cultivo celular.....	37
4.3.2 Clonación de fragmentos génicos virales.....	37
4.3.3 Obtención de linfocitos de ratón.....	38
4.4 Detección de genomas virales.....	39
4.4.1 Purificación del DNA de las muestras.....	39
4.4.2 Diseño de iniciadores.....	39
4.4.3 Estandarización de las PCRs.....	40
4.4.4 PCR estándar y anidada.....	40
4.5 Secuenciación de nucleótidos.....	43
4.6 Análisis estadístico.....	43
5. Resultados.....	44
5.1 Estandarización de técnicas de detección.....	44
5.1.1 Diseño de iniciadores.....	44
5.1.2 Infección de linfocitos.....	45
5.1.3 Clonación de fragmentos génicos virales.....	46

5.1.4 Estandarización de las PCRs.....	48
5.1.5 Establecimiento del límite de detección.....	48
5.2 Búsqueda de genomas virales en muestras biológicas.....	53
5.2.1 Población de estudio.....	53
5.2.2 Detección de genomas de herpesvirus.....	54
5.2.3 Detección de genomas de retrovirus.....	57
5.2.4 Análisis estadístico.....	59
5.2.5 Análisis de infecciones y pronóstico.....	60
6. Discusión y conclusiones.....	62
7. Referencias.....	70
8. Anexos.....	80
8.1 Anexo 1: Autorización del protocolo de Investigación por las comisiones Científica y Ética del Instituto Mexicano del Seguro Social.	80
8.2 Anexo 2: Carta de consentimiento informado y carta de asentimiento.....	81
8.3 Anexo 3: Soluciones empleadas en la preparación de células competentes DH5α.....	86
8.4 Artículos publicados.....	86

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Frecuencia de leucemia en relación a otros tipos de cáncer infantiles.....	8
Tabla 1. Familias de virus asociados a cáncer en humanos.....	12
Figura 2. Oncogénesis viral directa.	15
Figura 3. Modelo sobre la etiología de la LAL.....	20
Tabla 2. Búsqueda de virus en leucemia infantil.	25
Tabla 3. Clasificación de la LAL de acuerdo a la expresión de marcadores.....	36
Tabla 4. Descripción de los ciclos de amplificación y las secuencias de los iniciadores de cada PCR.....	41
Figura 4. Diseño de iniciadores.	45
Figura 5. Infección de linfocitos con HHV6.	46
Figura 6. Clonación de fragmentos g del genoma de HHV6.	48
Figura 7. Estandarización de PCRs.....	49
Figura 8. Límites de detección en el rastreo de herpesvirus.	50
Figura 9. Límites de detección en el rastreo de retrovirus.	53
Tabla 5. Características clínicas y demográficas de los pacientes.....	55
Figura 10. Detección de EBV en muestras.	55
Figura 11. Detección de HCMV en muestras.	55
Figura 12. Detección de HHV6 en muestras.	56
Figura 13. Diagrama esquemático de la estrategia experimental usada en la detección de retrovirus	57
Figura. 14. Rastreo de HTLV1 en muestras... ..	58
Figura. 15. Rastreo de MMTV en muestras.....	59
Tabla 6. Poder estadístico del estudio.....	60
Tabla 7. Infecciones y factores pronóstico.....	61

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AML1: Del inglés Acute Myeloid Leukemia

ATCC: American Type Culture Collection

BLAST: Del inglés Basic Local Alignment search tool

CALLA: Del inglés common antigen of acute lymphoblastic leukemia

CCM: Carcinoma de células de Merkel

CBF: Del inglés Core Binding Factor

CD 19: Del inglés cluster of differentiation 19

CD10: Del inglés cluster of differentiation 10

CD20: Del inglés cluster of differentiation 20

HCMV: citomegalovirus

DNA: Del inglés Deoxyribonucleic acid

dNTP: Del inglés deoxynucleotide triphosphates

EBV: Epstein-Barr Virus

EcoRI: Escherichia coli cepa RY13 (enzima de restricción)

ETS: Del inglés E-26 transforming specific

ETV6: ETS variant gene 6

HEPES: Del inglés 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HHV5: Del inglés Human Herpesvirus type 5

HHV6: Del inglés Human Herpesvirus type 6

HLH: Del inglés helix-loop-helix

HMTV: Del inglés Human mammary tumor virus

HTLV1: Del inglés Human T-cell lymphotropic virus type 1

IE1: Del inglés immediate early type 1

IE2: Del inglés immediate early type 2

IgC: Inmunoglobulina citoplasmática

IgS: Inmunoglobulina de superficie

IMDM: del inglés Iscove's Modified Dulbecco's Media

IPTG: Del inglés Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

LAL: Leucemia aguda linfoblástica

LAL-B: Leucemia aguda linfoblástica de precursores de células B

LAL-T: Leucemia aguda linfoblástica de precursores de células T

MJ: iniciales de la persona de quien fue establecida la línea celular

MLL: Del inglés Mixed-lineage leukemia

MMTV: Del inglés Murine mammary tumor virus

NdeI: *Neisseria denitrificans* tipo 1 (enzima de restricción)

PCR: Del inglés Polymerase chain reaction

RDH: Del inglés Runt Homology Domain

RPMI: Del inglés Roswell Park Memorial Institute (medio de cultivo)

RUNX1: Del inglés Runt-related transcription factor 1

SOC: Del inglés Super Optimal Broth (medio de cultivo)

TGF- β 1: Del inglés Transforming growth factor beta type 1

Tm: Del inglés Temperature melting

TRX: Del inglés TRITHORAX

x-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

RESUMEN

Introducción y planteamiento del problema: Las leucemias agudas representan alrededor del 30% de todos los cánceres vistos en niños en el mundo occidental. México ha reportado una de las incidencias más altas a nivel mundial. La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es una enfermedad maligna que ocurre como consecuencia de la transformación de una sola célula durante una etapa de la hematopoyesis linfóide la cual ocurre en la médula ósea. La LAL se asocia a aberraciones cromosómicas tales como re-arreglos génicos, los cuales a menudo representan factores pronósticos importantes. El re-arreglo génico ETV6-RUNX1 [t(12;21)(p13;q22)], también conocido como TEL-AML1 es el más común a nivel mundial y se considera de bajo riesgo y buen pronóstico. La translocación cromosómica MLL-AF4 [t(4;11)(q21;q23)] está asociada a un subgrupo de leucemias especialmente agresivas, ya que confiere mal pronóstico y recaída temprana. Entre todos los casos de leucemia, a nivel mundial su frecuencia se sitúa entre el 1-5% en niños mayores de un año y entre el 70 y 80% en niños menores de un año. Se ha mostrado la presencia de translocaciones en muestras de sangre neonatales de niños que desarrollaron leucemia en algún momento de la edad pediátrica. A partir de dichos estudios, ha sido aceptado que las alteraciones genéticas establecen una clona pre-leucémica, la cual requiere eventos oncogénicos secundarios para dar origen a una clona maligna. Dentro de los factores adicionales que intervienen en su aparición, se ha propuesto que las infecciones podrían jugar un papel importante, en este sentido, una hipótesis plausible es que, agentes infecciosos oncogénicos o asociados a procesos de oncogenicidad sean capaces de infectar células troncales, progenitoras y/o precursoras de linfocitos B y T, y una vez dentro de dichas células promuevan el proceso de transformación. Los herpesvirus humanos, EBV, HCMV y HHV6; y los retrovirus HTLV1 y MMTV fueron considerados agentes infecciosos atractivos para nuestra investigación ya que presentan tropismo por linfocitos B y T, han sido asociados a translocaciones cromosómicas, se transmiten en etapas tempranas de la vida e importantemente, son virus clasificados como oncogénicos, oncomoduladores o cofactores clave en el desarrollo del cáncer. **Objetivo:** Analizar la participación de las infecciones por los herpesvirus EBV, HCMV y HHV6 y los retrovirus HTLV1 y MMTV en la aparición de la LAL infantil y medir su asociación con la presencia de los re-arreglos génicos ETV6-RUNX1 y MLL-AF4. **Resultados:** Se trabajó con 70 muestras de médula ósea provenientes de niños con diagnóstico *de novo* de LAL. En relación a los herpesvirus, sólo se encontraron muestras positivas mediante PCR anidada (EBV=14%, HCMV=19% y HHV6=9%), sin embargo, debido a que la PCR anidada es altamente sensible, estos resultados indican que los genomas virales no estuvieron presentes en la mayoría de las células leucémicas y por lo tanto que las infecciones no fueron parte de las lesiones genéticas que condujeron a la transformación celular. Por lo anterior, los resultados obtenidos, no apoyan la participación directa de los herpesvirus analizados en la leucemogénesis. Un análisis adicional mostró que las infecciones y co-infecciones detectadas por PCR anidada no estuvieron asociadas al pronóstico de la enfermedad. Respecto a los retrovirus HTLV1 y MMTV, no se encontraron muestras positivas mediante PCR estándar ni anidada. Ya que el poder estadístico del estudio fue alto, los resultados sugieren que los agentes analizados no están involucrados en el desarrollo de LAL infantil. Los re-arreglos génicos ETV6-RUNX1 y MLL-AF4 fueron detectados en el 12% y 0% de las muestras respectivamente. Debido a los resultados obtenidos no fue posible hacer un análisis de asociación entre los eventos de infección y la presencia de las anomalías cromosómicas. **Discusión y conclusiones:** En este estudio se reporta por primera vez la falta de evidencia sobre la participación de los herpesvirus EBV, HCMV y HHV6 y los retrovirus HTLV1 y MMTV en el desarrollo de LAL en niños mexicanos. Los siguientes trabajos deberán enfocarse en el uso de herramientas de secuenciación masiva que permitan rastrear el espectro completo de agentes virales descritos y no descritos.

ABSTRACT

Introduction and problem statement: Acute leukemias account for about 30% of all cancers seen in children in the Western world. Mexico has reported one of the highest incidences in the world. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant disease resulting from a single cell transformation in the bone marrow during lymphopoiesis. ALL is associated with chromosomal aberrations such as gene rearrangements, which often represent important prognostic factors. ETV6-RUNX1 gene rearrangement [t(12;21)(p13;q22)], also known as TEL-AML1, is the most common worldwide and confers low risk and good prognosis. MLL-AF4 chromosomal translocation [t(4;11)(q21;q23)] is associated with a subgroup of particularly aggressive leukemias; it confers a poor prognosis and early relapse. Among worldwide leukemia cases, MLL-AF4 frequency varies from 1% to 5% in children older than one year and from 70% to 80% in children under one year. It has shown the presence of translocations in neonatal blood samples from children who developed leukemia at some point in the pediatric age. From these studies it has been accepted that genetic alterations establish a pre-leukemic clone, which requires secondary oncogenic events to give rise to a malignant clone. Infections have been proposed to play an important role among the additional factors involved in the malignant clone appearance. In this regard, a plausible hypothesis is that cancer associated infectious agents are capable of infecting B- and T-cells precursors and promote their transformation. The present work is oriented in this hypothesis. EBV, HCMV and HHV6 human herpesviruses as well as HTLV1 and MMTV retroviruses were considered attractive candidates for our research as they have B and T lymphocyte tropism, have been associated with chromosomal translocations, are transmitted early in life, and importantly, are classified as oncogenic, oncomodulator or cofactors in cancer development. **Objective:** To analyze the involvement of infections by EBV, HCMV and HHV6 human herpesviruses and HTLV1 and MMTV retroviruses in the genesis of childhood ALL and to measure their association with the presence of ETV6-RUNX1 and MLL-AF4 gene rearrangements. **Results:** 70 bone marrow samples from pre-treatment children diagnosed with ALL were included in the study. In the case of herpesviruses, positive samples were detected only by nested PCR (EBV=14%, HCMV=19% and HHV6=9%); however, as nested PCR is highly sensitive, these results indicated that the viral genomes were not present in most of the leukemic cells contained in the samples and thus that the infections were not part of the genetic lesions that lead to cell transformation. Thus, our data did not support their involvement in leukemogenesis. Additional analysis showed that detected infections or co-infections were not associated with prognosis. Regarding HTLV1 and MMTV retroviruses, positive samples were not detected by neither standard nor nested PCR. Since the confidence of the study was high, the results supported that the viruses tested are not involved in development of childhood ALL. ETV6-RUNX1 and MLL-AF4 gene rearrangements were detected in 12% and 0% of samples respectively. Because of that, it was not possible to analyze the association between infection events and the presence of chromosomal abnormalities. **Discussion and conclusions:** This study documents for the first time the lack of evidence for the involvement of EBV, HCMV and HHV6 herpesviruses and HTLV1 and MMTV retroviruses in the development of ALL in Mexican children. Future studies should focus on the use of next generation sequencing tools that allow tracing the full spectrum of known and unknown viral agents.

1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Biología y Epidemiología de la Leucemia Aguda Linfoblástica Infantil

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) constituye una enfermedad clonal, es decir, es consecuencia de la transformación maligna de una sola célula durante una etapa de la hematopoyesis linfoide. Se expresa por una detención en la diferenciación celular y por la proliferación no controlada de células malignas que se originan en la médula ósea y luego se diseminan a sangre periférica, bazo, ganglios y al resto de los tejidos (revisado en [1]). De acuerdo a modelos recientes, una clona de células pre-leucémicas es generada por una primera mutación *in utero*, que en una minoría de los niños progresa a leucemia después de recibir “hits” oncogénicos posnatales [2].

Gracias a la efectividad de las terapias, las tasas de supervivencia libre de enfermedad a 5 años han llegado a ser de más del 80% [3]. Sin embargo, los esfuerzos continúan en relación a la mejora en la efectividad de los tratamientos, sobre todo en aquellos subtipos de leucemia que son especialmente agresivos, siendo el principal objetivo de la comunidad científica y médica prevenir la enfermedad.

La LAL abarca alrededor del 80% de los casos de leucemia a nivel mundial, representando así la neoplasia más frecuente de la infancia (Fig. 1) [4].

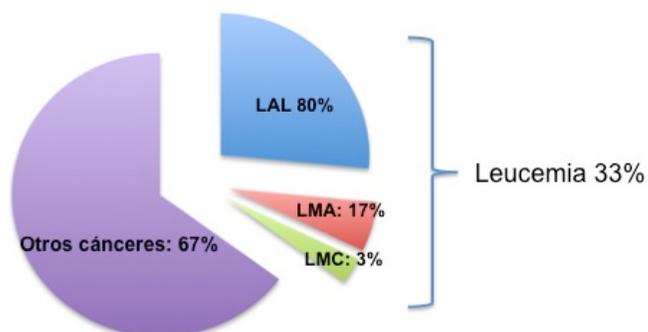


Figura 1. Frecuencia de leucemia en relación a otros tipos de cáncer infantiles. La leucemia comprende el 33% de todos los casos de cáncer y dentro de ella, la LAL es el subtipo más frecuente abarcando alrededor del 80% de los casos.

A nivel mundial se ha observado un aumento en los casos de LAL, importantemente, en la Ciudad de México se ha registrado un dramático incremento, siendo que, en 1982 se reportaron 7.75 casos por millón en niños menores de 15 años, mientras que de 1996 al 2000, se registró una tasa de 44.9 casos por millón, en el mismo grupo de edad [5-7].

La LAL se asocia a aberraciones cromosómicas tales como re-arreglos génicos, hiper e hipo diploidías. Los re-arreglos génicos involucran la recombinación no homóloga entre cromosomas, lo cual resulta en modificaciones en la expresión de un gen o bien, en la formación de una proteína quimérica alterada; este último evento es lo que más comúnmente ocurre en LAL. Factores de transcripción o proteínas de señalización críticos en el desarrollo de las células madre o en la especificación del linaje durante la hematopoyesis son los principales blancos de corrupción por fusión génica en la leucemia [8]. De manera general, diferentes alteraciones genéticas definen un subtipo biológico de la enfermedad por lo que a menudo representan factores pronósticos importantes.

1.2 Re-arreglos génicos ETV6-RUNX1 y MLL-AF4

El re-arreglo génico ETV6-RUNX1 (también llamado TEL-AML1) que involucra la translocación $t(12;21)(p13;q22)$, presenta una frecuencia de alrededor del 25% a nivel mundial entre el total de casos de LAL [9, 10], sin embargo, en México se ha reportado una frecuencia menor [11-13]. Leucemias ETV6-RUNX1(+) se consideran de bajo riesgo y buen pronóstico.

El gen ETV6 (del inglés ETS variant gene 6) se localiza en la banda 11p13; esta región es inestable y por lo tanto es susceptible a re-arreglos cromosómicos [10], de hecho, se han reportado alrededor de 40 translocaciones involucrando ETV6, tanto en leucemias de origen linfóide como mielóide [14]. ETV6 es una proteína de 452 aminoácidos que pertenece a la familia de factores de transcripción ETS (del inglés E-26 transforming

specific), caracterizados por poseer un dominio de unión a DNA denominado ETS (revisado en [15]). Entre otros, ETV6 también contiene un dominio HLH (helix-loop-helix), el cual, media interacciones proteína-proteína que son responsables de eventos de oligomerización homotípica y heterotípica. En el contexto de una translocación, dichos eventos contribuyen a la alteración en la regulación de la transcripción de manera crucial.

Por otro lado, RUNX1 es un miembro de la familia de factores de transcripción CBF (del inglés, Core Binding Factor). Los ratones deficientes de este gen ven comprometidos los procesos de desarrollo linfóide y mielóide sobre todo en la etapa adulta [16-18], ello refleja su importante contribución en diferentes niveles de la hematopoyesis. Su unión a DNA ocurre a través del dominio conservado RDH (Runt Homology Domain) en la región amino terminal. La región C-terminal contiene múltiples dominios de unión a complejos transactivadores como p300-CBP, con los cuales regula positivamente la expresión de genes [19]. Alternativamente, RUNX1 puede asociarse a complejos como mSin3A/HDAC y Groucho/TLE y reprimir la expresión génica [20, 21]. En el contexto de la proteína quimérica ocurre la formación de complejos homodiméricos u oligoméricos que propician una represión constitutiva de genes [22].

La translocación cromosómica MLL-AF4 [t(4;11)(q21;q23)] constituye una alteración genética asociada a un subgrupo de leucemias altamente resistentes al tratamiento quimioterapéutico por lo que confiere mal pronóstico [23, 24]. El gen MLL (del inglés, Mixed Linage Leukemia), codifica para una proteína homóloga a TRX (TRITHORAX, de *Drosophila*) y es capaz de regular, a través de su actividad metil-transferasa de histonas, la transcripción de genes HOX, los cuales están involucrados tanto en el patrón de desarrollo como en la diferenciación hematopoyética (revisado en [25]).

Respecto al gen AF4 se ha mostrado que presenta señales de localización nuclear y probablemente su actividad sea de transactivador [26]. Se ha demostrado que las quimeras MLL contribuyen en el fenotipo de la leucemia al influir en las rutas de diferenciación de células hematopoyéticas no comprometidas o progenitores tempranos [27].

A nivel mundial, la frecuencia de la translocación MLL-AF4 se sitúa entre el 1 y el 5% en niños mayores de un año y entre el 70 y 80% en niños menores de un año (lactantes) [28-31]. La diferencia entre las frecuencias de esta translocación de acuerdo a la edad, no se entiende completamente. La caracterización inmunológica de diferentes tipos de leucemias MLL-AF4 positivas ha mostrado que en los lactantes hay una mayor frecuencia de poblaciones celulares con receptores de antígeno no re-arreglados, inmaduros u oligoclonales [32, 33]. Se ha propuesto que las poblaciones celulares que son blanco de la translocación, son más primitivas en lactantes en comparación con los niños mayores de un año y que por lo tanto mantienen un alto potencial proliferativo que las hace más susceptibles a la transformación [34].

Importantemente, un estudio preliminar reciente llevado a cabo en la Cd. de México mostró que MLL-AF4 ocurrió en el 65% (17/26) de los niños con LAL mayores de un año [11].

1.3 Virus oncogénicos humanos y sus mecanismos de acción

Actualmente, siete agentes virales han sido consistentemente asociados a diferentes tipos de cáncer en humanos: los herpesvirus Epstein Barr virus (EBV) y herpesvirus humano de sarcoma de kaposi (KSHV por sus siglas en inglés); los papilomavirus humanos (HPV por sus siglas en inglés) de alto riesgo; el virus linfotrópico de células T humano tipo 1 (HTLV1 por sus siglas en inglés); los virus asociados a hepatitis B y C (HBV y HCV por sus siglas

en inglés) y el poliomavirus de células Merkel (MCPV por sus siglas en inglés) (tabla 1) [35]. Se estima que las infecciones son responsables de hasta el 15% de todos los casos de cáncer a nivel mundial y en países en desarrollo de más del 20% [36]. Sin embargo, las evidencias epidemiológicas y experimentales que condujeron a las asociaciones virus-cáncer han sido sometidas a riguroso escrutinio científico debido a que los procesos biológicos involucrados no se ajustan a los principios de causalidad considerados dogmáticos. Por ejemplo, EBV es un herpesvirus ubicuo [37], sin embargo, el linfoma de Burkitt asociado a la infección por EBV es endémico de África Ecuatorial [38], este hecho no coincide con el postulado de Koch que establece: “El agente patógeno debe estar presente en la población enferma y ausente en la población sana” [39].

Tabla 1. Familias de virus asociados a cáncer en humanos.

Virus humano	Tumores asociados	Ref.
EBV	Linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfomas relacionados a inmunosupresión, linfomas de células T y NK, carcinomas nasofaríngeo y de estómago	Revisado en [40]
KSHV	Sarcoma de Kaposi, linfoma efusivo primario y enfermedad multicéntrica de Castleman	[41]
HPVs de alto riesgo	Cáncer cervical, carcinomas del tracto anogenital y de cabeza y cuello	Revisado en [42]
MCPV	Carcinoma de células de Merkel	[43]
HBV	Carcinoma hepatocelular	[44]
HCV	Carcinoma hepatocelular	[45]
HTLV1	Leucemia/linfoma de células T del adulto	[46]

Los virus oncogénicos generalmente mantienen infecciones que persisten durante toda la vida del individuo infectado. Una estrategia viral común para lograr la persistencia es el establecimiento de infecciones latentes, en las cuales no hay producción de partículas virales. La latencia viral es biológicamente compatible con el proceso carcinogénico ya que evita la lisis celular que ocurre durante la infección lítica que caracteriza a las infecciones agudas, a la vez que mantiene al agente infeccioso oculto del sistema inmune [35]. La persistencia del virus en el hospedero se logra integrando el genoma viral en el genoma celular, expresando proteínas que bloquean los mecanismos de muerte celular y/o que inducen proliferación celular (revisado en [47]). Sin embargo, en condiciones normales la infección debe mantenerse en un número limitado de células para establecer un equilibrio entre el virus y el hospedero, de manera que la integridad de ninguno de ellos se vea comprometida.

Todos los tipos de tumores que se relacionan con la transformación viral resultan de la cooperación de distintos eventos que involucran no sólo la infección persistente y los mecanismos de immortalización virales, sino de la presencia de “hits” oncogénicos adicionales. La ocurrencia de mutaciones que promueven la pérdida del control de la regulación de oncogenes virales y/o celulares es una condición necesaria en el proceso carcinogénico. De hecho, frecuentemente se observa en células tumorales de origen viral, un aumento en la tasa de mutación respecto a células normales, lo que apoya esta noción [48, 49]. Este hecho apoya que los eventos de transformación celular no son estrategias virales evolutivas, sino más bien accidentes biológicos que ocurren raramente en la interacción virus-hospedero, ya que el tumor que conduce a la muerte del individuo también representa el final del virus. La existencia de oncogenes virales se explica como parte de los mecanismos de preservación del virus en el hospedero. El agente induce la entrada al ciclo celular con el fin de asegurar su replicación y así mantener un número de

células que porten el genoma viral. Sólo bajo condiciones alteradas la infección viral conduce al cáncer (revisado en [35]).

Los mecanismos oncogénicos virales generalmente incluyen inducción de la proliferación, resistencia a la muerte celular y frecuentemente están acompañados de mecanismos de evasión de la respuesta inmune antiviral [50]. La generación de inestabilidad cromosómica es una ruta carcinogénica común de muchos virus transformantes. Dicho proceso conduce a amplificaciones y deleciones de genes o regiones cromosómicas completas; cambios en el número de cromosomas (poliploidía y aneuploidía) y fusión aberrante de cromosomas no homólogos (translocaciones). Por ejemplo, el virus HPV promueve inestabilidad genómica a través de sus oncoproteínas. Se ha mostrado que E6 y E7 de HPV promueven amplificación génica, alteraciones cromosómicas estructurales y errores en la replicación de los centrosomas que conduce a aneuploidía y poliploidía. Líneas celulares immortalizadas con HPV se caracterizan por la ganancia y pérdida de cromosomas completos [51-54]. Adicionalmente, se ha mostrado que lesiones tempranas no invasivas asociadas a la infección por este virus presentan aneuploidía (revisado en [55]).

Agentes virales no sólo contribuyen en el desarrollo de la enfermedad de forma directa, sino también actúan indirectamente o como cofactores a través de inducir inmunosupresión o inflamación crónica que conduce a cáncer (ver apartado 1.4). También existe evidencia de su participación en la modulación del curso biológico de un tumor ya establecido (ver apartado 1.5).

1.4 Carcinogénesis directa vs indirecta

De acuerdo a los diferentes mecanismos por los que contribuyen al proceso de transformación, los agentes infecciosos han sido clasificados como carcinogénicos

directos o indirectos [56]. Los agentes carcinogénicos directos, se encuentran en cada una de las células que forman el tumor y mantienen el fenotipo tumoral a través de la expresión de oncogenes virales [56]. Por ejemplo, los oncogenes E6 y E7 de HPV inducen la degradación de p53 y pRb, respectivamente. E6 cataliza la degradación de p53 mediante su unión a la proteína ligasa de ubiquitina E6AP (del inglés E6-associated protein); el complejo E6/E6AP se une a la región central de p53, la cual es ubiquitinada y posteriormente degradada en el proteosoma [57, 58]. E6 también bloquea al inhibidor del ciclo celular p16INK4, lo cual induce un incremento en la proliferación celular [59]. E7 induce directamente la liberación de E2F1-3 del complejo pRb/E2F1-3, E2F1-3 a su vez, activa la expresión de varios genes involucrados en la progresión del ciclo celular tales como las ciclinas E y A [60, 61].

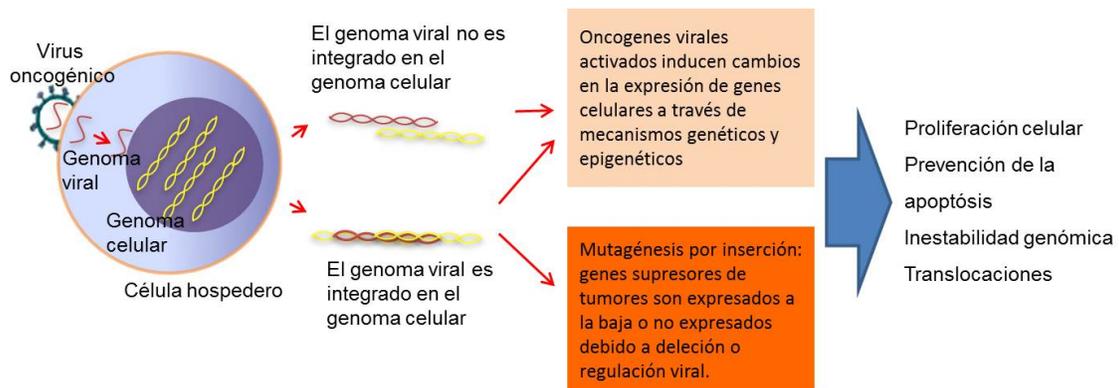


Figura 2. Oncogénesis viral directa. Después de la infección de la célula y la entrada al núcleo, los virus que promueven el proceso carcinogénico de forma directa actúan por varios mecanismos que incluyen la expresión de oncogenes virales y la mutagénesis por inserción en el caso de agentes cuyo ciclo de replicación requiere la integración de su genoma al del huésped.

Otro mecanismo de oncogénesis directa ocurre a través de mutagénesis por inserción [56]. Los retrovirus, cuyo ciclo de vida requiere integrar su genoma viral al del hospedero, son virus que principalmente transforman a partir de este mecanismo [62]. El genoma viral integrado se conoce como provirus y se comporta como un elemento genético que se

duplica durante el ciclo celular, persistiendo por toda la vida de la célula infectada y heredándose a la progenie celular [63].

Para los agentes carcinogénicos indirectos, hospedarse en la célula que formará la masa tumoral, no es una condición necesaria para la transformación [56, 64]. Una de las vías principales de transformación de dichos agentes es la inflamación crónica, la cual conduce al desarrollo de cáncer -entre otros mecanismos- a través de la estimulación de la proliferación y supervivencia celular mediadas por citocinas y quimiocinas inflamatorias. Por ejemplo, la citocina IL-6, secretada por células del linaje mieloide, conduce a la activación del factor de transcripción STAT3, el cual regula positivamente la expresión de las ciclinas D1, D2 y B así como del proto-oncogen *myc* y por lo tanto promueve la proliferación celular [65-68]. Adicionalmente, al inducir la expresión de genes antiapoptóticos tales como BCL2 y BCL2L1, STAT3 promueve la supervivencia celular [67-69]. De esta manera, la señalización de IL-6 y STAT3 ha sido asociada a la tumorigénesis de pulmón, hígado, estómago, colon y páncreas [65-69]. Por otro lado, es completamente aceptado que la inflamación crónica induce inestabilidad genómica por varios mecanismos entre los que destacan: la sobre-expresión de proteínas con el potencial de inducir mutaciones (tales como citidina deaminasas), mediada por la señalización de varias citocinas inflamatorias que incluyen: TNF, IL-1 β , IL4, IL13 y TGF β [70-73] y el daño al DNA producido por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno secretadas por macrófagos y neutrófilos tisulares [74-76]. Por ejemplo, se sabe que la bacteria *Helicobacter pylori*, principal agente causal de cáncer gástrico, estimula al epitelio gástrico a secretar IL8, la cual atrae y activa a neutrófilos y macrófagos favoreciendo un microambiente poblado de leucocitos y altas concentraciones de citocinas pro-inflamatorias tales como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-12 [77]. Neutrófilos y macrófagos liberan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que inducen mutaciones en la mucosa gástrica.

Aunque todos los virus oncogénicos mantienen infecciones persistentes, el papel de la respuesta inflamatoria en la carcinogénesis está menos entendido. La inflamación inducida por HBV y HCV correlaciona con necrosis y regeneración del tejido que eventualmente progresa a lesiones pre-neoplásicas como esteatosis, fibrosis y cirrosis; se ha observado que durante estos eventos, el hígado presenta un infiltrado importante de células inmunes que secretan grandes cantidades de citocinas inflamatorias entre las que destacan TGF- β e IL-1 β [78], las cuales podrían tener un papel importante en el desarrollo del cáncer hepático [79, 80].

La otra vía principal de carcinogénesis indirecta es la inmunosupresión que reduce o elimina la vigilancia inmune anti-tumoral que en condiciones normales permite eliminar a las células alteradas y potencialmente tumorales [64]. El ejemplo mejor entendido de oncogénesis a través de inmunosupresión se relaciona al virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [81]. Pacientes con infección no controlada y baja cuenta de linfocitos T citotóxicos frecuentemente desarrollan tumores, entre los cuales se encuentran: linfomas positivos a EBV, linfomas y sarcomas positivos a KSHV, carcinomas de cérvix, cabeza y cuello producidos por HPV y el carcinoma de células de Merkel causado por MCPV [82]. Debido a estas características, VIH está clasificado como carcinogénico indirecto. Nótese que aún en neoplasias asociadas a inmunosupresión, el mecanismo de transformación de EBV, KSHV, HPV y MCPV sigue siendo directo.

1.5 Virus oncomoduladores

Existe evidencia de que agentes infecciosos virales no sólo participan en el proceso carcinogénico, sino que también modulan el curso biológico de un tumor ya establecido. El término oncomodulador fue postulado por el grupo de Jindrich Cinatl Jr. para describir el papel de HCMV en la progresión tumoral [83]. HCMV es un herpesvirus ubicuo cuya

prevalencia mundial se encuentra entre 50 a 100% en la población adulta, la infección normalmente es asintomática y sólo en condiciones de inmunosupresión produce enfermedad [84, 85].

A la fecha no existe evidencia que HCMV sea capaz de participar en el proceso de transformación, no obstante, puede infectar células tumorales y modular el proceso maligno a través de la expresión de genes virales que afectan vías de señalización relacionadas con procesos celulares como proliferación, sobrevivencia, angiogénesis, invasividad y la respuesta inmune al tumor, de manera que la agresividad del tumor se ve importantemente incrementada [86-90]. El mejor ejemplo conocido es su participación en gliomas de alto grado que es un cáncer de cerebro de extremadamente mal pronóstico; el genoma y proteínas de HCMV han sido encontrados con mayor frecuencia en gliomas que en otros tumores del sistema nervioso central y que en muestras de cerebro de otros padecimientos como epilepsia, sin embargo, se ha establecido que aunque HCMV reside en el tumor, sólo infecta una fracción de las células tumorales y no presenta monoclonalidad, por lo que no participa en la carcinogénesis [91-93].

1.6 Infecciones virales en el desarrollo de la LAL Infantil. Hipótesis y evidencias.

La hipótesis sobre una etiología infecciosa de la leucemia infantil fue planteada por primera vez hace varias décadas. La propuesta inicial surgió con base en conocimientos previos sobre otros cánceres infecciosos: la mayoría de las leucemias espontáneas que ocurren en animales domésticos (aves, gatos, vacas) tienen un origen viral; la leucemia/linfoma de células T del adulto (ATL por sus siglas en inglés) es causada por el retrovirus HTLV1 y EBV es el agente etiológico del linfoma de Burkitt (revisado en [94]). A pesar de que a la fecha no se ha podido demostrar la participación de algún o algunos agentes infecciosos en particular, tres diferentes hipótesis -propuestas de manera

independiente- continúan estando vigentes en la base de estudios epidemiológicos y sociodemográficos que han arrojado evidencias sobre la posible participación de agentes infecciosos en la leucemogénesis infantil [95-97].

1.6.1 Hipótesis de la infección tardía de Greaves

Greaves propuso el involucramiento de agentes infecciosos en la etiología de la leucemia infantil hace más de 20 años [95]. El planteamiento más reciente de su hipótesis incluye un modelo de la historia natural de la LLA mínimo de dos eventos oncogénicos, según el cual, un primer evento ocurriendo *in utero* forma una clona pre-leucémica, la cual requiere al menos un evento carcinogénico secundario posnatal para desencadenar la transformación maligna, de acuerdo a la hipótesis de la “infección tardía”, el segundo evento oncogénico podría ser promovido indirectamente por la exposición retardada a un agente infeccioso que cause una respuesta inmune descontrolada y promueva la proliferación anormal maligna de la clona pre-leucémica (fig. 3) [2].

Un número de trabajos que mostraron mayor riesgo de desarrollar leucemia en niños primogénitos, unigénitos y que no son atendidos en guardería en comparación con aquellos fuera de estos grupos, han sido asumidos como evidencia de la hipótesis, al considerar que, al tener menor contacto con otros niños y potencialmente menor frecuencia de exposiciones a agentes infecciosos, la probabilidad de presentar la enfermedad aumentó [98-102].

Sin embargo, otros estudios no han mostrado total apoyo a la hipótesis de Greaves. Datos del grupo de estudio de Ma y colaboradores indicaron que la asistencia a guardería y las infecciones en el oído ocurridas en infantes se asociaron con menor riesgo de LAL, sin embargo esto sólo fue cierto para niños no-hispanos [103].

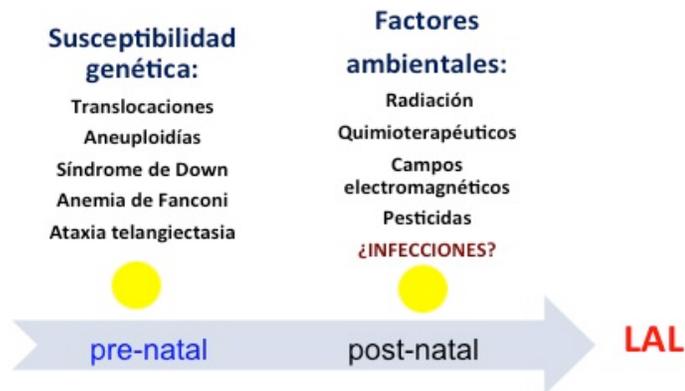


Figura 3. Modelo sobre la etiología de la LAL. Un evento oncogénico pre-natal induce susceptibilidad genética que conduce a la formación de una clona pre-leucémica; este evento es necesario pero no suficiente para el desarrollo de la enfermedad, se requiere de eventos oncogénicos post-natales los cuales son dados por factores ambientales. Se ha propuesto -a partir de evidencias epidemiológicas- que eventos de infección podrían estar involucrados.

Debe considerarse que la propuesta de Greaves está dirigida a la forma común de LAL (células B progenitoras, CD10+), la cual comprende la mayoría de los casos de LAL en el grupo de 2 a 5 años de edad observados en países desarrollados o comunidades afluentes que han mejorado sus condiciones de vida y han llegado a ser “más higiénicas”, por lo tanto, las infecciones relevantes deberían ocurrir en los dos primeros años de vida.

A través de comparaciones internacionales se ha identificado que existen variaciones en los picos de LAL infantil, el pico mencionado de 2 a 5 años es ausente o reducido en africanos negros y otras comunidades en desarrollo [104-106]. En México, por ejemplo, han sido reportados dos picos importantes, el primero de 2 a 3 años y el segundo de 6 a 9 años [107]. Un estudio epidemiológico reciente llevado a cabo en niños con Síndrome de Down residentes de la Ciudad de México, mostró que infecciones graves que requirieron hospitalización en el primer año de vida, fueron asociadas al mayor riesgo de desarrollar leucemia [108]. Una posible interpretación de estos resultados y de otros estudios que

han mostrado que las infecciones en el primer año de vida representan factores de riesgo, es que dichas infecciones podrían estar participando como factores promotores y no como protectores en la leucemogénesis. En principio, ello puede significar que para estas poblaciones, la etiología infecciosa de la leucemia podría ser distinta a lo que ha sido propuesto por Greaves.

1.6.2 Hipótesis de las mezclas poblacionales de Kinlen

Picos de leucemia y linfoma no-Hodgkin infantiles fueron observados a principios de la década de los 80s en Cumbria, Inglaterra [109], y en Dounreay, Escocia [110]; la noción general fue que tal aumento debía ser consecuencia de contaminación radiactiva emitida por las plantas nucleares, la cual debería estar causando mutaciones somáticas o en línea germinal que produjeran el cáncer; sin embargo, no hubo evidencia de fugas de radiactividad o asociaciones epidemiológicas que mostraran mayor riesgo ocupacional parental (Committee on Medical Aspects of Radiation in the Environment, 1986); [111].

Kinlen propuso que los casos de leucemia observados podrían ser un resultado de la inusual mezcla poblacional que ocurría a consecuencia de las migraciones de los trabajadores y sus familias que se movilizaban para laborar en las plantas nucleares, e hipotetizó que un agente infeccioso común pero no identificado podría estar involucrado [96, 112]. De acuerdo a su propuesta, los casos de leucemia infantil serían una rara respuesta de los individuos aislados no infectados y por lo tanto susceptibles ante un agente infeccioso acarreado por los recién llegados.

A partir de la extrapolación de leucemias de origen viral en animales, un subtipo de leucemia en adultos y al considerar que la leucemia infantil no es una enfermedad contagiosa, Kinlen ha propuesto que el agente involucrado podría ser un virus común provocando una respuesta no común [113].

Kinlen probó su hipótesis en una zona rural de Escocia que había recibido gran afluencia. Los resultados del estudio mostraron un aumento significativo en los casos de leucemia en niños menores de 5 años [96]. Otro de sus trabajos mostró que el exceso de leucemia observado fue más elevado en el rango de 0 a 4 años y predominantemente alto en niños menores de 1 año, lo que sugiere una infección durante el embarazo [114]. A la fecha Kinlen y su grupo de trabajo han dirigido diferentes estudios principalmente en Gran Bretaña y Escocia y han observado un significativo incremento en los casos de leucemia infantil durante eventos de mezclas entre poblaciones rurales y urbanas a gran escala y en patrones de contacto inusuales en diferentes comunidades [114-118].

Sin embargo, algunos estudios no han dado sustento a la hipótesis de Kinlen, entre ellos se encuentra el trabajo de Laplanche & de Vathaire [119]; este estudio incluyó todas las comunidades francesas y cubrió el periodo entre 1968 y 1990 durante el cual ocurrió un rápido incremento en la población (el cambio en el tamaño de la población fue utilizado como indicador de la mezcla poblacional). De acuerdo a los resultados, durante el periodo mencionado, la mortalidad por leucemia en niños o adultos jóvenes menores de 25 años fue ligeramente más baja que la frecuencia esperada y no hubo diferencias en el riesgo de acuerdo al incremento del tamaño de la población. Otro trabajo que no apoyó la propuesta de Kinlen fue el de Koushik y colaboradores; fue realizado en Ontario, Canadá e incluyó casos de leucemia registrados entre 1978 y 1992. Como en el anterior, el crecimiento poblacional fue utilizado como indicador de eventos de mezclas poblacionales. Los resultados mostraron que el crecimiento de la población fue asociado con una alta incidencia de leucemia pero sólo en zonas rurales y no en zonas urbanas [118].

Aunque no todos los estudios llevados a cabo en áreas de mezclas poblacionales han correlacionado con “clusters” de leucemia, es relevante que la mayoría si han encontrado

asociación. De acuerdo a sus observaciones, Kinlen ha propuesto que en los casos de influjo poblacional, los adultos son los principales transmisores del agente infeccioso y que una rara respuesta sería más probable cuando más virgen sea el sistema inmune, de esta manera la mezcla poblacional podría ser responsable de los casos de leucemia vistos incluso en el primer año de vida [113]. El autor no ha asociado su hipótesis a un subtipo particular de la enfermedad y ha interpretado que todos los tipos de leucemia infantil podrían tener una causa común [113].

1.6.3 Hipótesis de la leucemogénesis viral directa de Smith

Como ya se ha mencionado, desde la publicación de la hipótesis de la infección tardía de Greaves [95], un cuerpo importante de estudios epidemiológicos realizados por diferentes grupos le dieron apoyo. Sin embargo, para un conjunto de investigadores, entre ellos Malcom Smith, la propuesta no fue completamente convincente.

Smith señaló que de acuerdo a la hipótesis de la infección tardía, en niños que se enfrentaran a infecciones desde el primer año de vida (países en desarrollo), la exposición al agente debería tener un bajo/nulo potencial leucemogénico, mientras que en niños que se infectaran a partir del segundo año de vida (países desarrollados) la exposición al mismo agente sería potencialmente leucemogénico. Este escenario pareció poco probable al investigador sobre todo para los niños de 2 y 3 años, los cuales representan la mayoría del subgrupo de edad 2-5 años y sugirió que debía haber mecanismos alternativos por los cuales la infección condujera a leucemia y que pudieran incluso explicar leucemias del lactante [97].

En 1997 en su publicación: *Considerations on a possible viral etiology for B-precursor acute lymphoblastic leukemia of childhood*, propuso una nueva hipótesis [97]. La hipótesis de Smith postuló que el proceso infeccioso que conduce a leucemia ocurre desde la vida

intrauterina a partir de la transmisión de la madre al feto en mujeres seronegativas o en aquellas en que ocurre un evento de reactivación del agente durante el embarazo. La hipótesis no descarta la posible participación de infecciones que ocurren durante el primer año en hijos de madres seronegativas que no transmitieron anticuerpos a sus hijos. De acuerdo a la hipótesis de Smith, el agente infeccioso actúa a través de un mecanismo directo infectando al linfocito B e iniciando el proceso de transformación celular, el cual es completado con eventos oncogénicos secundarios durante la vida posnatal.

Al considerar que hasta el 30% de los casos de LAL-B se asocian a hiperdiploidia, Smith hipotetizó que el agente implicado debía ser un virus, ya que para estos agentes se han descrito una variedad de mecanismos que promueven inestabilidad genómica. Adicionalmente, el virus debía tener la capacidad de atravesar la placenta e infectar linfocitos B, tener potencial oncogénico limitado y no causar anormalidades severas ya que la LAL no se ha asociado a otros cánceres o malformaciones (revisado en [97]). El poliomavirus JCV (los nombres de los poliomavirus provienen de las iniciales de los pacientes de los cuales fueron aislados por primera vez) fue propuesto como un potencial candidato en virtud de presentar todas las características anteriormente descritas.

Con base a la propuesta original de Smith, la noción de un mecanismo oncogénico directo en la etiología de la leucemia infantil se ha extendido para considerar que la infección con algún agente transformante podría ocurrir en cualquier momento previo a la aparición de la enfermedad; en este sentido, el evento de infección no es necesariamente el primer evento oncogénico. A la fecha, diferentes agentes virales han sido buscados en células leucémicas (tabla 2). Los primeros estudios evidentemente se enfocaron en la detección de poliomavirus. Uno de ellos evaluó la presencia del genoma viral de JCV y BKV en 15 muestras con diagnóstico *de novo* de LAL pre-B [120]. En el segundo estudio se incluyeron 25 muestras y se examinó la presencia del genoma viral de JCV, BKV y SV40

[121]. En ambos estudios, la búsqueda se realizó mediante PCR (punto final y tiempo real respectivamente) sin encontrarse la presencia de algunos de los virus en ninguna muestra (tabla 2).

Tabla 2. Búsqueda de virus en leucemia infantil.

Virus	Subtipo de leucemia	Edad (años)	Tipo de muestra	Método de búsqueda	N	Ref.
Poliomavirus JVC y BKV	LAL-B	1-12	MO o SP	PCR punto final	15	[120]
Poliomavirus JVC, BKV y SV40	LAL-B	2-5	MO	PCR tiempo real	25	[121]
Poliomavirus JVC y BKV	LAL-B LAL-T	0.75-17	SP neonatal Archivada	PCR anidada	50 4	[122]
Herpesvirus EBV y HHV-6	LAL-B LAL-T	0.75-17	SP neonatal archivada	PCR anidada	50 4	[123]
Herpesvirus EBV, HHV-6, -7 y -8	LAL-B	1.5-13	MO or SP	Southern blot (EBV) y PCR convencional y tiempo real (HHV-6, -7 and -8)	47	[124]
Parvovirus B19	LAL-B LAL-T	0.75-17	SP neonatal Archivada	PCR anidada	50 4	[125]
Retrovirus BLV	LAL	≤16	MO and SP	Southern blot	131	[126]
Anellovirus TT	LAL	NE	MO, SP y LCR	PCR anidada, dot blot y Southern blot	28	[127]

Abreviaturas: MO: médula ósea. SP: sangre periférica. LCR: líquido céfalo raquídeo. NE: No especificado.

Otros agentes que se presentaron como candidatos importantes fueron los herpesvirus en función de su potencial transmisión desde los primeros meses de vida e incluso *in utero* e importantemente, debido a la conocida capacidad transformante de algunos de sus miembros (EBV y KSHV) a través de la inducción de inestabilidad genética entre otros mecanismos. Mackenzie y col. se enfocaron en rastrear los genomas de los herpesvirus humanos HHV-4 (o EBV), -6, -7 y -8; analizaron 20 muestras de sangre periférica o médula ósea mediante Southern blot (EBV) y mediante PCR convencional y tiempo real

(HHV-6, -7 y -8). Siete muestras fueron positivas para algunos de los herpesvirus, sin embargo, la baja carga viral indicó que los virus no estaban presentes en cada célula leucémica y por lo tanto que no formaron parte de la lesión inicial [124].

Con base en la hipótesis de una posible infección durante la vida intrauterina, poliomavirus y herpesvirus han sido examinados también a través de estudios retrospectivos que se han dirigido a analizar su presencia en muestras de sangre neonatales de niños que desarrollaron leucemia; a través de estas estrategias no se han detectado muestras positivas a alguno de los agentes [122, 123, 125].

El presente trabajo está basado en la propuesta original de Smith sobre el papel directo de virus oncogénicos en el desarrollo de leucemia infantil [97]. Consideramos que la lista de virus candidatos es grande, sin embargo, los que hemos elegido presentan ciertas características que los hace especialmente atractivos para nuestra investigación, dichas características son descritas en los siguientes apartados.

1.7 Virus oncogénicos candidatos en el desarrollo de LAL Infantil

1.7.1 Familia Herpesviridae

EBV, también conocido como HHV4 (del inglés, Human Herpesvirus type 4), se encuentra presente en individuos sanos, en un porcentaje de entre 90 - 95% de la población mundial adulta. De manera importante para nuestro estudio, se conoce que EBV puede adquirirse desde los primeros años de vida e incluso durante el embarazo [128-132]. EBV es considerado carcinogénico tipo 1. De acuerdo a la Agencia Internacional para la investigación en cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), los agentes carcinogénicos tipo 1 son aquellos que sin lugar a dudas, causan cáncer en humanos [133].

EBV ha sido asociado a varios cánceres entre los que destacan linfomas de células B y carcinoma nasofaríngeo [134-136]; de hacer notar, las células blanco de la leucemogénesis en LAL son también el principal blanco de infección primaria y residencia de EBV [136].

EBV presenta una gama de oncogenes, entre los que se encuentran la proteína de señalización LMP1 que en estudios *in vitro* ha mostrado su capacidad para establecer líneas celulares linfoblastoides [137, 138]; y el factor de transcripción EBNA1, el cual es capaz de promover inestabilidad genómica [139, 140]. Los principales mecanismos de oncogenicidad de EBV incluyen activación de programas de crecimiento de células B, evasión inmune e inactivación de genes supresores de tumores [141].

Citomegalovirus humano o Herpesvirus Humano tipo 5 (HHV5 por sus siglas en inglés) es también un herpesvirus ubicuo. La frecuencia de infección varía entre el 50 y el 100% en adultos [83]. Es el virus más frecuentemente transmitido de la madre al feto, al que puede causar enfermedad grave o fatal bajo ciertas condiciones; puede también ser transmitido a través de la leche materna [142].

En los últimos años, diferentes grupos de investigación se han concentrado en dilucidar su papel en la carcinogénesis. Actualmente se considera que HCMV es capaz de regular el proceso neoplásico y el término con el que se le refiere es el de oncomodulador, ello significa que HCMV puede infectar células tumorales y modular sus propiedades malignas en una forma que no involucra la transformación directa [90]. Desde esta perspectiva HCMV ha sido asociado con diferentes tipos de malignidades que incluyen glioblastomas, leucemias, osteosarcomas, cáncer de colon y otros [143-145]. Las funciones oncomoduladoras encontradas en estas neoplasias incluyen: el bloqueo de la apoptosis, la estimulación de factores de crecimiento, la inhibición de genes supresores de tumores y

de manera importante para nuestro estudio, la inducción de daño cromosómico e inestabilidad genética.

El herpesvirus humano tipo 6 (HHV6, por sus siglas en inglés), incluye dos variantes cercanamente relacionadas denominadas HHV-6A y HHV-6B. Es un virus ubicuo presente desde los primeros años de vida, de hecho se ha estimado que durante el primer año virtualmente todos los niños son infectados [146, 147]. Presenta tropismo variado, destacan la infección en linfocitos T y células precursoras hematopoyéticas comprometidas a diferentes linajes, ambas representan su principal sitio de residencia [148].

Desde 1986, año en que fue aislado, ha sido asociado a diferentes malignidades hematológicas entre las que se encuentran linfomas Hodgkin y no Hodgkin y leucemias agudas principalmente infantiles [149]. Varios estudios han explorado la asociación entre HHV6 y leucemia infantil, en dichos estudios, los análisis se han realizado a través de la comparación de niveles de anticuerpos, mostrándose resultados heterogéneos en los distintos trabajos [150-152]. Por ejemplo, Salonen *et al* encontraron un mayor porcentaje de anticuerpos IgM anti HHV6 en niños con leucemia al ser comparados con controles, sugiriendo la participación de la infección en el origen de la enfermedad [152]. Sin embargo, el trabajo de Levine *et al* no mostró diferencias significativas en los títulos de anticuerpos anti HHV6 en 50 niños con LAL pareados por sexo y edad con sujetos controles [150]. No obstante, de manera interesante, estudios *in vitro* han mostrado que HHV6 tiene la habilidad de transformar fibroblastos de la línea celular NIH 3T3 así como keratinocitos epidermicos [153, 154]. También se ha mostrado que la proteína ORF1 de HHV6 es capaz de inactivar p53 [155].

Se ha propuesto de los herpesvirus a menudo actúan en concierto para potenciar sus efectos patógenicos en padecimientos como síndrome de fatiga crónica, mononucleosis infecciosa y enfermedad linforproliferativa post-transplante [156-160].

1.7.2 Familia Retroviridae

HTLV1 (del inglés Human T-leukemia/lymphoma virus-1) es un delta-retrovirus, y constituye el primer miembro de la familia *Retroviridae* directamente asociado a cáncer en humanos, la leucemia/linfoma de células T del adulto (ATL por sus siglas en inglés) [46, 161, 162]. La demostración de la participación de este agente en la etiología de la ATL se inició con el aislamiento de partículas virales de cultivos primarios y establecidos a partir de células leucémicas de pacientes con ATL [46]. La caracterización de las partículas virales y el genoma viral permitió mostrar que el DNA proviral estaba presente en sangre periférica y células leucémicas de pacientes pero ausente en sujetos sanos [161]. La demostración de la integración monoclonal del provirus en células leucémicas sugirió fuertemente que la infección por HTLV1 era un pre-requisito para el desarrollo de ATL y por lo tanto confirmó su asociación causal a la enfermedad [162].

HTLV1 es considerado un virus endémico de Japón, países de la costa occidental africana, Centroamérica y el Caribe [46]. Aunque hay pocos estudios, se ha documentado su ausencia en México [163, 164]. Existen 3 modos de transmisión del HTLV1 demostrados: contacto sexual, vía intravenosa y vía leche materna [165]. Se sabe que *in vivo* es capaz de infectar linfocitos T, B y células dendríticas [166].

Los mecanismos oncogénicos de HTLV1 no están completamente entendidos, sin embargo, diferentes trabajos han mostrado que la participación de la proteína transactivadora Tax de HTLV1 podría ser crucial en el proceso de transformación ya que

es capaz de estimular continuamente la proliferación de células infectadas *in vitro* y de promover inestabilidad genómica [167, 168].

MMTV (del inglés Murine Mammary Tumor Virus) es un retrovirus, asociado con el 90% de los tumores mamarios en el ratón (revisado en [169]). En los últimos años, diferentes grupos de investigación se han enfocado en la identificación de un homólogo en el humano que pudiera estar asociado a casos de cáncer de mama encontrándose resultados muy variables [169-173]. Aunque es todavía controversial si el virus está realmente asociado a la malignidad, algunos grupos ya se refieren a dicho agente como HMTV (del inglés Human Mammary Tumor Virus) aludiendo a su origen humano.

MMTV es un betaretrovirus, como todos los miembros de la familia *Retroviridae*, su genoma presenta en los extremos elementos regulatorios de la transcripción denominados LTRs (del inglés Long Terminal Repeats). Interesantemente, se ha mostrado que dichos LTRs presentan elementos de respuesta a glucocorticoides y progesterona, los cuales causan aumento en la transcripción viral durante embarazo y lactancia [174]. En el ratón, MMTV tiene dos rutas de transmisión, una es a través de la leche materna y otra es a través de la herencia de copias endógenas del retrovirus [175, 176]. El epitelio mamario es el último blanco de la infección por MMTV, siendo los linfocitos T y B los principales reservorios del virus y de hecho son los medios por los que MMTV llega al epitelio mamario [177]. Por las razones expuestas anteriormente, consideramos a MMTV como otro candidato a participar como etiológico de LAL.

En resumen, varios estudios sugieren una asociación entre agentes infecciosos y LAL infantil. Hablando exclusivamente de la Ciudad de México, la alta incidencia de infecciones y LAL en los primeros años de vida no parecen poder ser explicados por la hipótesis de la infección tardía de Greaves. Un estudio epidemiológico reciente mostró

que infecciones graves que requirieron hospitalización en el primer año de vida fueron asociadas al mayor riesgo de desarrollar leucemia en niños con Síndrome de Down [108]. En este contexto, dichas infecciones podrían estar participando como factores promotores de la leucemogénesis.

En la actualidad se reconoce que agentes virales son capaces de promover inestabilidad genómica y procesos carcinogénicos a través de distintos procesos. Varias especies de virus ya han sido directamente asociados a diferentes tipos de leucemia en animales y HTLV1 se reconoce como el agente etiológico directo de la leucemia/linfoma de células T del adulto.

Los herpesvirus EBV, HCMV y HHV6 y los retrovirus HTLV1 y MMTV se presentan como candidatos importantes en la etiología de la LAL infantil al considerar sus características de ser adquiridos muy temprano en la vida (*in utero*, parto, lactancia), presentar tropismo por linfocitos B y T y estar asociados a inestabilidad genómica. Importantemente, EBV, HTLV1 y MMTV son agentes oncogénicos directos demostrados.

2. JUSTIFICACIÓN

Este estudio nos permitirá conocer si las infecciones por los virus mencionados participan en la aparición de la LAL infantil y si dichas infecciones se asocian a los re-arreglos génicos ETV6-RUNX1 y MLL-AF4. Esta investigación nos dará pautas para dilucidar los mecanismos que están involucrados en la etiología de la leucemia; potencialmente permitirá identificar a la población que se encuentre en un mayor riesgo y diseñar estrategias terapéuticas para la población enferma.

OBJETIVOS

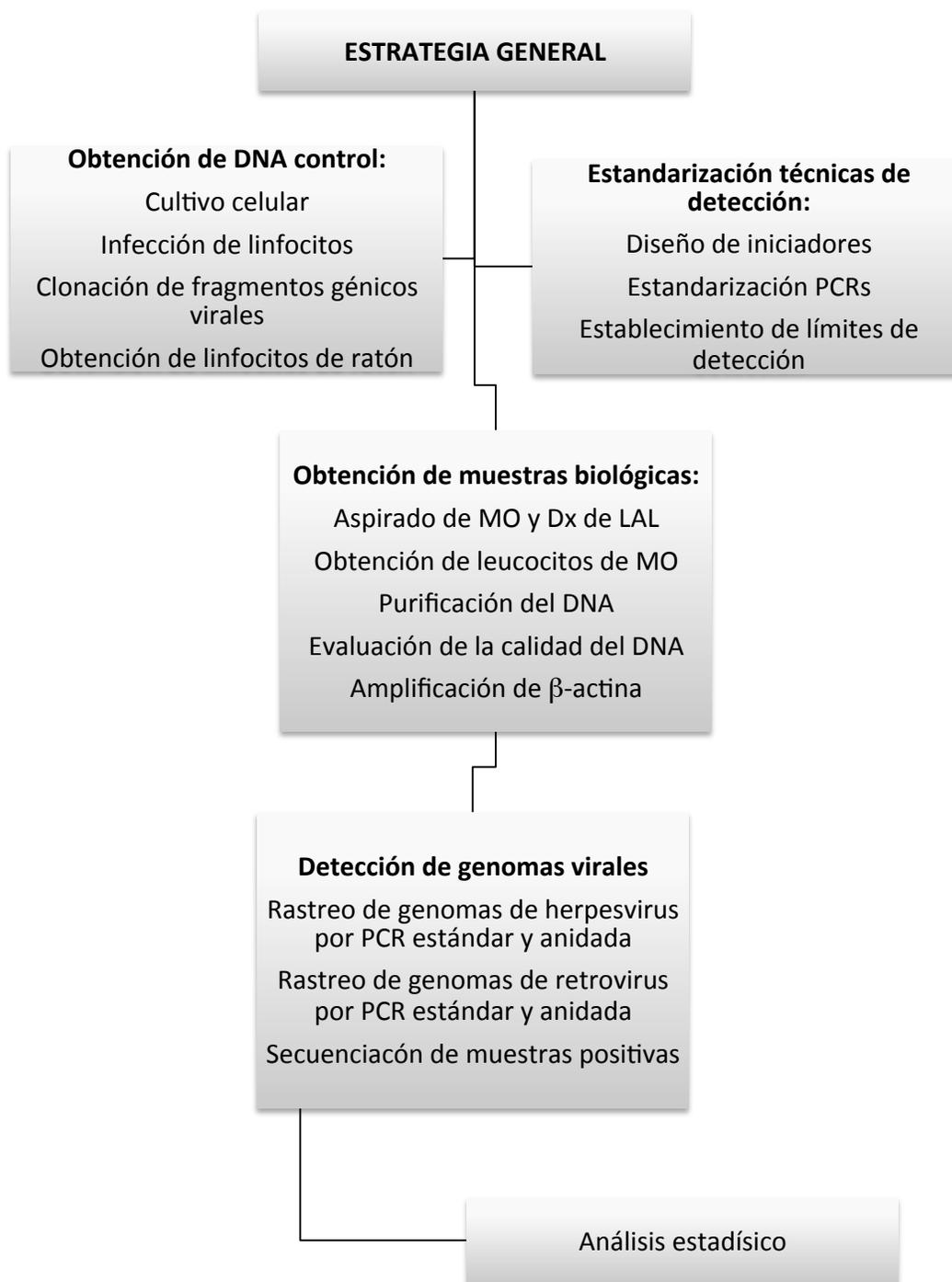
Objetivo general:

Analizar la participación de infecciones de los herpesvirus EBV, HCMV y HHV6 y los retrovirus HTLV1 y MMTV en la aparición de la LAL infantil y su asociación a los re-arreglos génicos ETV6-RUNX1 y MLL-AF4.

Objetivos particulares:

1. Obtener controles de detección mediante cultivo e infección de líneas celulares y a través de clonación de fragmentos génicos virales.
2. Estandarizar las técnicas de detección de genomas de herpesvirus y retrovirus mediante PCR estándar y PCR anidada.
3. Identificar secuencias genómicas de los herpesvirus EBV, HCMV y HHV6 en muestras de médula ósea de niños con diagnóstico *de novo* de LAL.
4. Identificar secuencias genómicas de los retrovirus HTLV1 y MMTV en muestras de médula ósea de niños con diagnóstico *de novo* de LAL.
5. Medir la asociación entre las infecciones virales y la presencia de los re-arreglos génicos ETV6-RUNX1 y MLL-AF4 en niños con LAL.

4. MATERIALES Y MÉTODOS



4.1 Declaración de ética. Este estudio fue aprobado por los comités de ética e investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS): Comisión Nacional de Investigación Científica y Comité de Ética en Investigación (anexo 1). Antes de la recolección de muestras los padres de los pacientes candidatos fueron informados sobre la naturaleza del estudio y aquellos que estuvieron dispuestos a participar, firmaron una carta de consentimiento informado (anexo 2). Los niños mayores de 10 años también firmaron una carta de asentimiento (anexo 2).

4.2 Pacientes y muestras biológicas

Hospitales participantes

- Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional SXXI
- Hospital General del Centro Médico Nacional La Raza
- Hospital Infantil de México Federico Gómez
- Hospital Juárez de México
- Hospital Pediátrico Moctezuma

Criterios de inclusión:

- Niños de entre 0 y 17 años
- Con diagnóstico de LAL-B o LAL-T
- Que no hubieran recibido tratamiento
- Capturados durante el periodo del 1° de enero de 2010 al 30 de agosto de 2012

Los casos reclutados en este estudio pertenecen al Grupo Mexicano Interinstitucional para la Identificación de las Causas de la Leucemia Infantil (MIGICCL por sus siglas en inglés), miembro del “Childhood Leukemia International Consortium” (CLIC) desde 2012. Durante el periodo del estudio hubo 589 pacientes pero sólo 70 de ellos (66 niños con

diagnóstico de LAL-B y 4 niños con diagnóstico de LAL-T) pudieron ser incluidos en el estudio. Las características clínicas y demográficas de los pacientes fueron extraídas de los expedientes médicos y son resumidas en la tabla 5.

Muestras de médula ósea fueron obtenidas mediante aspirado para establecer el diagnóstico de LAL a través de estudios morfológicos y de inmunofenotipo. El estudio morfológico implica, el conteo de al menos 25% de células leucémicas en la muestra de médula ósea, un porcentaje inferior no es compatible con la definición de LAL. El estudio de inmunofenotipo se refiere a la caracterización de marcadores expresados por las células leucémicas, se realiza mediante citometría de flujo y de acuerdo al resultado se establece la clasificación inmunológica de LAL (tabla 3). Aproximadamente 2 ml de médula ósea colectada en solución de citrato de sodio 0.1 M (Teknova, Hollister, CA) como anticoagulante fueron utilizados para obtener las células mononucleares mediante separación por centrifugación utilizando el reactivo Histopaque-1077 (Sigma, Steinheim, Germany); posteriormente se realizó cuenta viable por exclusión con azul tripán.

Tabla 3. Clasificación de la LAL de acuerdo a la expresión de marcadores

Subtipo de LAL	Marcadores
pre-B temprana CALLA+	CD19+, CD10+, CD20±, Igc-, IgS-
pre-B	CD19+, CD10±, CD20±, Igc+, IgS-
Célula B	CD19+, CD10±, CD20±, Igc-, IgS+
Célula T	D79a, CD7+, CD5+, cyCD3+

* CALLA (Del inglés common acute lymphoblastic leukemia antigen) se refiere al receptor CD10. CD Del inglés, cluster of differentiation. IgC, inmunoglobulina citoplásmica. IgS, inmunoglobulina de superficie. ± significa que el marcador puede estar o no presente.

4.3 Obtención del DNA control.

4.3.1 Cultivo celular

Las líneas celulares Raji y Ramos (amablemente proporcionadas por el Dr. Mario Vega, Hospital de Oncología, CMN SXXI) fueron utilizadas como controles positivo y negativo respectivamente en la detección de EBV. Ambas fueron cultivadas en medio RPMI *advanced* suplementado con suero fetal bovino al 10% (ATCC, 30-2020), HEPES 1X (Gibco, Carlsbad, CA) y antibiótico/antimicótico 1x (Gibco, Grand Island, NE). Éste y los otros cultivos celulares aquí descritos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Como control positivo en la detección de HTLV1 se utilizó a la línea celular comercial MJ (ATCC, CRL-8293), la cual fue cultivada en medio IMDM (ATCC, 30-2005) suplementado con suero fetal bovino (ATCC, 30-2020) al 20% y antibiótico/antimicótico 1x (Gibco, Grand Island, NE). Para obtener DNA control del virus HHV6, la línea celular MOLT3 (ATCC, CRL-1552) permisiva a la infección de HHV6 [178] fue propagada en medio RPMI (ATCC 30-2001) suplementado al 10% con suero fetal bovino (ATCC, 30-2020) y antibiótico/antimicótico 1x; durante su fase de crecimiento exponencial, las células fueron infectadas con partículas virales de HHV6 de la cepa Z29 (ATCC, VR-1467), a los 21 días de cultivo post infección y habiéndose observado el efecto citopático desde el séptimo día post-infección, las células fueron cosechadas; el DNA fue aislado y una región del genoma viral fue clonado como se describe en el siguiente apartado. En todos los cultivos celulares, el DNA fue extraído utilizando el kit comercial QIAamp DNA extraction kits (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4.3.2 Clonación de fragmentos génicos virales

En la detección de HCMV, HHV6 y MMTV se utilizó DNA plasmídico como control positivo; para ello, un fragmento del gen UL83 de HCMV, U94 de HHV6 o env de MMTV

fue amplificado como se describe en la sección de PCR estándar. El producto amplificado fue purificado del gel de agarosa utilizando QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, NRW) y ligado al vector pGEM T-easy (Promega, Madison, WI) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La generación de bacterias competentes se realizó mediante choque térmico e incubación en medio rico en el catión divalente Ca^{2+} . Brevemente: bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α silvestres en fase de crecimiento exponencial fueron inoculadas en medio BHI líquido sin antibiótico, se permitió el crecimiento del cultivo durante toda la noche a 37° en agitación constante, un inóculo de este cultivo fue llevado a medio SOC (anexo 3) sin antibiótico e incubado a 37° en agitación durante 1.5 horas. El cultivo fue incubado en hielo durante 10' y posteriormente centrifugado, el botón celular se resuspendió en medio TF1 (anexo 3), este procedimiento se realizó una segunda ocasión pero resuspendiendo a las células en medio TF2 (anexo 3). El producto de ligación generado fue transformado en las bacterias competentes de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del vector (Promega, Madison, WI). Las bacterias fueron crecidas en medio BHI (Promega, Madison, WI) en presencia de ampicilina, IPTG y x-gal (Promega, Madison, WI). Bacterias exitosamente transformadas (colonias blancas) fueron sujetas a extracción de DNA plasmídico utilizando el estuche comercial PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Plásmidos puros fueron digeridos con las enzimas de restricción NdeI y EcoRI (New England BioLabs, Ipswich, MA) para linearizar el plásmido y liberar el inserto respectivamente.

4.3.3 Obtención de linfocitos de ratón

En la detección de MMTV también se utilizó DNA procedente de bazo de ratón silvestre de la cepa C57BL/6 (amablemente proporcionados por la Dra. Karina Chávez, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI). Los animales fueron sacrificados por

dislocación cervical de acuerdo con las normas éticas establecidas en nuestro país (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) y a la Guía del NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. El bazo fue retirado en condiciones asépticas y las células de bazo se recuperaron mediante el paso del órgano a través de una malla estéril en la que los eritrocitos fueron lisados. El DNA fue purificado utilizando el QIAamp DNA extraction kits (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.4 Detección de genomas virales

4.4.1 Purificación de DNA de las muestras

El DNA fue extraído de la fracción de células mononucleares de médula ósea usando el kit comercial QIAamp DNA extraction kits (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y su calidad e integridad fueron evaluadas a través de corrimiento electroforético y densidad óptica (cociente 260/280) y mediante la amplificación del gene endógeno β -actina.

4.4.2 Diseño de iniciadores

Cuando no se usaron iniciadores previamente reportados en la literatura, estos fueron diseñados usando el programa especializado Primer-BLAST [179]. Las secuencias molde fueron siempre los genomas completos de los virus en estudio tomados de la base de datos *Nucleotide* y fueron secuencias de referencia (*RefSeq*) con excepción de los iniciadores diseñados para la detección de MMTV, en cuyo caso, las secuencias molde fueron regiones seleccionadas del genoma viral con baja homología a secuencias retrovirales endógenas humanas. Se utilizaron los siguientes parámetros: Tamaño del producto de PCR: 200-600 nucleótidos. Temperatura de fusión: Rango: 50-65°C,

diferencia máxima entre iniciadores: 2°C. Tamaño del iniciador: Mínimo: 15 bases, Optimo: 20 bases, Máximo: 25 bases. Los otros parámetros fueron los establecidos por defecto. Los iniciadores generados por Primer-BLAST fueron sometidos a análisis de formación de horquillas, autodímeros y heterodímeros en el programa Oligo Analyzer versión 3.1 (Integrated DNA Technologies). Finalmente, para descartar su hibridación a secuencias humanas u otros organismos, los iniciadores fueron analizados 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) [179].

4.4.3 Estandarización de las PCRs

Todas las PCRs fueron estandarizadas en los siguientes parámetros: gradiente de temperatura de alineamiento, concentración de MgCl₂ y de DNA. En cuanto al gradiente de temperatura, el rango se situó alrededor de la T_m de los iniciadores y generalmente se ubicó entre 50°C y 60°C. En relación al MgCl₂, las concentraciones del compuesto usadas en los gradientes fueron: 0mM, 1mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM, 3mM y 4mM. La concentración de DNA fue también optimizada a través de la realización de gradientes de concentración y se basó en la sensibilidad de las distintas reacciones. Una vez que se conocieron las condiciones de amplificación óptimas de cada una de las reacciones, se llevó a cabo la detección de genomas virales en las muestras biológicas.

4.4.4 PCR estándar y anidada

Las PCRs estándar y anidada para la detección de secuencias génicas virales y para la amplificación del gen endógeno β -actina fueron llevadas a cabo en un volumen final de 50 μ l. Los componentes de la mezcla de reacción fueron los siguientes: Buffer Taq 1x, MgCl₂ 1.5-2.5 mM (la concentración de MgCl₂ fue optimizada para cada reacción), 200 μ M de cada dNTP, 2.5U de Taq polimerasa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 200 nM de

cada primer (IDT technologies), 100 ng de DNA de las muestras o líneas celulares control o 3.3×10^{-5} ng de DNA plasmídico control (PCR estándar) o 0.05 μ l del producto de la primera reacción (dilución 1:1000, PCR anidada). El DNA plasmídico control se mezcló con DNA genómico de la línea celular Daudi con el fin de que la reacción de amplificación corriera bajo una concentración de DNA (masa/volumen) igual a las de las muestras. Los programas utilizados incluyeron un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 5' y un paso de extensión final a 72°C por 10'. Los ciclos de amplificación y los iniciadores específicos para cada reacción se describen en la tabla 4. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.8% teñidos con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz ultravioleta utilizando el equipo ST4 Quantum (VilberLourmat).

Tabla 4. Ciclos de amplificación, secuencias de los iniciadores y tamaño esperado de los productos de cada PCR.

Virus/ β - actina	Tipo de PCR	Descripción de los ciclos de amplificación *	Secuencias de los iniciadores (5'→3')	Tamaño del producto esperado (pb)
EBV	Estándar	95°C/40 sec, 57°C/1 min, 72°C/1.5 min (30x)	F CCATGTAAGCTTGCCTCGAG R GCCTTAGATCTGGCTCTTTG [180]	236
EBV	Anidada	95°C/20 sec, 57°C/30 sec, 72°C/45 sec (15x)	F CTTTGTCCAGATGTCAGGGG R GCCTGAGCCTCTACTTTT GG **	104
HCMV	Estándar	95°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/1 min (35x)	F AAGATGCGGTAGATGTCGTT R CTGCGCTCTTCTTTTTCGAT **	535
HCMV	Anidada	95°C/45 sec, 55°C/45 sec, 72°C/45 sec (15x)	F TTCTGACCCTGAACCGTAG R CGACGAAGAAGCTCGTAACC **	302

HHV6	Estándar	95°C/1 min, 50°C/ min, 72°C/1 min (30x)	F GTGCGCTATAAAATCGATAGC R TGATTTCCGTTGTGTGTTTTCC **	516
HHV6	Anidada	95°C/30 sec, 56°C/30 sec, 72°C/30 sec (15X)	F GTCTCTTCGTATCCACGCG R CGTTCCCGTCAAGAAATC **	358
HTLV1	Estándar 1	95°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/1 min (35x)	F CGGATACCCAGTCTACGTGT R CGATGGACGCGTTATCGGCTC [181]	149
	Estándar 2	95°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/1 min (35x)	F TGTTCCTACAAACGAATAG R GTGTGAGAGTAGAAATGAGG **	378
HTLV1	Anidada	95°C/45 seg, 55°C/45 seg, 72°C/45 seg (15x)	F ACAAGCGAATAGAAGAACTC R ATAAAGGAGGAGGACTGT **	148
MMTV	Estándar 1	95°C/1 min, 53°C/1 min, 72°C/1 min (35x)	F CGAGCTAAGCGATTC R AGGTATGCCACAGAT **	284
	Estándar 2	95°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/1 min (35x)	F CCTCACTGCCAGATC R CATCTGCCTGTGTAC ***	666
MMTV	Anidada	95°C/45 seg, 50°C/45 seg, 72°C/45 seg (15x)	F GTATGAAGCAGGATGGGTAG R ATAGTCGTAGGCAGAAGAG **	317
β -actin	Estándar	95°C/1 min, 60°C/1 min, 72°C/1.5 min (30x)	F CCTAAGGCCAACCGTAAAAAG R TCTTCATGGTGCTAGGAGCCA **	670

Abreviaturas: F: forward (sentido), R: reverse (antisentido). * Todas las corridas de amplificación incluyeron un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos. Las temperaturas de alineamiento fueron optimizadas para cada reacción. ** Estos iniciadores fueron diseñados en nuestro laboratorio usando el programa primer-BLAST de "Basic Local Alignment Search Tool" [179]. *** Secuencias modificadas de los iniciadores 2 y 4 reportados en la referencia [169].

4.5 Secuenciación de nucleótidos

Los fragmentos génicos virales clonados se purificaron usando el estuche comercial QIAquick gel extraction kit (Qiagen Hilden, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Secuenciación automatizada directa de las cadenas sentido y antisentido fue llevada a cabo usando el BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Aproximadamente 20 ng de DNA fueron utilizados en cada reacción; el programa incluyó un paso de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, un paso de alineamiento a 50°C por 14 segundos y un paso de extensión a 60 ° por 4 min (25 ciclos). Las muestras fueron analizadas en el equipo ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias obtenidas fueron examinadas usando el programa Standard Nucleotide BLAST de Basic Local Alignment Search Tool [179].

4.6 Análisis estadístico

El poder estadístico del estudio fue calculado considerando el tamaño de muestra (N=70) y la probabilidad de detectar genomas virales (que estuvieran presentes en todas o casi todas las células tumorales y por lo tanto apoyaran un mecanismo de transformación directo) en al menos un paciente. Las frecuencias de infección hipotéticas fueron 10% y 5%. Se utilizó el paquete estadístico Epi Info versión 7.1.240 (Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd. Atlanta, GA 30333, USA <http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/>). Las razones de momios con intervalos de confianza al 95% fueron calculados para identificar si las infecciones detectadas fueron asociadas a leucemia de alto riesgo, recaída o muerte. La prueba estadística U de Mann Whitney fue usada para comparar la edad en meses y la cuenta de leucocitos con la infección. El paquete estadístico usado para estos análisis fue Epidat versión 3.0.

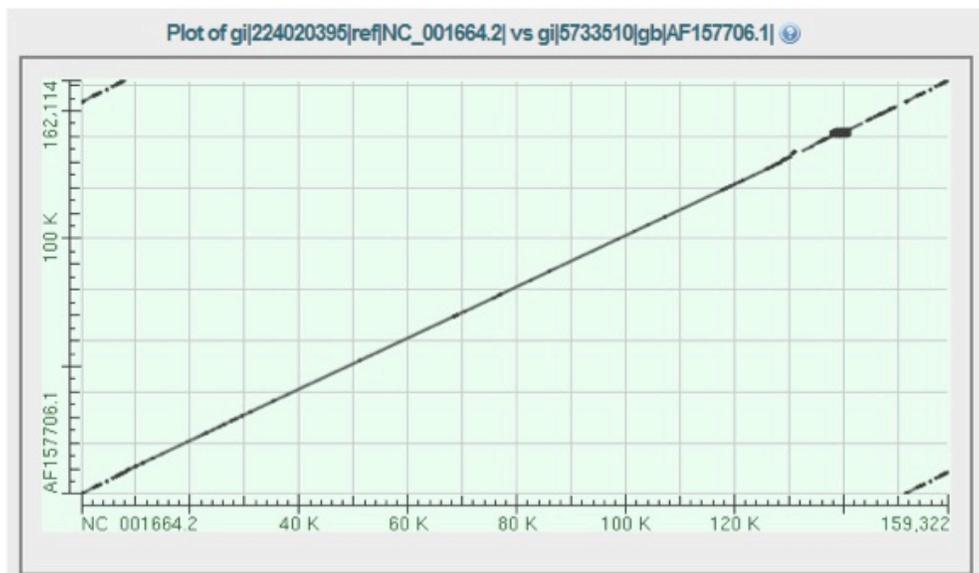
5. RESULTADOS

5.1 Estandarización de las técnicas de detección

5.1.1 Diseño de iniciadores

Para la detección de HCMV, HHV6, HTLV1 mediante PCR estándar y anidada así como para la detección de MMTV mediante PCR anidada, los iniciadores utilizados fueron diseñados en el laboratorio usando la herramienta de BLAST especializado primer-BLAST [179] y el algoritmo Oligo-Analyzer de IDT. Para el caso de HHV6, la secuencia molde se generó a partir del alineamiento de los genomas de los dos subtipos virales (HHV6A y HHV6B) que se han descrito. En la figura 4 se muestra el diseño de iniciadores en herpesvirus representado por el virus HHV6.

a



b

Range 1: 87207 to 128400 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
64652 bits(35010)	0.0	39184/41231(95%)	160/41231(0%)	Plus/Plus

c >gi|224020395|ref|NC_001664.2| Human herpesvirus 6A, complete genome
 141,765
 AAGTCCTAAATTTTTGTATTCAGAGATCCATGTAATATCCATGTAACGGGATGTTTTCAAGAATGGC
 TCCGGTTAACATCGATTTTCCACATCCGGGTGGACCGATAAACTAACGGTGTTTTTTTTCTCCTCTG
 TGGCTTAGCCACTGATATAATATGGTTCCTGCTAATATAGGGTCAAAAGACTGCAGACAGAACAGCTGGT
 AAACCGGGTTTTTCATAAATCTGAAAGTCAGTGTCTAT **GTGCGCTATAAAATCGATAGC** TTT CCTAGTTGC
 TCTTATTCTTTTTTAGCTATAGATAGAGCCCTATGGATTAGCAGCTCCCGTGTGTTAGCGTCAACAAT
 TGCATGTATGATCTAAT **CTCTCTTCGTATCCACGGC** TCTTCCGTGACTATCCGAGATCAGACAGCCATT
 CGATGGTCCCAGAAATTTAGATTTTAAAGATATCCCGTTAATCCCATCTTTGGAAACAGCATAAGTTT
 GACATTAGGTTTTTTATTAATGGGATATGATGTGTTTTTCGATGTATCTCATCGCATACGTCTCCAGT
 TCGTTAATATTTGTCCACGCCCATTTGGAAGTGTGGTCTAATAATTTGAAGAAGGGCAAAGGGGATGTAAC
 TTAGACTGAAGACCTGGGTTCCGCCACCATTCTTCTTTGTTTTGGCATACGTGCACCAATCATCTATTTT
 AGGGG **CGTCCCGTCGAAGAAATCTT**TAATTAATACGCCCC **TGATTCGGTTGTGTGTTTTCC**TATCGTT
 GGCTGGGAATTCATCTAAAGCTATCAATAATATAGGGAGGGTCTGCCAGCTTTATCTCGCTTGAG
 CGTACCCTTTGCAGGGGTGGGGACGGCAGTTTTATTATCCAGTAATGAGTATGACATCGATCATTTT
 142,591

d

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Human herpesvirus 6A isolate GS, complete genome	42.1	42.1	100%	0.023	100%	KJ123690.1
Human herpesvirus 6A strain GS, complete genome	42.1	42.1	100%	0.023	100%	KC465951.1
Human herpesvirus 6B strain Z29, complete genome	42.1	42.1	100%	0.023	100%	AF157706.1
Human herpesvirus 6B DNA, complete genome, strain: HST	42.1	42.1	100%	0.023	100%	AB021506.1
Human herpesvirus type 6 DNA for ORF with homology to AAV-2 rep_68/78 gene product	42.1	42.1	100%	0.023	100%	X59532.1
Human herpesvirus-6 (HHV-6) U1102, variant A DNA, complete virion genome	42.1	42.1	100%	0.023	100%	X83413.1

Figura 4. Diseño de iniciadores. En el diseño de los iniciadores para la detección de HHV6, primero se alinearon los genomas de los subtipos HHV6A (NC_001664.2) y HHV6B (AF157706.1) utilizando el programa Standard Nucleótido-BLAST. Gráfico (a) y tabla principal (b) del alineamiento en los que se muestra que la identidad de secuencias fue del 95%. c. Un región con el 100% de identidad fue utilizada como molde para construir los iniciadores de las reacciones estándar y anidada (secuencias en morado), se utilizaron los programas primer-BLAST [179] y Oligo-aAnalyzer (IDT). d. Mediante el programa Standard Nucleótido-BLAST cada secuencia fue analizada para confirmar su identidad y descartar su hibridación a secuencias humanas u otros organismos; se muestra análisis representativo del iniciador GTGCGCTATAAAATCGATAGC. Ver materiales y métodos, sección 4.4.2 para obtener más detalles del diseño de iniciadores.

5.1.2 Infección de linfocitos

Ya que no existen líneas celulares que estén infectadas con HHV6, la línea celular MOLT3 permisiva a la infección con este virus fue infectada con un concentrado de partículas virales. A partir de los 7 días post-infección los eventos de replicación viral fueron evidenciados por el efecto citopático observado en el cultivo (fig 5a), al día 14 post-

infección, las células infectadas fueron cosechadas y el DNA fue purificado para ser usado en la detección del genoma del virus mediante PCR (fig 5b).

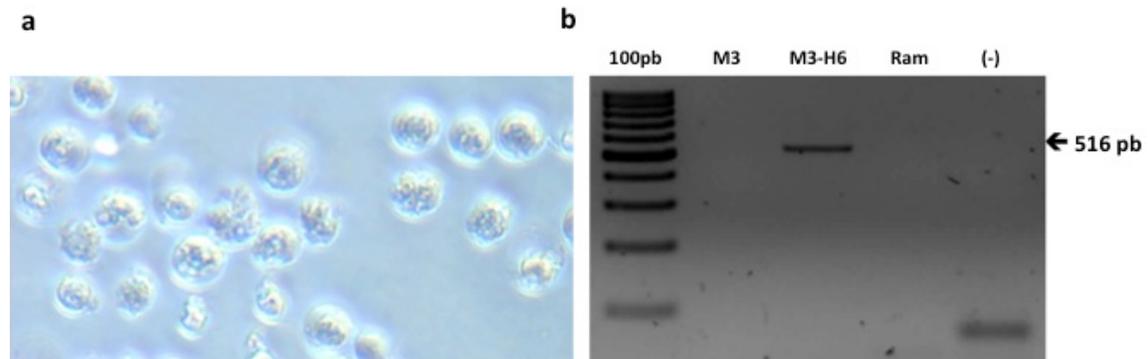
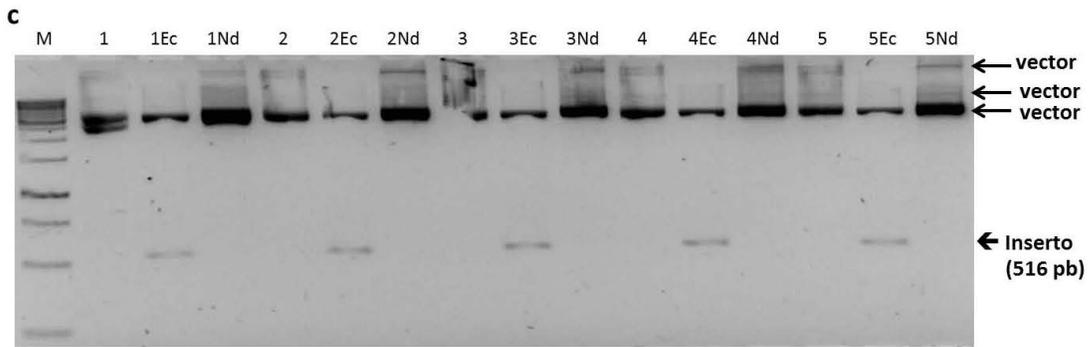
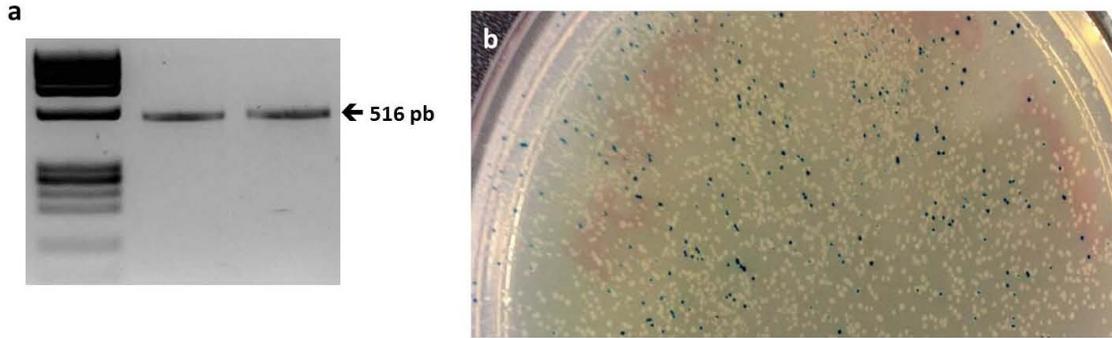


Figura 5. Infección de linfocitos con HHV6. **a.** Efecto citopático producido por HHV6 en linfocitos T de la línea celular MOLT3 a los 14 días post-infección. El aumento de tamaño de las células, su agregación y la pérdida de la arquitectura celular normal fueron indicativos de la replicación viral. **b.** Amplificación por PCR de una región del genoma viral a partir del DNA del cultivo infectado de a. Carril 1: marcador de pesos moleculares. Carril 2: MOLT3 sin infectar. Carril 3: MOLT3 infectadas con HHV6, se observa el producto amplificado en el tamaño esperado (516 pb). Carril 4: Línea celular Ramos usada como control negativo. Carril 5: Control sin DNA.

5.1.3 Clonación de fragmentos génicos virales. Fragmentos genómicos de los virus HCMV, HHV6 y MMTV fueron clonados en vector comercial para ser usados como controles positivos en las reacciones de detección viral. En la figura 6 se muestra una imagen representativa de la clonación de HHV6. Un fragmento génico viral amplificado por PCR y purificado del gel de agarosa (fig. 6a) fue clonado en un vector comercial bajo el sistema de alfa complementación. Bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α exitosamente transformadas fueron evidenciadas por la coloración blanca en cultivo sólido con el antibiótico ampicilina en contraste con las colonias azules las cuales no contenían el inserto de interés (fig. 6b). Veinte colonias blancas fueron seleccionadas y re-plaqueadas



d

Human herpesvirus 6B strain Z29, complete genome
 Sequence ID: [gb|AF157706.1](#) Length: 162114 Number of Matches: 1

Range 1: 143727 to 144210 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
878 bits(475)	0.0	481/484(99%)	1/484(0%)	Plus/Plus
Query 13	GCTCTT-WTCtttttttAGATATAGATAGAGCCCTATGAATTAGCACGTCCTCCGIGIGIT	71		
Sbjct 143727	GCTCTTATTCTTTTTTATAGATATAGATAGAGCCCTATGAATTAGCACGTCCTCCGIGIGIT	143786		
Query 72	AGTGTCAATAAATGCAATGATGATCTAACGTCCTTCGTAICCCAGCGCTCTCCGTGACT	131		
Sbjct 143787	AGTGTCAATAAATGCAATGATGATCTAACGTCCTTCGTAICCCAGCGCTCTCCGTGACT	143846		
Query 132	ATCCAAGATCAGACAGCCATTCGATGGTCCCAGAAATTTAGATTTTAAAGATAITCTG	191		
Sbjct 143847	ATCCAAGATCAGACAGCCATTCGATGGTCCCAGAAATTTAGATTTTAAAGATAITCTG	143906		
Query 192	TCGGTCCCACTCTTTGGAAACAGCATAAGTTAACATTAGGTTTTTATGAAATGGGAT	251		
Sbjct 143907	TCGGTCCCACTCTTTGGAAACAGCATAAGTTAACATTAGGTTTTTATGAAATGGGAT	143966		
Query 252	ATGATGTGTTTTCGAATGATTTTCATCGCATACGTCCTCCAGTTCGTTAATAATTTGTCAT	311		
Sbjct 143967	ATGATGTGTTTTCGAATGATTTTCATCGCATACGTCCTCCAGTTCGTTAATAATTTGTCAT	144026		
Query 312	GCCCAITGGAACCTGIGGTCTAATAAATTTGAAGAAGGGCAAAGGGATATAACTTAGACTG	371		
Sbjct 144027	GCCCAITGGAACCTGIGGTCTAATAAATTTGAAGAAGGGCAAAGGGATATAACTTAGACTG	144086		
Query 372	AAGACCTGGGTTCCGCCACCAITTTTCTTTGTTTTGGCATAACGTCACCAATCAICTAAT	431		
Sbjct 144087	AAGACCTGGGTTCCGCCACCAITTTTCTTTGTTTTGGCATAACGTCACCAATCAICTAAT	144146		
Query 432	TTAGGGGCGTTCCTCGAAGAAATCTTTAATTAATACACCCCTGATTTCCGTTGTTGT	491		
Sbjct 144147	TTAGGGGCGTTCCTCGAAGAAATCTTTAATTAATACACCCCTGATTTCCGTTGTTGT	144206		
Query 492	TTTC 495			
Sbjct 144207	TTTC 144210			

Figura 6. Clonación de un fragmento del genoma de HHV6. a. Fragmento del genoma viral amplificado y purificado del gel de agarosa mostrado en un nuevo gel en el tamaño esperado (516 pb, duplicado). b. Colonias bacterianas transformadas (blancas) y no transformadas (azules) mostrando que los procesos de ligación y transformación del inserto de interés fueron exitosos. c. Imagen representativa de 20 clonas exitosamente transformadas (colonias blancas) que fueron digeridas con las enzimas de restricción EcoRI (1Ec-5Ec) y NdeI (1Nd-5Nd) para liberar el inserto y liberar el plásmido respectivamente. 1-5: plásmido puro. d. Alineamiento en Standar Nucleotide-BLAST del producto clonado y secuenciado mediante secuenciación capilar en el que se mostró 99% de identidad a la secuencia del genoma completo de HHV6 (secuencia de referencia AF157706.1 de la cepa B Z29).

en medio sólido con ampicilina para confirmar la presencia del plásmido portando el inserto de interés en las bacterias a través de la resistencia al antibiótico. Los plásmidos que contenían los insertos de interés fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y NdeI para liberar el inserto y linearizar el plásmido respectivamente (Fig. 6c). La identidad de los productos clonados fue confirmada mediante secuenciación capilar (Fig. 6d).

5.1.4 Estandarización de las PCRs

Previo al rastreo de los genomas virales en las muestras, tanto las PCRs estándar como las anidadas fueron optimizadas a través de gradientes de temperatura de alineamiento, gradientes de concentración de DNA (ver también la siguiente sección), de iniciadores y de $MgCl_2$. En la figura 7 se muestran las reacciones de estandarización para la detección de HTLV1 Y HHV6 como ejemplos representativos.

5.1.5 Establecimiento del límite de detección

Como se ha mencionado previamente, la participación directa de un virus en el proceso carcinogénico es primeramente sugerida por la presencia del genoma viral en cada una de las células tumorales, ya que este hecho indica que la infección es parte de la lesión

genética inicial que provoca la expansión clonal. Con base en este principio se diseñaron las estrategias de detección de virus del presente trabajo. Para conocer el límite de detección de las pruebas de PCR se utilizaron diluciones seriales del DNA control (tejido, líneas celulares y plásmidos (Figs. 8 y 9).

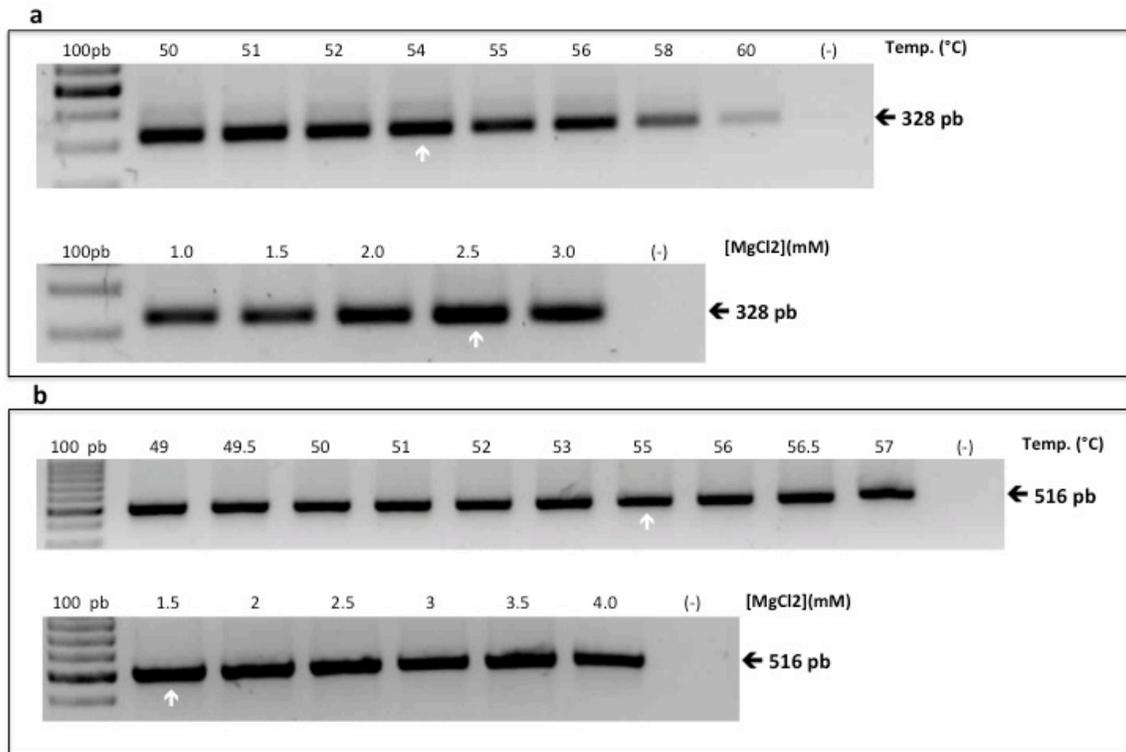


Fig 7. Estandarización de PCRs. Gradiente de temperatura de alineamiento (paneles superiores) y gradiente de concentración de MgCl₂ (paneles inferiores) de las reacciones de detección de HTLV1 (a) y HHV6 (b). Las flechas blancas indican la condición que fue seleccionada. El resto de las condiciones en los que corrió cada reacción se detallan en materiales y métodos, sección 4.4.3.

A partir de estas reacciones se estimó la señal que se esperaba observar en una muestra que portara el genoma viral en todas o casi todas las células leucémicas. Siempre se consideró que el porcentaje de células leucémicas presentes en la muestra de médula ósea podría variar entre el 100 y el 25% de manera que las reacciones incluyeron

concentraciones descendientes de DNA control, de manera que se pudiera estimar la variedad de señales esperadas en muestras con diferente porcentaje de blastos.

En la detección de EBV, se empleó la línea celular Raji, la cual deriva de un linfoma EBV+ y contiene 50 episomas virales por célula [182]. El límite de detección fue establecido con base en el número de células y al número de genomas virales presentes en cada célula.

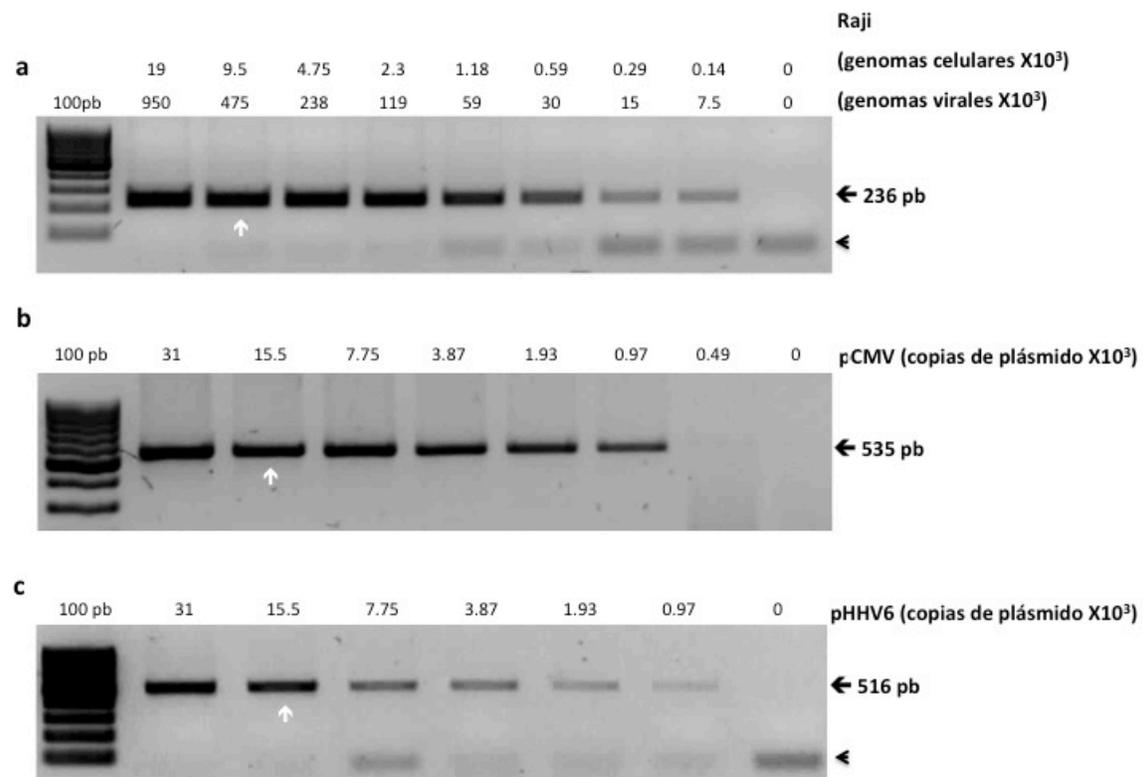


Figura 8. Límites de detección en el rastreo de herpesvirus. **a.** Para la detección de EBV, como control positivo se utilizó DNA de la línea celular Raji, la cual contiene 50 genomas virales por célula. 9.5×10^3 células (flecha blanca) equivalentes a 100 ng de DNA fueron posteriormente utilizados en las reacciones de detección del virus en las muestras, como se aprecia, el límite de detección se ubica en 140 genomas celulares o 7.5×10^3 genomas virales, lo cual indica que la reacción es suficientemente sensible para detectar al virus en muestras con el mínimo de células leucémicas (25%) que acarreen el mínimo de genomas virales reportado para un cáncer asociado a EBV (7 genomas virales en cáncer nasofaríngeo). **b y c.** Para la detección de HCMV y HHV6, se utilizó DNA plasmídico como control. 15.5×10^3 copias de plásmido equivalentes al número

de moles de DNA genómico presente en 100 ng de DNA de las muestras (flechas blancas) fueron utilizadas en las reacciones de detección de los virus en las muestras. Los límites de detección de estas reacciones se ubicaron en 0.97×10^3 copias de plásmido, por lo que fueron suficientemente sensibles para detectar un genoma viral por célula en muestras con sólo 25% de blastos leucémicos.

Aunque no es posible conocer el número de genomas virales presentes en blastos leucémicos, con base en el principio de analogía, se especuló que podría ser similar al encontrado en otro cáncer de células B asociado a EBV como lo es la línea celular Raji. No obstante, si el número de genomas virales en células leucémicas fuera tan bajo como el mínimo reportado para un cáncer asociado a EBV, es decir, 7 genomas virales por célula en cáncer nasofaríngeo EBV+ [183], nuestra prueba aún sería capaz de detectar muestras positivas (Fig. 8a).

En el caso de HCMV y HHV6, ya que no existen líneas celulares comerciales infectadas con estos virus, los controles de detección fueron plásmidos generados a partir de la clonación de fragmentos génicos virales (ver material y métodos, sección 4.3.2) (fig 8b y c). Ya que el DNA plasmídico es muchas veces más pequeño que DNA genómico, las reacciones se diseñaron con base en la concentración molar, de manera que, el número de moles de DNA plasmídico fuera igual al número de moles de DNA genómico de las muestras. Además, para que las reacciones de amplificación de los controles y de las muestras se realizaran bajo la misma concentración masa/volumen (ng/ μ l), el DNA plasmídico se mezcló con DNA genómico de la línea celular Daudi (Fig 8b y c y 9d).

Para la detección de HTLV1 se utilizó la línea celular MJ. Ya que no se ha descrito el número de genomas virales de HTLV1 presentes en esta línea celular, el gradiente de DNA se diseñó únicamente con base al número de células, bajo el supuesto de que el número de genomas virales presentes en las blastos leucémicos sería similar al de la línea celular, al provenir ésta de una enfermedad tipo linfoma/leucemia humana, de

células T, producida por la infección de HTLV1 (fig. 9a); es decir, se consideró que bajo el principio de analogía, las características de la infección en células B deberían ser muy similares, además de que representaría la variabilidad genómica encontrada *in vivo*.

El DNA control utilizado en la detección de MMTV provino de células de bazo de ratón silvestre. El ratón es el hospedero natural del virus cuyo reservorio principal se encuentra en linfocitos B y T del bazo, por lo que como en el caso de HTLV1, este control representa la alta variabilidad genómica encontrada *in vivo*. Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c. Se ha reportado que cada célula de bazo contiene aproximadamente 10 copias del genoma viral. Como no existe a la fecha ningún cáncer humano contundentemente asociado a la infección por MMTV (o algún virus homólogo) y el genoma del ratón es únicamente 14% más pequeño que el del humano, la reacción de detección fue generada con base en el número de células usadas en cada reacción (fig 9b).

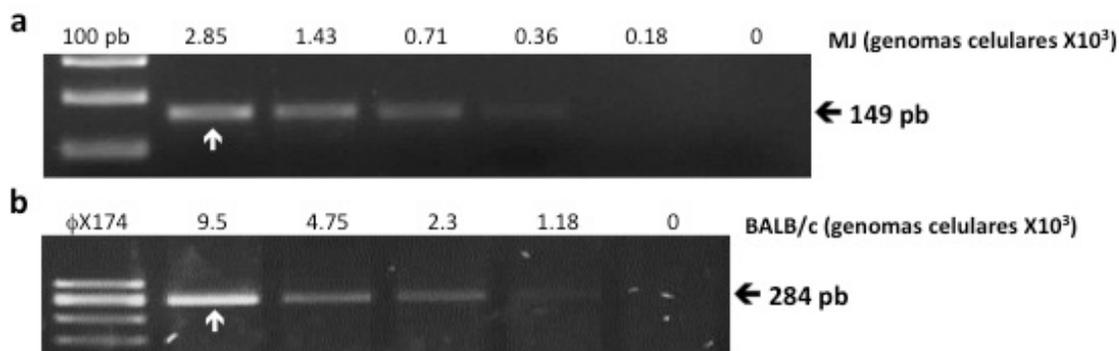


Figura 9. Límites de detección en el rastreo de retrovirus. a. Para la detección de HTLV1 se utilizó la línea celular MJ como control positivo, el límite de detección se situó en 0.36×10^3 células. 2.85×10^3 células (flecha blanca) equivalentes a 30 ng de DNA fueron utilizadas en las reacciones de detección. b. En el rastreo de MMTV, se utilizó bazo de ratón de la cepa BALB/c como fuente de DNA control. 9.5×10^3 células (100 ng) se utilizaron en las reacciones de amplificación de las muestras y el límite de detección se situó en 1.18×10^3 células. Como se puede observar, las reacciones fueron lo suficientemente sensibles para detectar el genoma viral en muestras con sólo el 25% de blastos.

5.2 Búsqueda de genomas virales en muestras biológicas

5.2.2 Población de estudio

El estudio incluyó 70 niños con diagnóstico *de novo* de LAL de los cuales 66 tuvieron LAL de precursores de células B y 4 tuvieron LAL de precursores de células T. El diagnóstico de LAL cumplió los criterios morfológicos y de inmunofenotipo (ver materiales y métodos, sección 4.2). Las características demográficas y clínicas de los pacientes se obtuvieron de los registros médicos y se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Características clínicas y demográficas de los pacientes. N=70

Edad al diagnóstico (años)	Mediana (rango) 7.6 (0.8-15.7)
Género	N (%)
Masculino	33 (47)
Femenino	37 (53)
Lugar de nacimiento	N (%)
México D.F.	63 (91)
Otro estado del sur de México	7 (9)
Porcentaje de blastos en médula ósea	Promedio (rango) 87% (25%-100%)
Inmunofenotipo	N (%)
Pre-B temprana (cALLA+)	39 (55.7)
Pre-B	16 (22.8)
Célula B	11 (15.7)
Célula T	4 (5.7)
Clasificación FAB	N (%)
L1	43 (62)
L2	26 (36)
L3	1 (2)

Re-arreglos génicos *	N (%)
ETV6-RUNX1	6 (12)
ETV6-RUNX1	2 (4)
E2A-PBX	0 (0)
MLL-AF4	0 (0)
BCR-ABL mayor y menor	42 (84)
Sin re-arreglos identificados	

* El diagnóstico molecular de los re-arreglos génicos fue llevado a cabo mediante RT-PCR. Sólo se realizó en 50 muestras, de manera que el porcentaje de muestras positivas fue calculado usando 50 como denominador.

5.2.2 Detección de genomas de herpesvirus

El rastreo de los herpesvirus EBV, HCMV y HHV6 en muestras de LAL se llevó a cabo mediante PCR estándar y anidada. Respecto a EBV, la secuencia blanco de amplificación correspondió a la región Bam HIW y fue elegida debido a que se encuentra repetida hasta 11 veces en el genoma viral. No se encontró ninguna muestra positiva por PCR estándar (primera ronda) (fig. 10a) y sólo mediante PCR anidada se encontró 14% (10/70) de muestras positivas (fig. 10b). Una PCR anidada más sensible, con menor número de ciclos de amplificación y menor cantidad de DNA control fue diseñada, bajo estas condiciones se analizaron 44 muestras y ninguna fue positiva (no mostrado).

Resultados similares fueron observados para HCMV y HHV6; muestras positivas sólo fueron observadas mediante PCR anidada, 19% (13/70) en el caso de HCMV (fig. 11b) y 9% (6/70) en el caso de HHV6 (fig. 12b).

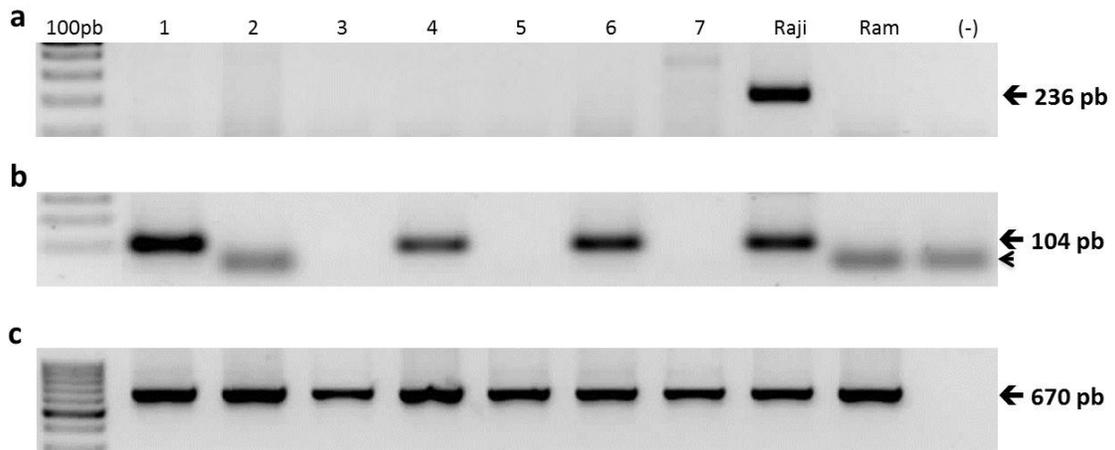


Figura 10. Detección de EBV en muestras. Imagen de cinco muestras representativas (1-5) en la que se observa que ninguna de ellas fue positiva por PCR estándar (a), mientras que el 14% fueron positivas mediante PCR anidada (b). Las líneas celulares Raji (Raj) y Ramos (Ram) fueron usadas como controles positivo y negativo respectivamente. Una reacción sin DNA se corrió rutinariamente (-). Las flechas indican el tamaño del producto esperado para cada reacción. Una cabeza de flecha en el panel b señala bandas producidas por iniciadores residuales. c. Amplificación del gen endógeno β-actina.

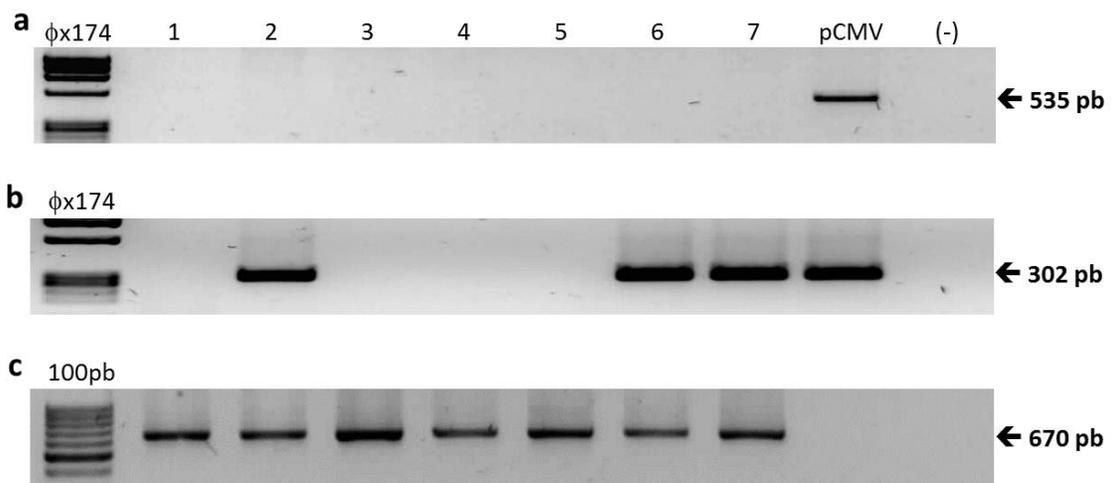


Figura 11. Detección de HCMV en muestras. Imagen de siete muestras representativas (1-7) en la que se observa que ninguna de ellas fue positiva por PCR estándar (a), mientras que el 19% fueron positivas mediante PCR anidada (b). Como control positivo se usó DNA plasmídico (pHCMV). Una reacción sin DNA se

corrió rutinariamente (-). Las flechas indican el tamaño del producto esperado para cada reacción. **c.** Amplificación del gen endógeno β -actina.

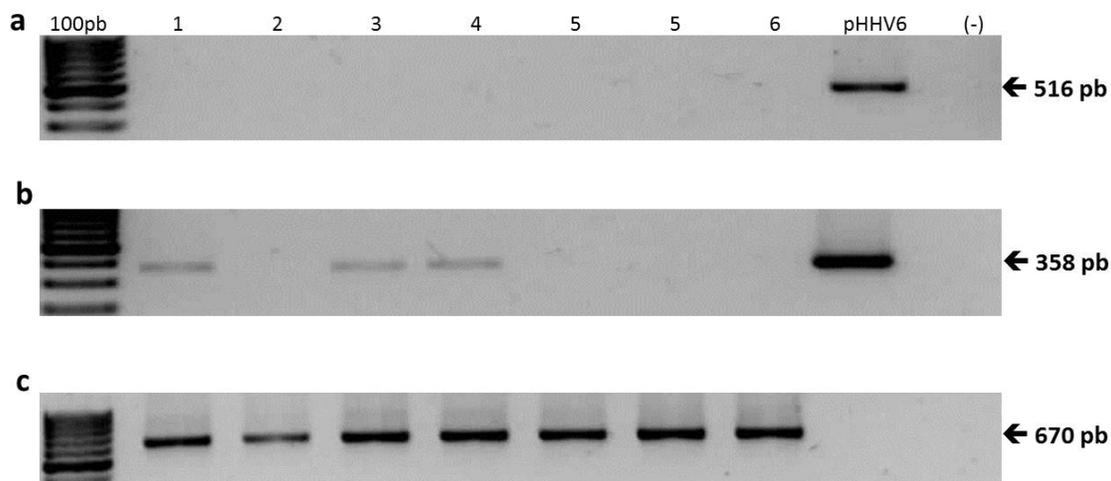


Figura 12. Detección de HHV6 en muestras. Imagen de cinco muestras representativas (1-5) en la que se observa que ninguna de ellas fue positiva por PCR estándar (**a**), sólo el 9% fueron positivas mediante PCR anidada (**b**). Como control positivo se usó DNA plasmídico (pHHV6). Una reacción sin DNA se corrió rutinariamente (-). Las flechas indican el tamaño del producto esperado para cada reacción. **c.** Amplificación del gen endógeno β -actina.

Debido a la alta sensibilidad de la PCR anidada, la señal positiva observada en estas condiciones muy probablemente provenga de unas pocas células infectadas, linfocitos circulantes o residentes de médula ósea ajenos a la clona leucémica, o bien, de blastos infectados posterior a la expansión clonal.

Ya que todas las muestras fueron positivas al gen constitutivo β -actina, no es probable que los resultados obtenidos se debieran a la mala calidad del DNA, adicionalmente, las frecuencias de positividad observadas mediante PCR anidada están en el orden de las frecuencias esperadas de estos virus en niños cuya edad se situó entre los 0.8 y 15.7 años de edad.

5.2.3 Detección de genomas de retrovirus.

El rastreo de retrovirus en muestras se llevó a cabo mediante PCR estándar y anidada. La inadecuada hibridación de los iniciadores a la cadena de DNA molde, debida a la alta tasa de mutación que presentan los retrovirus puede conducir a la obtención de falsos negativos durante la búsqueda de secuencias genómicas virales. Para disminuir esta posibilidad se implementaron las siguientes estrategias: 1. La región blanco de amplificación fue expandida realizando dos reacciones de PCR estándar y una PCR anidada confirmatoria cuyos iniciadores estuvieron dirigidos a secuencias distintas del genoma viral. 2. La temperatura de alineamiento de cada reacción fue de 55°C o menor para incrementar la probabilidad de hibridación de los iniciadores aún en presencia de alineamientos no canónicos (*mismatches*) (fig. 13).

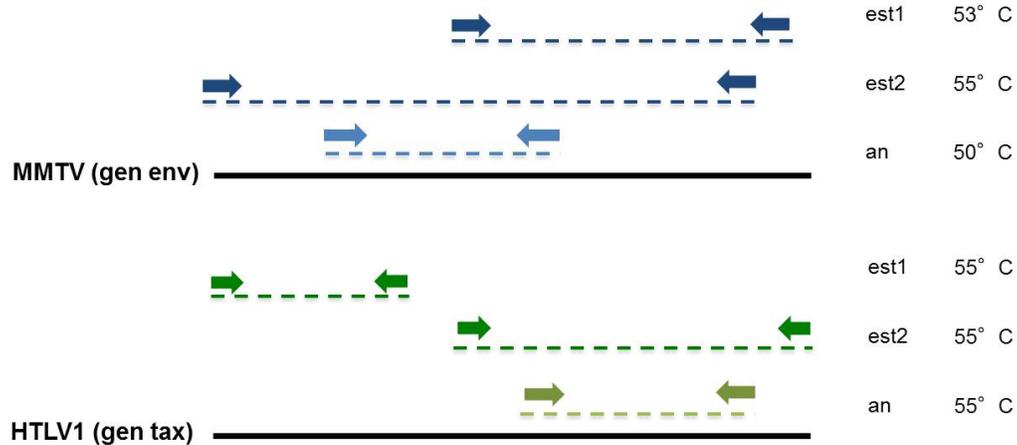


Figura 13. Diagrama esquemático de la estrategia experimental usada en la detección de retrovirus. Los genes env de MMTV y tax de HTLV1 fueron flanqueados por 3 pares de iniciadores, 2 para PCR estándar (est1 y est2) y 1 para PCR anidada (an) dirigidos a secuencias distintas del gen correspondiente con el objetivo de extender la región de amplificación. Las flechas representan los iniciadores y las líneas punteadas los fragmentos génicos que serían amplificados; las líneas continuas representan las secuencias de los genes. El esquema ubica en la posición a la que cada iniciador estuvo dirigido pero no está a escala. A la derecha se muestran las temperaturas de alineamiento que fueron usadas en las distintas reacciones.

En el caso de MMTV, las secuencias blanco de amplificación fueron escogidas por presentar baja homología con secuencias retrovirales endógenas humanas con el fin de evitar la obtención de falsos positivos provenientes de la amplificación de secuencias humanas. Utilizando estas estrategias no se detectaron muestras positivas para los retrovirus mediante PCR estándar ni anidada (Figs 14 y 15).

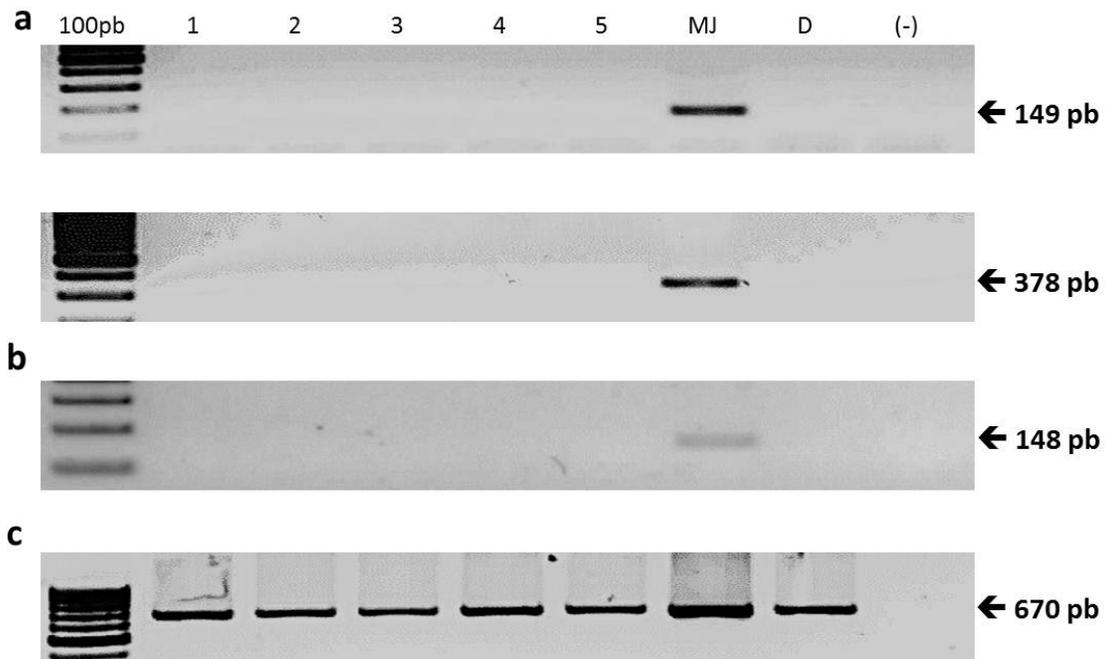


Fig. 14. Rastreo de HTLV1 en muestras. Imagen de cinco muestras representativas (1-5) en la que se observa que ninguna de ellas fue positiva por ninguna de las dos PCR estándar (a), ni anidada (b). Las líneas celulares MJ y Daudi (D) fueron usadas como controles positivo y negativo respectivamente. Una reacción sin DNA se corrió rutinariamente (-). Las flechas indican el tamaño del producto esperado para cada reacción. c. Amplificación del gen endógeno β -actina.

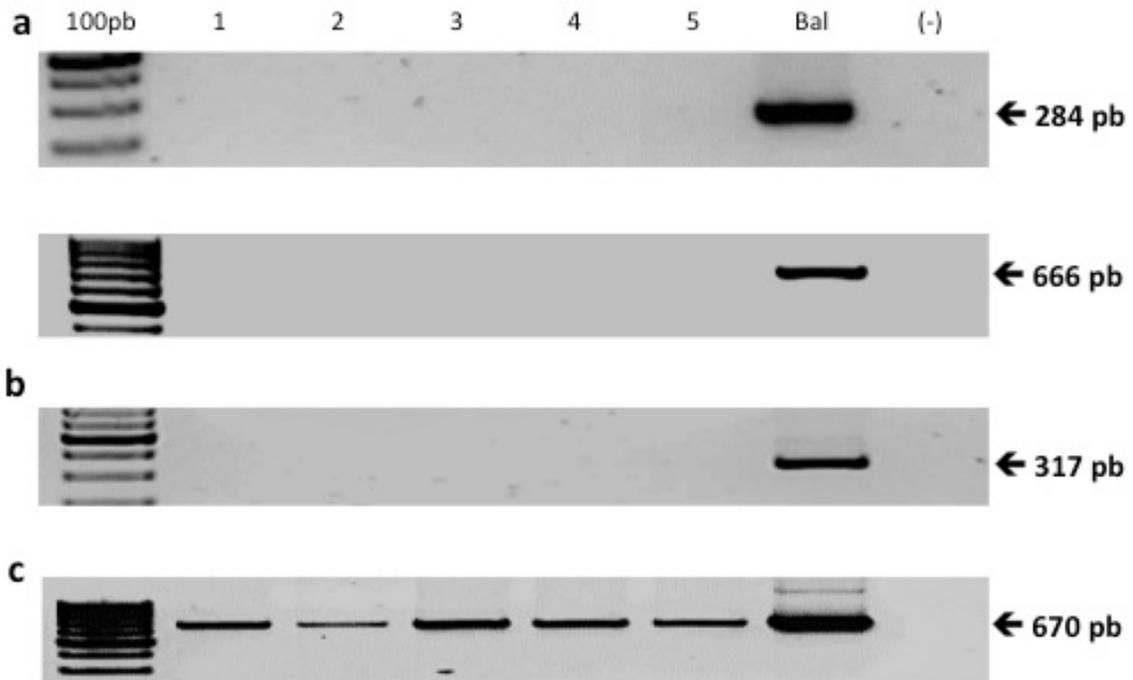


Fig. 15. Rastreo de MMTV en muestras. Imagen de cinco muestras representativas (1-5) en la que se observa que ninguna de ellas fue positiva por PCR estándar (a), ni anidada (b). Como control positivo se usaron linfocitos de bazo de ratón de la cepa BALB/c (Bal). Una reacción sin DNA se corrió rutinariamente (-). Las flechas indican el tamaño del producto esperado para cada reacción. c. Amplificación del gen endógeno β -actina.

5.2.4 Análisis estadístico

El poder estadístico de los resultados se evaluó en relación a la capacidad de un estudio con tamaño de muestra $N=70$ para detectar eventos de infección (en los que los genomas virales estuvieran presentes en todas o casi todas las células tumorales) en al menos un paciente. Utilizando el paquete estadístico Epi Info (v.7.1.240) se obtuvieron los niveles de confianza del estudio de acuerdo a distintas frecuencias de infección hipotéticas (tabla 6). Como se aprecia, el estudio tuvo un poder estadístico alto por lo que nuestros resultados sugieren que los herpesvirus EBV, HCMV y HHV6 así como los retrovirus HTLV1 y MMTV no están involucrados en la génesis de la LAL en niños mexicanos. El análisis de

asociación entre las infecciones virales y la presencia de los re-arreglos génicos ETV6-RUNX1 y MLL-AF4 en niños con LAL, no pudo llevarse a cabo debido a que no se obtuvieron muestras positivas a virus en la PCR estándar.

Tabla 6. Poder estadístico del estudio

Tamaño de la muestra (N)	Frecuencia hipotética de infección	Nivel de confianza
70	10%	99.99%
70	5%	95%

5.2.5 Análisis de infecciones y pronóstico. Considerando una probable interacción entre los herpesvirus en estudio [156-160], se exploró el posible papel de las infecciones detectadas y el pronóstico de la enfermedad. Se calculó la asociación entre cada infección o co-infección y el riesgo de presentar leucemia de alto riesgo, recaída o muerte. Ninguno de los pacientes presentó triple infección, sólo se detectaron dobles infecciones: EBV+/HCMV+, EBV+/HHV6+ y HCMV+/HHV6+. No se encontró ninguna asociación significativa en este análisis (Tabla 7). También se comparó la edad (en meses) al momento del diagnóstico y la cuenta de leucocitos entre individuos infectados y no infectados sin encontrarse diferencias significativas (datos no mostrados). A partir de estos resultados se descartó un posible papel indirecto de estas infecciones en la iniciación o progresión de la enfermedad.

Tabla 7. Infecciones y factores pronóstico

Virus N (%)	EBV+ 10 (14%)	HCMV+ 13 (19%)	HHV6+ 6 (9%)	Cualquier co-infeccion 6 (9%)
Leucemia de alto riesgo*				
OR (IC al 95%)	0.43 (0.12-1.57)	0.72 (0.22-2.32)	2.29 (0.4-15.32)	1.12 (0.24-5.2)
p	0.29	0.75	0.4	1
Recaída				
OR (IC al 95%)	1.19 (0.27-5.36)	0.88 (0.20-3.82)	1.10 (0-15-6.63)	0.81 (0.12-4.67)
P	1	1	1	1
Muerte				
OR (IC al 95%)	0.17 (0.02)	0.16 (0.02-1.08)	0.04 (0.04-2.81)	0.37 (0.05-2.03)
P	0.89	0.08	0.65	0.41

* Las leucemias de alto riesgo son aquellas en las que la cuenta de leucocitos es mayor a $50,000/\text{mm}^3$ o el paciente es menor a un año o mayor de 10 años.

6. Discusión y conclusiones

Con base a la hipótesis original de Smith sobre el origen de las leucemias en niños [97], en el presente trabajo se propuso que miembros de las familias Herpesviridae y Retroviridae podrían estar relacionadas al desarrollo de LAL infantil a través de un mecanismo de carcinogénesis directa. Ya que el cáncer es monoclonal en su origen, una de las primeras evidencias de la participación de dichos agentes en la leucemogénesis sería demostrar la presencia del genoma viral en todas (o la mayoría) de las células leucémicas. Para abordar este problema utilizamos PCR estándar, en todos los casos el límite de detección de las reacciones fue suficiente para detectar los genomas virales aún en muestras con sólo el 25% de blastos (figs. 7 y 8). No detectamos el genoma de ninguno de los virus en estudio mediante PCR estándar, por lo que en ningún caso encontramos evidencia de la participación de estos agentes en la leucemogénesis.

También se diseñó una PCR anidada, esta reacción tuvo los siguientes objetivos: en el caso de encontrar muestras positivas, el uso de iniciadores internos (por definición dirigidos a la misma secuencia que la primera reacción) confirmaría la especificidad del amplicón observado al tiempo que eliminaría falsos positivos obtenidos por reacciones inespecíficas en la PCR estándar. Por otro lado, la PCR anidada también fue útil para validar de manera global nuestro sistema de detección independientemente del resultado obtenido en la primera reacción. En relación a los herpesvirus, como esperábamos –con base en el conocimiento de que estos virus son ubicuos, se adquieren desde los primeros años de vida y mantienen reservorios en médula ósea [83, 128, 136, 146-148], obtuvimos muestras positivas a dichos agentes. Respecto a HTLV1, los únicos reportes sobre su presencia en nuestro país indican que este virus es ausente [163], por lo que nuestro resultado por PCR anidada es consistente con lo encontrado en la literatura. Finalmente, respecto a MMTV, su presencia en muestras humanas no ha sido consistentemente

demostrada [169-173], de modo que nuestro resultado apoya los trabajos en los que no se ha detectado su presencia en muestras humanas.

Trabajos previos han documentado la búsqueda de herpesvirus en LAL infantil; en uno de ellos se buscó a los virus EBV y HHV6 en 50 muestras de sangre periférica obtenidas del tamiz neonatal (mediante PCR anidada) [123] y en otro estudio se buscaron los genomas de EBV (a través de Southern blot), HHV-6, -7 y -8 (mediante PCR convencional y tiempo real) en 47 muestras de médula ósea o sangre periférica obtenidas al tiempo del diagnóstico de LAL [124] (tabla 2). En estos trabajos no se encontraron evidencias de la participación de los herpesvirus analizados en la enfermedad. En ambos estudios el tamaño de la muestra fue relativamente grande (N=50 y N=47 respectivamente), sin embargo, en el primero quedaron excluidos todos los eventos de infección que ocurrieron entre el nacimiento y la presentación de la enfermedad por lo que los resultados obtenidos estuvieron importantemente limitados. El trabajo aquí presentado buscó incluir un número mayor de muestras (N=70) que permitiera obtener un mayor poder estadístico y abarcara la ventana de tiempo desde el nacimiento hasta la presentación de la enfermedad, estos aspectos constituyen importantes ventajas sobre los trabajos previos. Adicionalmente, este es el primer trabajo en el que se incluyó al herpesvirus HCMV.

En relación a los retrovirus HTLV1 y MMTV, no hay estudios previos sobre la búsqueda de dichos agentes en leucemia infantil, por lo que aquí se reporta por primera vez la falta de evidencia sobre la participación de estos virus en la leucemogénesis. La fortaleza de estos resultados no sólo se basó en el poder estadístico del estudio sino también en el conjunto de estrategias utilizadas en la búsqueda de agentes cuya tasa de mutación es alta (apartado 5.2.3).

A la fecha sólo hay un retrovirus contundentemente asociado a cáncer en humanos: HTLV1, el cual es el agente causal de un espectro de enfermedades linfoproliferativas de células T en el adulto.

MMTV ha sido asociado a cáncer de mama en humanos; sin embargo, ya que desde el primer reporte de su presencia en dicha enfermedad en 1995 [169], los resultados obtenidos han sido muy heterogéneos, la validez de tales resultados ha sido importantemente cuestionada, por lo que a la fecha no hay evidencias suficientes de su asociación a cáncer humano (revisado en [184]). Los resultados aquí obtenidos, no apoyan la noción de un agente viral tipo MMTV en leucemia infantil.

Otros agentes virales incluyendo poliomavirus, parvovirus y anellovirus han sido rastreados en leucemia infantil sin encontrarse hasta ahora, evidencia de su participación en la enfermedad (tabla 2). Ante el cuerpo de evidencias epidemiológicas mostrando que las infecciones podrían tener un papel importante en la etiología de la leucemia infantil, se hace necesario revisar las técnicas hasta ahora empleadas en la búsqueda de tales agentes.

Desde la propuesta original de Smith sobre la participación directa de agentes virales en el desarrollo de la leucemia infantil, la búsqueda de genomas de los agentes candidatos se ha llevado a cabo de forma individual mediante técnicas clásicas de biología molecular, *ie*, PCR (estándar, anidada y tiempo real) y/o southern blot. Debe considerarse que la búsqueda de virus en forma individual constituye una estrategia limitada, ya que se restringe a un pequeño número de agentes cuyos rasgos biológicos y secuencias genómicas han sido al menos parcialmente descritas. En este sentido, los métodos de secuenciación de nueva generación (NGS del inglés next-generation sequencing) y el uso de técnicas bioinformáticas resultan atractivas herramientas debido a su alta sensibilidad

y a su potencial para detectar el espectro completo de virus incluyendo agentes no descritos. Gracias al uso de estas metodologías, en años recientes, Meng y colaboradores descubrieron un nuevo virus y demostraron su asociación al carcinoma de células de Merkel, el ahora conocido poliomavirus de células de Merkel [43].

Por otro lado, debe también considerarse que el papel que pudieran tener ciertas infecciones en la aparición de la LAL podría ser el de agentes causales actuando de forma indirecta, es decir promoviendo la transformación celular sin hospedarse en la célula leucémica. Como se mencionó previamente, la hipótesis de la “infección tardía” de Greaves propone que la exposición a agentes infecciosos en los primeros años de vida modula la maduración del sistema inmune y evita una respuesta aberrante ante infecciones “vistas” de forma tardía por el sistema inmune, que en niños genéticamente susceptibles actúan como factores promotores de leucemia.

Aunque el papel indirecto de las infecciones en el desarrollo de LAL no fue uno de los objetivos de este estudio, al analizar la asociación entre las infecciones detectadas y algunos factores pronóstico (presentar leucemia de alto riesgo, recaída o muerte, Tabla 7), así como al comparar las diferencias en las cuentas de leucocitos entre niños infectados y no infectados (datos no mostrados), no se encontró ningún dato significativo. Adicionalmente, al considerar la propuesta de que los herpesvirus frecuentemente actúan en concierto en padecimientos como síndrome de fátiga crónica, mononucleosis infecciosa y/o enfermedades post-transplante [156-160], se analizó la relación entre las co-infecciones y los factores pronóstico antes mencionados pero tampoco se encontró alguna asociación estadísticamente significativa. Por lo tanto, no obtuvimos evidencia de una posible interacción entre los herpesvirus estudiados.

Aunque la hipótesis de Greaves constituye la propuesta más aceptada sobre el papel de las infecciones en LAL, en algunos reportes se ha argumentado que los trabajos que dan sustento a dicha hipótesis presentan importantes sesgos y que la asociación propuesta no ha sido demostrada bajo criterios metodológicamente estrictos [185, 186].

Al margen de la discusión –válida- sobre las metodologías utilizadas para probar las distintas hipótesis sobre infecciones y leucemia infantil debe considerarse que dicha enfermedad alberga un conjunto complejo de entidades biológicas que incluyen diferentes estadios de diferenciación de la clona leucémica (proB temprano, preB-I y preB-II), expresión diferencial de antígenos, re-arreglos génicos particulares, diferencias en los picos de edad, entre otras diferencias, por lo anterior, es muy probable que la enfermedad tenga diferentes orígenes. En México, por ejemplo se han reportado dos picos de incidencia, el primero ocurre a los 2-3 años de edad y el segundo a los 6-9 años [107], es probable que estas diferencias en la edad de presentación sean el reflejo de una etiología distinta. Aunque en este trabajo no exploramos el papel indirecto de las infecciones en el desarrollo de LAL, hipotetizamos que el primer pico de incidencia (2 a 3 años) estaría asociado a la infección con virus con alto potencial leucemogénico, lo que más probablemente ocurriría a través de un mecanismo de carcinogénesis directa. Mientras que una respuesta alterada del sistema inmune a las infecciones tardías, sería más probablemente asociada al segundo pico (6 a 9 años); lo anterior, en analogía a las enfermedades producidas por infecciones retardadas, como es el caso de mononucleosis infecciosa asociada a EBV, se sabe que la adquisición temprana de este agente no produce enfermedad y que casos graves asociados a la infección sólo se presentan cuando esta ocurre durante la adolescencia o más tarde [187]. Interesantemente, la mononucleosis asociada a EBV constituye un factor de riesgo al desarrollo de linfoma [188]. Sin embargo, al comparar las edades de los niños que presentaron infección o co-

infección y los que no las presentaron, no encontramos una asociación estadísticamente significativa (datos no mostrados).

Debe considerarse que las infecciones que de forma indirecta estarían promoviendo la leucemia (a través del modelo propuesto por Greaves o a través de otro mecanismo indirecto) no son necesariamente sintomáticas. ¿Podría ser la presentación de la enfermedad el resultado de un conjunto complejo de exposiciones a agentes infecciosos sintomáticos y no sintomáticos en un fondo genético de susceptibilidad? Si la respuesta fuera afirmativa, la evaluación de exposiciones a través de medición de anticuerpos o los datos de infecciones y vacunación obtenidos mediante registros médicos y entrevistas no serían las herramientas adecuadas para evaluar el papel de dichas infecciones en la aparición de la leucemia, más aún si estos se evalúan de forma individual.

Para enfrentar parte de este problema, una probable estrategia proviene de la evaluación a gran escala de marcadores de exposición, por ejemplo a través de la medición simultánea de decenas de citocinas y quimiocinas séricas de pacientes y controles en los que se analice la tendencia a la formación de grupos (*clustering analysis*) con base en distintas variables como magnitud y frecuencia de los analitos en estudio. Actualmente ya existen plataformas experimentales (por ejemplo *Bio-Plex Pro™ Human Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Assays*, [189-191]) y herramientas bioinformáticas (por ejemplo *NTSYS Software*, <http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsyspc.html>) para llevar a cabo el análisis propuesto. El diseño metodológico podría involucrar otras variables como aspectos clínicos, características demográficas, presencia de re-arreglos génicos, etc.

Es posible que la linfoproliferación que caracteriza a la LAL resulte de una estimulación inmune continua promovida por infecciones repetidas. Sin embargo, casi cualquier agente

infeccioso sería responsable de este efecto y en este estudio sólo analizamos la posible participación de agentes transformantes directos. Existen ejemplos de estimulación antigénica crónica que conducen a cáncer, como el linfoma MALT asociado a la infección por *Helicobacter pylori* y el virus de hepatitis C [192-195]. Debido a que estas neoplasias en adultos se originan después de décadas de estimulación antigénica, no es probable que la LAL infantil surja a partir de un mecanismo similar. En linfomas de células maduras, la identidad del receptor de antígeno proporciona información sobre el origen de la linfoproliferación, sin embargo, ya que la mayoría de las LALs ocurren en células que no han completado los re-arreglos de su receptor de antígenos, este escenario es más difícil de corroborar.

El último objetivo del presente estudio, relacionado a la medición de la asociación entre las infecciones virales y la presencia de los re-arreglos génicos ETV6-RUNX1 y MLL-AF4 en niños con LAL, no pudo llevarse a cabo debido a que no se obtuvieron muestras positivas a virus en la PCR estándar. En relación a la frecuencia del re-arreglo génico ETV6-RUNX1, se encontró que estuvo presente en 12% (6/50) de las muestras, sin embargo su frecuencia a nivel mundial se sitúa en alrededor del 25% [9, 10]. Nuestro resultado es consistente con estudios previos realizados en México [11-13] y apoya la propuesta de que la etiología de la leucemia en la población hispana es distinta a la de países desarrollados [196]. Por otro lado, la frecuencia del re-arreglo génico MLL-AF4 que aquí encontramos (0%) contrasta con el estudio previo de nuestro país en el que se reportó una frecuencia del 65.4% (17/26) [11]; sin embargo nuestro resultado es consistente con los hallazgos mundiales sobre la baja frecuencia de esta translocación en niños mayores de un año [28-31]. Las bajas frecuencias de translocaciones encontradas también evitaron que se pudiera hacer un análisis estadístico sobre la asociación entre las infecciones detectadas por PCR anidada y la presencia de dichas translocaciones.

En conclusión, este trabajo y el de otros grupos no han logrado describir la identidad del agente(s) involucrado(s) en el desarrollo de LAL, sea a través de un mecanismo de transformación directo o indirecto, lo que hace necesario el uso de nuevas estrategias de búsqueda masiva de agentes infecciosos descritos y no descritos. Los diseños de búsqueda futuros siempre deberán tomar en cuenta que la heterogeneidad de la leucemia infantil debe ser el reflejo de la complejidad de su historia natural incluyendo su origen, siendo probable que distintos factores etiológicos (incluyendo eventos de infección múltiples) sólo presentados en ciertas combinaciones conduzcan a la aparición de la enfermedad.

7. Referencias

1. Pui, C.H., L.L. Robison, and A.T. Look, *Acute lymphoblastic leukaemia*. Lancet, 2008. **371**(9617): p. 1030-43.
2. Greaves, M., *Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(3): p. 193-203.
3. Pui, C.H., et al., *Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update*. J Clin Oncol, 2011. **29**(5): p. 551-65.
4. McNeil, D.E., et al., *SEER update of incidence and trends in pediatric malignancies: acute lymphoblastic leukemia*. Med Pediatr Oncol, 2002. **39**(6): p. 554-7; discussion 552-3.
5. Mejia-Arangure, J.M., et al., *Incidence of leukemias in children from El Salvador and Mexico City between 1996 and 2000: population-based data*. BMC Cancer, 2005. **5**: p. 33.
6. Fajardo-Gutierrez, A., et al., *[Risk factors associated with the development of leukemia in children]*. Bol Med Hosp Infant Mex, 1993. **50**(4): p. 248-57.
7. Mejia-Arangure, J.M., et al., *Incidence trends of acute leukemia among the children of Mexico City: 1982-1991*. Arch Med Res, 1996. **27**(2): p. 223-7.
8. Greaves, M., *Childhood leukaemia*. BMJ, 2002. **324**(7332): p. 283-7.
9. Gandemer, V., et al., *Five distinct biological processes and 14 differentially expressed genes characterize TEL/AML1-positive leukemia*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 385.
10. Romana, S.P., et al., *High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1995. **86**(11): p. 4263-9.
11. Daniel-Cravioto, A., et al., *Genetic rearrangement MLL/AF4 is most frequent in children with acute lymphoblastic leukemias in Mexico City*. Leuk Lymphoma, 2009. **50**(8): p. 1352-60.
12. Perez-Vera, P., et al., *Detection of ETV6 and RUNX1 gene rearrangements using fluorescence in situ hybridization in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia: experience at a single institution*. Cancer Genet Cytogenet, 2005. **162**(2): p. 140-5.
13. Perez-Vera, P., et al., *Analysis of gene rearrangements using a fluorescence in situ hybridization method in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia: experience at a single institution*. Cancer Genet Cytogenet, 2008. **184**(2): p. 94-8.
14. Odero, M.D., et al., *Identification of new translocations involving ETV6 in hematologic malignancies by fluorescence in situ hybridization and spectral karyotyping*. Genes Chromosomes Cancer, 2001. **31**(2): p. 134-42.
15. Bohlander, S.K., *ETV6: a versatile player in leukemogenesis*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(3): p. 162-74.
16. Ichikawa, M., et al., *AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis*. Nat Med, 2004. **10**(3): p. 299-304.
17. Growney, J.D., et al., *Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype*. Blood, 2005. **106**(2): p. 494-504.
18. Sun, W. and J.R. Downing, *Haploinsufficiency of AML1 results in a decrease in the number of LTR-HSCs while simultaneously inducing an increase in more mature progenitors*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3565-72.
19. Kitabayashi, I., et al., *Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation*. EMBO J, 1998. **17**(11): p. 2994-3004.
20. Levanon, D., et al., *Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11590-5.

21. Fenrick, R., et al., *Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 6566-74.
22. Zelent, A., M. Greaves, and T. Enver, *Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4275-83.
23. Holleman, A., et al., *Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment*. N Engl J Med, 2004. **351**(6): p. 533-42.
24. Pieters, R., et al., *A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial*. Lancet, 2007. **370**(9583): p. 240-50.
25. Slany, R.K., *When epigenetics kills: MLL fusion proteins in leukemia*. Hematol Oncol, 2005. **23**(1): p. 1-9.
26. Marschalek, R., *Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy*. FEBS J, 2010. **277**(8): p. 1822-31.
27. Liu, H., E.H. Cheng, and J.J. Hsieh, *MLL fusions: pathways to leukemia*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(13): p. 1204-11.
28. Trka, J., et al., *[Detection of BCR/ABL, MLL/AF4 and TEL/AML1 hybrid genes and monitoring of minimal residual disease in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia]*. Cas Lek Cesk, 1999. **138**(1): p. 12-7.
29. Pallisgaard, N., et al., *Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia*. Blood, 1998. **92**(2): p. 574-88.
30. Ariffin, H., et al., *Validation of a multiplex RT-PCR assay for screening significant oncogene fusion transcripts in children with acute lymphoblastic leukaemia*. Singapore Med J, 2003. **44**(10): p. 517-20.
31. Elia, L., et al., *A multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction strategy for the diagnostic molecular screening of chimeric genes: a clinical evaluation on 170 patients with acute lymphoblastic leukemia*. Haematologica, 2003. **88**(3): p. 275-9.
32. Mann, G., et al., *Acute lymphoblastic leukemia with t(4;11) in children 1 year and older: The 'big sister' of the infant disease?* Leukemia, 2007. **21**(4): p. 642-6.
33. Jansen, M.W., et al., *Immunobiological diversity in infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of MLL gene rearrangement*. Leukemia, 2007. **21**(4): p. 633-41.
34. Pui, C.H. and D. Campana, *Age-related differences in leukemia biology and prognosis: the paradigm of MLL-AF4-positive acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2007. **21**(4): p. 593-4.
35. Moore, P.S. and Y. Chang, *Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(12): p. 878-89.
36. Parkin, D.M., *The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002*. Int J Cancer, 2006. **118**(12): p. 3030-44.
37. Kanegane, H., et al., *Biological aspects of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes in chronic active EBV infection and associated malignancies*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **44**(3): p. 239-49.
38. Burkitt, D., *A sarcoma involving the jaws in African children*. Br J Surg, 1958. **46**(197): p. 218-23.
39. Koch, R., *Untersuchungen über Bakterien: V. Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus anthracis [Investigations into*

- bacteria: V. The etiology of anthrax, based on the ontogenesis of Bacillus anthracis*]. Cohns Beitrage zur Biologie der Pflanzen 1876. **2**(2): p. 277-310.
40. Thompson, M.P. and R. Kurzrock, *Epstein-Barr virus and cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(3): p. 803-21.
 41. Chang, Y., et al., *Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma*. Science, 1994. **266**(5192): p. 1865-9.
 42. zur Hausen, H., *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 342-50.
 43. Feng, H., et al., *Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma*. Science, 2008. **319**(5866): p. 1096-100.
 44. Beasley, R.P., et al., *Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan*. Lancet, 1981. **2**(8256): p. 1129-33.
 45. Choo, Q.L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. Science, 1989. **244**(4902): p. 359-62.
 46. Poiesz, B.J., et al., *Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(12): p. 7415-9.
 47. Butel, J.S., *Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease*. Carcinogenesis, 2000. **21**(3): p. 405-26.
 48. Loeb, L.A., C.F. Springgate, and N. Battula, *Errors in DNA replication as a basis of malignant changes*. Cancer Res, 1974. **34**(9): p. 2311-21.
 49. Prindle, M.J., E.J. Fox, and L.A. Loeb, *The mutator phenotype in cancer: molecular mechanisms and targeting strategies*. Curr Drug Targets, 2010. **11**(10): p. 1296-303.
 50. Carrillo-Infante, C., et al., *Viral infections as a cause of cancer (review)*. Int J Oncol, 2007. **30**(6): p. 1521-8.
 51. Plug-DeMaggio, A.W., et al., *Telomere erosion and chromosomal instability in cells expressing the HPV oncogene 16E6*. Oncogene, 2004. **23**(20): p. 3561-71.
 52. Duensing, S. and K. Munger, *The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability*. Cancer Res, 2002. **62**(23): p. 7075-82.
 53. Duensing, S., et al., *Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype*. Cancer Res, 2001. **61**(6): p. 2356-60.
 54. Duensing, S., et al., *The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10002-7.
 55. Chen, J.J., *Genomic Instability Induced By Human Papillomavirus Oncogenes*. N Am J Med Sci (Boston), 2010. **3**(2): p. 43-47.
 56. zur Hausen, H., *Viruses in human cancers*. Science, 1991. **254**(5035): p. 1167-73.
 57. Scheffner, M., et al., *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1129-36.
 58. Scheffner, M., et al., *The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53*. Cell, 1993. **75**(3): p. 495-505.
 59. Reznikoff, C.A., et al., *Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed human uroepithelial cells*. Cancer Res, 1996. **56**(13): p. 2886-90.
 60. Dyson, N., et al., *The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product*. Science, 1989. **243**(4893): p. 934-7.

61. Ghittoni, R., et al., *The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses*. *Virus Genes*, 2010. **40**(1): p. 1-13.
62. Blattner, W.A., *Human retroviruses: their role in cancer*. *Proc Assoc Am Physicians*, 1999. **111**(6): p. 563-72.
63. Voisset, C., R.A. Weiss, and D.J. Griffiths, *Human RNA "rumor" viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008. **72**(1): p. 157-96, table of contents.
64. Zur Hausen, H., *The search for infectious causes of human cancers: where and why*. *Virology*, 2009. **392**(1): p. 1-10.
65. Fukuda, A., et al., *Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression*. *Cancer Cell*, 2011. **19**(4): p. 441-55.
66. Lesina, M., et al., *Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer*. *Cancer Cell*, 2011. **19**(4): p. 456-69.
67. Grivennikov, S., et al., *IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer*. *Cancer Cell*, 2009. **15**(2): p. 103-13.
68. Gao, S.P., et al., *Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(12): p. 3846-56.
69. Bollrath, J., et al., *gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis*. *Cancer Cell*, 2009. **15**(2): p. 91-102.
70. Takai, A., et al., *A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations*. *Oncogene*, 2009. **28**(4): p. 469-78.
71. Okazaki, I.M., A. Kotani, and T. Honjo, *Role of AID in tumorigenesis*. *Adv Immunol*, 2007. **94**: p. 245-73.
72. Komori, J., et al., *Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma*. *Hepatology*, 2008. **47**(3): p. 888-96.
73. Endo, Y., et al., *Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation and the development of colitis-associated colorectal cancers*. *Gastroenterology*, 2008. **135**(3): p. 889-98, 898 e1-3.
74. Mills, K.D., D.O. Ferguson, and F.W. Alt, *The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis*. *Immunol Rev*, 2003. **194**: p. 77-95.
75. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
76. Campregher, C., M.G. Luciani, and C. Gasche, *Activated neutrophils induce an hMSH2-dependent G2/M checkpoint arrest and replication errors at a (CA)₁₃-repeat in colon epithelial cells*. *Gut*, 2008. **57**(6): p. 780-7.
77. Peek, R.M., Jr. and M.J. Blaser, *Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(1): p. 28-37.
78. Poli, G., *Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress*. *Mol Aspects Med*, 2000. **21**(3): p. 49-98.
79. Samal, J., M. Kandpal, and P. Vivekanandan, *Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection*. *Clin Microbiol Rev*, 2012. **25**(1): p. 142-63.
80. Tang, H. and H. Grise, *Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis*. *Clin Sci (Lond)*, 2009. **117**(2): p. 49-65.
81. Bernstein, W.B., et al., *Acquired immunodeficiency syndrome-related malignancies in the era of highly active antiretroviral therapy*. *Int J Hematol*, 2006. **84**(1): p. 3-11.
82. Chadburn, A., et al., *Lymphoid proliferations associated with human immunodeficiency virus infection*. *Arch Pathol Lab Med*, 2013. **137**(3): p. 360-70.

83. Michaelis, M., H.W. Doerr, and J. Cinatl, *The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions*. Neoplasia, 2009. **11**(1): p. 1-9.
84. Trincado, D.E. and W.D. Rawlinson, *Congenital and perinatal infections with cytomegalovirus*. J Paediatr Child Health, 2001. **37**(2): p. 187-92.
85. Yamamoto, A.Y., et al., *Congenital cytomegalovirus infection as a cause of sensorineural hearing loss in a highly immune population*. Pediatr Infect Dis J, 2011. **30**(12): p. 1043-6.
86. Boldogh, I., et al., *Alteration in the coding potential and expression of H-ras in human cytomegalovirus-transformed cells*. Intervirology, 1994. **37**(6): p. 321-9.
87. Geder, K.M., et al., *Oncogenic transformation of human embryo lung cells by human cytomegalovirus*. Science, 1976. **192**(4244): p. 1134-7.
88. Geder, L., J. Kreider, and F. Rapp, *Human cells transformed in vitro by human cytomegalovirus: tumorigenicity in athymic nude mice*. J Natl Cancer Inst, 1977. **58**(4): p. 1003-9.
89. Geder, L., et al., *Alterations in biological properties of different lines of cytomegalovirus-transformed human embryo lung cells following in vitro cultivation*. IARC Sci Publ, 1978(24 Pt 2): p. 591-601.
90. 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.
91. Scheurer, M.E., et al., *Detection of human cytomegalovirus in different histological types of gliomas*. Acta Neuropathol, 2008. **116**(1): p. 79-86.
92. Cobbs, C.S., et al., *Modulation of oncogenic phenotype in human glioma cells by cytomegalovirus IE1-mediated mitogenicity*. Cancer Res, 2008. **68**(3): p. 724-30.
93. Maussang, D., et al., *Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(35): p. 13068-73.
94. Schulz, T.E. and J.C. Neil, *Viruses and Leukemia*, in *Leukemia*, E.S. Henderson, A.T. Lister, and M.F. Greaves, Editors. 2002, Saunders: Pensilvania. p. 200-225.
95. Greaves, M.F., *Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 1988. **2**(2): p. 120-5.
96. Kinlen, L., *Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain*. Lancet, 1988. **2**(8624): p. 1323-7.
97. Smith, M., *Considerations on a possible viral etiology for B-precursor acute lymphoblastic leukemia of childhood*. J Immunother, 1997. **20**(2): p. 89-100.
98. Dockerty, J.D., et al., *Case-control study of parental age, parity and socioeconomic level in relation to childhood cancers*. Int J Epidemiol, 2001. **30**(6): p. 1428-37.
99. Infante-Rivard, C., I. Fortier, and E. Olson, *Markers of infection, breast-feeding and childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Br J Cancer, 2000. **83**(11): p. 1559-64.
100. Jourdan-Da Silva, N., et al., *Infectious diseases in the first year of life, perinatal characteristics and childhood acute leukaemia*. Br J Cancer, 2004. **90**(1): p. 139-45.
101. Perrillat, F., et al., *Day-care, early common infections and childhood acute leukaemia: a multicentre French case-control study*. Br J Cancer, 2002. **86**(7): p. 1064-9.
102. Petridou, E., et al., *Age of exposure to infections and risk of childhood leukaemia*. BMJ, 1993. **307**(6907): p. 774.
103. Ma, X., et al., *Ethnic difference in daycare attendance, early infections, and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(8): p. 1928-34.
104. Brown, W.M. and R. Doll, *Leukaemia in Childhood and Young Adult Life*. Br Med J, 1961. **1**(5231): p. 981-8.
105. Hewitt, D., *Some features of leukaemia mortality*. Br J Prev Soc Med, 1955. **9**(2): p. 81-8.

106. Ramot, B. and I. Magrath, *Hypothesis: the environment is a major determinant of the immunological sub-type of lymphoma and acute lymphoblastic leukaemia in children*. Br J Haematol, 1982. **50**(2): p. 183-9.
107. Bernaldez-Rios, R., et al., *The age incidence of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Mexico City*. J Pediatr Hematol Oncol, 2008. **30**(3): p. 199-203.
108. Flores-Lujano, J., et al., *Breastfeeding and early infection in the aetiology of childhood leukaemia in Down syndrome*. Br J Cancer, 2009. **101**(5): p. 860-4.
109. Draper, G.J., et al., *Cancer in Cumbria and in the vicinity of the Sellafield nuclear installation, 1963-90*. BMJ, 1993. **306**(6870): p. 89-94.
110. Heasman, M.A., et al., *Childhood leukaemia in northern Scotland*. Lancet, 1986. **1**(8475): p. 266.
111. Gardner, M.J., et al., *Results of case-control study of leukaemia and lymphoma among young people near Sellafield nuclear plant in West Cumbria*. BMJ, 1990. **300**(6722): p. 423-9.
112. Kinlen, L.J., *Epidemiological evidence for an infective basis in childhood leukaemia*. Br J Cancer, 1995. **71**(1): p. 1-5.
113. Kinlen, L., *Childhood leukaemia, nuclear sites, and population mixing*. Br J Cancer, 2011. **104**(1): p. 12-8.
114. Kinlen, L.J. and C. Hudson, *Childhood leukaemia and poliomyelitis in relation to military encampments in England and Wales in the period of national military service, 1950-63*. BMJ, 1991. **303**(6814): p. 1357-62.
115. Kinlen, L.J., K. Clarke, and C. Hudson, *Evidence from population mixing in British New Towns 1946-85 of an infective basis for childhood leukaemia*. Lancet, 1990. **336**(8715): p. 577-82.
116. Kinlen, L.J., M. Dickson, and C.A. Stiller, *Childhood leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma near large rural construction sites, with a comparison with Sellafield nuclear site*. BMJ, 1995. **310**(6982): p. 763-8.
117. Kinlen, L.J. and S.M. John, *Wartime evacuation and mortality from childhood leukaemia in England and Wales in 1945-9*. BMJ, 1994. **309**(6963): p. 1197-202.
118. Koushik, A., W.D. King, and J.R. McLaughlin, *An ecologic study of childhood leukemia and population mixing in Ontario, Canada*. Cancer Causes Control, 2001. **12**(6): p. 483-90.
119. Laplanche, A. and F. de Vathaire, *Leukaemia mortality in French communes (administrative units) with a large and rapid population increase*. Br J Cancer, 1994. **69**(1): p. 110-3.
120. MacKenzie, J., et al., *JC and BK virus sequences are not detectable in leukaemic samples from children with common acute lymphoblastic leukaemia*. Br J Cancer, 1999. **81**(5): p. 898-9.
121. Smith, M.A., et al., *Investigation of leukemia cells from children with common acute lymphoblastic leukemia for genomic sequences of the primate polyomaviruses JC virus, BK virus, and simian virus 40*. Med Pediatr Oncol, 1999. **33**(5): p. 441-3.
122. Priftakis, P., et al., *Human polyomavirus DNA is not detected in Guthrie cards (dried blood spots) from children who developed acute lymphoblastic leukemia*. Med Pediatr Oncol, 2003. **40**(4): p. 219-23.
123. Bogdanovic, G., et al., *Human herpes virus 6 or Epstein-Barr virus were not detected in Guthrie cards from children who later developed leukaemia*. Br J Cancer, 2004. **91**(5): p. 913-5.
124. MacKenzie, J., et al., *Screening for herpesvirus genomes in common acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2001. **15**(3): p. 415-21.

125. Isa, A., et al., *Human parvovirus B19 DNA is not detected in Guthrie cards from children who have developed acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2004. **42**(4): p. 357-60.
126. Bender, A.P., et al., *No involvement of bovine leukemia virus in childhood acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma*. *Cancer Res*, 1988. **48**(10): p. 2919-22.
127. Shiramizu, B., et al., *Investigation of TT virus in the etiology of pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Hematol Oncol*, 2002. **19**(8): p. 543-51.
128. Lehtinen, M., et al., *Maternal herpesvirus infections and risk of acute lymphoblastic leukemia in the offspring*. *Am J Epidemiol*, 2003. **158**(3): p. 207-13.
129. Gerber, P., et al., *Association of EB-virus infection with the post-perfusion syndrome*. *Lancet*, 1969. **1**(7595): p. 593-5.
130. Hoagland, R.J., *The transmission of infectious mononucleosis*. *Am J Med Sci*, 1955. **229**(3): p. 262-72.
131. Goldberg, G.N., et al., *In utero Epstein-Barr virus (infectious mononucleosis) infection*. *JAMA*, 1981. **246**(14): p. 1579-81.
132. Meyohas, M.C., et al., *Study of mother-to-child Epstein-Barr virus transmission by means of nested PCRs*. *J Virol*, 1996. **70**(10): p. 6816-9.
133. IARC, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 2012. p. 485.
134. Young, L., et al., *Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease*. *N Engl J Med*, 1989. **321**(16): p. 1080-5.
135. Raab-Traub, N., *Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC*. *Semin Cancer Biol*, 2002. **12**(6): p. 431-41.
136. Klein, G., E. Klein, and E. Kashuba, *Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **396**(1): p. 67-73.
137. Henle, W., et al., *Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells*. *Science*, 1967. **157**(3792): p. 1064-5.
138. Pope, J.H., *Establishment of cell lines from peripheral leucocytes in infectious mononucleosis*. *Nature*, 1967. **216**(5117): p. 810-1.
139. Saridakis, V., et al., *Structure of the p53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to Epstein-Barr nuclear antigen 1 implications for EBV-mediated immortalization*. *Mol Cell*, 2005. **18**(1): p. 25-36.
140. Bornkamm, G.W., *Epstein-Barr virus and its role in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: an unresolved issue*. *Semin Cancer Biol*, 2009. **19**(6): p. 351-65.
141. Young, L.S. and A.B. Rickinson, *Epstein-Barr virus: 40 years on*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(10): p. 757-68.
142. Stinski, M.F. and H. Isomura, *Role of the cytomegalovirus major immediate early enhancer in acute infection and reactivation from latency*. *Med Microbiol Immunol*, 2008. **197**(2): p. 223-31.
143. Kwon, Y.J., et al., *Human cytomegalovirus (HCMV) infection in osteosarcoma cell line suppresses GM-CSF production by induction of TGF-beta*. *Microbiol Immunol*, 2004. **48**(3): p. 195-9.
144. Michelson, S., et al., *Human cytomegalovirus infection induces transcription and secretion of transforming growth factor beta 1*. *J Virol*, 1994. **68**(9): p. 5730-7.
145. Wick, W., U. Naumann, and M. Weller, *Transforming growth factor-beta: a molecular target for the future therapy of glioblastoma*. *Curr Pharm Des*, 2006. **12**(3): p. 341-9.
146. Yoshikawa, T., et al., *Distribution of antibodies to a causative agent of exanthem subitum (human herpesvirus-6) in healthy individuals*. *Pediatrics*, 1989. **84**(4): p. 675-7.

147. 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.
148. De Bolle, L., L. Naesens, and E. De Clercq, *Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(1): p. 217-45.
149. Ogata, M., *Human herpesvirus 6 in hematological malignancies*. J Clin Exp Hematop, 2009. **49**(2): p. 57-67.
150. Levine, P.H., et al., *Antibodies to human herpes virus-6 in patients with acute lymphocytic leukemia*. Leukemia, 1992. **6**(11): p. 1229-31.
151. Gentile, G., et al., *Human herpes virus-6 seroprevalence and leukaemias: a case-control study*. GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell' Adulto). Br J Cancer, 1999. **80**(7): p. 1103-6.
152. Salonen, M.J., et al., *Antibody status to HHV-6 in children with leukaemia*. Leukemia, 2002. **16**(4): p. 716-9.
153. Razzaque, A., *Oncogenic potential of human herpesvirus-6 DNA*. Oncogene, 1990. **5**(9): p. 1365-70.
154. Razzaque, A., et al., *Neoplastic transformation of immortalized human epidermal keratinocytes by two HHV-6 DNA clones*. Virology, 1993. **195**(1): p. 113-20.
155. Kashanchi, F., et al., *Human herpesvirus 6 (HHV-6) ORF-1 transactivating gene exhibits malignant transforming activity and its protein binds to p53*. Oncogene, 1997. **14**(3): p. 359-67.
156. Chapenko, S., et al., *Association of active human herpesvirus-6, -7 and parvovirus b19 infection with clinical outcomes in patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome*. Adv Virol, 2012. **2012**: p. 205085.
157. Wang, X., et al., *Coinfection with EBV/CMV and other respiratory agents in children with suspected infectious mononucleosis*. Virol J, 2010. **7**: p. 247.
158. *Other herpesviruses: HHV-6, HHV-7, HHV-8, HSV-1 and -2, VZV*. Am J Transplant, 2004. **4 Suppl 10**: p. 66-71.
159. 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.
160. Ratnamohan, V.M., et al., *Cytomegalovirus and human herpesvirus 6 both cause viral disease after renal transplantation*. Transplantation, 1998. **66**(7): p. 877-82.
161. Yoshida, M., I. Miyoshi, and Y. Hinuma, *Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(6): p. 2031-5.
162. Yoshida, M., et al., *Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(8): p. 2534-7.
163. Gongora-Biachi, R.A., et al., *[Infection with HTLV virus type I-II in patients with cervico-uterine cancer in the Yucatan peninsula, Mexico]*. Ginecol Obstet Mex, 1997. **65**: p. 141-4.
164. Gonzalez-Martinez, P., et al., *[Infection by human T-cell lymphotropic virus type I/II in polytransfused patients in the state of Yucatan, Mexico]*. Sangre (Barc), 1994. **39**(1): p. 45-8.
165. Yasunaga, J. and M. Matsuoka, *Leukaemogenic mechanism of human T-cell leukaemia virus type I*. Rev Med Virol, 2007. **17**(5): p. 301-11.
166. Manel, N., et al., *The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV*. Cell, 2003. **115**(4): p. 449-59.

167. Sun, S.C. and S. Yamaoka, *Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation*. *Oncogene*, 2005. **24**(39): p. 5952-64.
168. Grassmann, R., M. Aboud, and K.T. Jeang, *Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax*. *Oncogene*, 2005. **24**(39): p. 5976-85.
169. Wang, Y., et al., *Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer*. *Cancer Res*, 1995. **55**(22): p. 5173-9.
170. Bindra, A., et al., *Search for DNA of exogenous mouse mammary tumor virus-related virus in human breast cancer samples*. *J Gen Virol*, 2007. **88**(Pt 6): p. 1806-9.
171. Lawson, J.S., et al., *Presence of mouse mammary tumour-like virus gene sequences may be associated with morphology of specific human breast cancer*. *J Clin Pathol*, 2006. **59**(12): p. 1287-92.
172. Melana, S.M., J.F. Holland, and B.G. Pogo, *Search for mouse mammary tumor virus-like env sequences in cancer and normal breast from the same individuals*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(2): p. 283-4.
173. Park, D.J., et al., *No evidence of MMTV-like env sequences in specimens from the Australian Breast Cancer Family Study*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **125**(1): p. 229-35.
174. Ross, S.R., *MMTV infectious cycle and the contribution of virus-encoded proteins to transformation of mammary tissue*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2008. **13**(3): p. 299-307.
175. Baillie, G.J., et al., *Multiple groups of endogenous betaretroviruses in mice, rats, and other mammals*. *J Virol*, 2004. **78**(11): p. 5784-98.
176. Golovkina, T.V., et al., *Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection*. *Cell*, 1992. **69**(4): p. 637-45.
177. Held, W., et al., *Superantigen-induced immune stimulation amplifies mouse mammary tumor virus infection and allows virus transmission*. *Cell*, 1993. **74**(3): p. 529-40.
178. Minowada, J., T. Onuma, and G.E. Moore, *Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes*. *J Natl Cancer Inst*, 1972. **49**(3): p. 891-5.
179. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. *J Mol Biol*, 1990. **215**(3): p. 403-10.
180. Labrecque, L.G., et al., *Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study*. *Cancer Res*, 1995. **55**(1): p. 39-45.
181. Magni, G., et al., *Bakers' yeast uridine nucleosidase. Purification, composition, and physical and enzymatic properties*. *J Biol Chem*, 1975. **250**(1): p. 9-13.
182. Adams, A., *Replication of latent Epstein-Barr virus genomes in Raji cells*. *J Virol*, 1987. **61**(5): p. 1743-6.
183. Liu, P., et al., *Direct sequencing and characterization of a clinical isolate of Epstein-Barr virus from nasopharyngeal carcinoma tissue by using next-generation sequencing technology*. *J Virol*, 2011. **85**(21): p. 11291-9.
184. Joshi, D. and G.C. Buehring, *Are viruses associated with human breast cancer? Scrutinizing the molecular evidence*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. **135**(1): p. 1-15.
185. Cardwell, C.R., et al., *Infections in early life and childhood leukaemia risk: a UK case-control study of general practitioner records*. *Br J Cancer*, 2008. **99**(9): p. 1529-33.
186. Roman, E., et al., *Childhood acute lymphoblastic leukemia and infections in the first year of life: a report from the United Kingdom Childhood Cancer Study*. *Am J Epidemiol*, 2007. **165**(5): p. 496-504.
187. Stock, I., *[Infectious mononucleosis--a "childhood disease" of great medical concern]*. *Med Monatsschr Pharm*, 2013. **36**(10): p. 364-8.
188. Hjalgrim, H., *On the aetiology of Hodgkin lymphoma*. *Dan Med J*, 2012. **59**(7): p. B4485.

189. Wright, H., et al., *Multiplex cytokine profiling of initial therapeutic response in patients with chronic hepatitis C virus infection*. Dig Dis Sci, 2005. **50**(10): p. 1793-803.
190. Powell, C., et al., *Characterisation of the cytokine inflammatory response in LPS stimulated full-term cord blood*. J Perinat Med, 2004. **32**(5): p. 440-5.
191. Kerr, J.R., et al., *Circulating cytokines and chemokines in acute symptomatic parvovirus B19 infection: negative association between levels of pro-inflammatory cytokines and development of B19-associated arthritis*. J Med Virol, 2004. **74**(1): p. 147-55.
192. Isaacson, P.G. and M.Q. Du, *MALT lymphoma: from morphology to molecules*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(8): p. 644-53.
193. Rosa, D., et al., *Activation of naive B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18544-9.
194. Sagaert, X., et al., *Gastric MALT lymphoma: a model of chronic inflammation-induced tumor development*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010. **7**(6): p. 336-46.
195. Viswanatha, D.S. and A. Dogan, *Hepatitis C virus and lymphoma*. J Clin Pathol, 2007. **60**(12): p. 1378-83.
196. Aldrich, M.C., et al., *Cytogenetics of Hispanic and White children with acute lymphoblastic leukemia in California*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(3): p. 578-81.

8. Anexos

8.1 Anexo 1: Autorización del protocolo de Investigación por las comisiones Científica y Ética del Instituto Mexicano del Seguro Social.

SIRELCIS

Página 1 de 1



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

"2011, Año del Turismo en México"

27 de septiembre del 2011

Ref. 09-B5-61-2800/201100/1567

Dr. Mejía Aranguré Juan Manuel
Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica Hospital de Pediatría Siglo XXI
Nivel Central

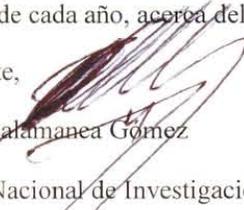
Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **"Relación entre virus oncogénicos de las familias Herpesviridae y Retroviridae y la presencia de Leucemia Aguda Linfoblástica infantil con re-arreglos génicos ETV6-RUNX1 o MLL-AF4"**, fue sometido a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales de la Comisión de Ética y Científica, se ha emitido el dictamen de **AUTORIZADO**, con número de registro: R-2011-785-048.

De acuerdo a la normatividad institucional vigente, deberá informar a esta Comisión en los meses de Junio y Diciembre de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo.

Atentamente,


Dr. Fabio Salamanca Gómez
Presidente
Comisión Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:

 MMA/iah. F-CNIC-2011-88

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4º piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores México 06720 56276900 ext. 21210 comisa@cis.gub.mx

8.2 Anexo 2: Carta de Consentimiento Informado y carta de asentimiento

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

“RELACIÓN ENTRE VIRUS ONCOGÉNICOS DE LAS FAMILIAS HERPESVIRIDAE Y RETROVIRIDAE Y LA PRESENCIA DE LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA INFANTIL CON RE-ARREGLOS GÉNICOS ETV6-RUNX1 O MLL-AF4”

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

UMAE, Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica, Hospital de Pediatría CMN SXXI.

Lo (a) estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo en la Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI y este Centro Hospitalario.

El estudio tiene como propósito evaluar la presencia de virus y los re-arreglos génicos ETV6-RUNX1 y MLL-AF4 en el desarrollo de Leucemia Aguda infantil.

Usted ha sido invitado(a) a participar en este estudio porque su niño (a) fue recientemente diagnosticado con Leucemia Aguda, por lo que pensamos que pudiera ser un buen candidato para participar en este proyecto.

Al igual que usted, aproximadamente 284 personas más serán invitadas a participar en todos los hospitales de las instituciones participantes que atienden niños con Leucemia Aguda en la Ciudad de México. En este centro en particular, _ personas más serán invitadas a participar e incluidas en este estudio.

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:

a) Le pediremos que nos indique la fecha y hora en la que usted pueda concedernos una entrevista, necesitamos que asista usted y su cónyuge para hacerles preguntas acerca de sus datos sociodemográficos como nombre(s) completos, fecha(s) de nacimiento, características de su vivienda, escolaridad, ingreso económico y número de hijos. También se le preguntarán datos de enfermedades recientes y pasadas de su niño (a) como peso al nacimiento, vacunas, infecciones, hospitalización por infecciones y exposiciones ambientales en su hogar.

b) Tomaremos una muestra de sangre venosa de uno de sus brazos, aproximadamente media cucharada de su sangre, para realizarle un estudio de biología molecular. Nos tardaremos aproximadamente 10 minutos en tomarle la muestra de sangre. El propósito de realizarle el estudio de biología molecular es para identificar la presencia de alguno de estos virus: EBV, MMTV/HMTV, HHV6 y HHCMV y saber más sobre la enfermedad de su hijo.

C) Además de lo anteriormente mencionado deseamos estudiar si tiene alguna susceptibilidad genética a la leucemia; mediante el estudio de sus genes nos permitirá obtener mayor información sobre el desarrollo, tratamiento y pronóstico de la enfermedad. Nuestros genes son un código especial que todos heredamos de nuestros padres y es este código el que define el color de nuestra piel, ojos, pelo y de muchas otras características de cada quien. No obstante algunas características genéticas se adquieren después de la concepción, lo cual provoca mutaciones que pueden predisponer a un individuo al desarrollo de una enfermedad. Estas mutaciones no son heredadas por consiguiente no es responsabilidad de ninguno de los padres el que un hijo sea portador de ellas. En el caso de la Leucemia Aguda infantil, se ha descrito que existe alguna relación entre el desarrollo de esta enfermedad y la susceptibilidad genética a la que le llamaremos _____ (ETV6-RUNX1 o MLL-AF4), que aunque no es el único factor, sí puede ser uno de ellos. Por este motivo, nos gustaría saber más sobre sus genes. Esto podría ayudar a conocer el origen de ésta enfermedad. Su muestra será cuidadosamente resguardada en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y parasitarias. Cabe aclarar que la muestra genética sólo será usada para este estudio, al término del análisis y publicación del estudio el resto de la muestra será destruida.

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 por motivos de su enfermedad el que se le sustraiga una muestra sanguínea. Nosotros estamos en coordinación con el personal médico y de laboratorio para tomar la muestra en el mismo momento que se le esté tomando otra como parte del manejo y control de su enfermedad.

Respecto a la muestra de médula ósea el cual, cabe aclarar que este estudio es el que se debe realizar para poder diagnosticar la leucemia aguda, sentirá un pinchazo y una sensación de ardor con la anestesia local. Este procedimiento lo harán los hematólogos/oncólogos, quienes son especialistas. Puede haber algún sangrado en el sitio de la punción. Son muy raros los riesgos más serios como el sangrado o infección severos. La muestra para nuestro estudio será el sobrante de lo que no se requiera para realizar el diagnóstico de la leucemia. En ningún caso haremos una toma de muestra de médula ósea más allá de la que se requiera para el diagnóstico y control de la enfermedad.

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 la prueba genética que le realizaremos le proporcionará información a su médico tratante de un diagnóstico con mayor precisión del tipo de leucemia aguda que tiene su hijo. Además le permitirá al médico tratante darle mayor información sobre el pronóstico y evolución posible de la enfermedad de su hijo. La identificación de los virus que estamos buscando le permitirá a su médico hacer una evaluación de potenciales riesgos de infección subsecuente que su hijo pudiera presentar al ser portador de esos virus. No existe una cura para la infección con estos virus, ni su presencia 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 no amerita que su hijo reciba tratamiento médico. No obstante su médico conocerá el tipo de agentes que sean identificados en su hijo o la ausencia de los mismos 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 agentes virales relacionados con el desarrollo de leucemia aguda en presencia de un factor genético que predisponga a la enfermedad. No obstante este estudio no permitirá identificar si estos agentes virales son la causa de la leucemia.

4. Resultados

Los resultados genéticos de las muestras que se les tomen se les entregarán en el momento en que se les informe sobre su diagnóstico. El médico tratante (Hematólogo/Oncólogo) es el único capacitado y con la autoridad para señalar de acuerdo a los resultados si se modifica el tratamiento.

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 proporcione que pudiera ser utilizada para identificar a su hijo(a) (su nombre, teléfono y dirección) será guardada de manera confidencial y por separado al igual que sus respuestas a los cuestionarios y de los resultados de sus pruebas clínicas, para garantizar su privacidad.

El equipo de investigadores, su médico tratante en el Servicio de Hematología/Oncología, su médico familiar y las personas que estén involucradas en el cuidado de su salud sabrán que usted está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información que usted nos 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 con el Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré, que es el investigador responsable del estudio, o a la M. en C. Abigail Morales Sánchez al teléfono: 56276900 Ext. 22451, 22453 y 22408 en la Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica en el tercer piso de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, ubicada en Avenida Cuauhtémoc 330, 06720. México, DF.

8. Personal de contacto para dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación

Si usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, a los Teléfonos. 56276900-21216, de 9 a 16:00 hrs; o si así lo prefiere al correo electrónico: conise@cis.gob.mx. La Comisión de ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

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

heredamos de nuestros padres. No obstante algunas características genéticas se adquieren después de la concepción, lo cual provoca mutaciones que pueden predisponer a un individuo al desarrollo de una enfermedad. Estas mutaciones no son heredadas por consiguiente no es responsabilidad de ninguno de los padres el que un hijo sea portador de ellas. En el caso de la Leucemia Aguda infantil, se ha descrito que existe alguna relación entre el desarrollo de esta enfermedad y la susceptibilidad genética a la que le llamaremos _____ (ETV6-RUNX1 o MLL-AF4), que aunque no es el único factor, sí puede ser uno de ellos. Por este motivo, nos gustaría saber más sobre sus genes. Esto podría ayudar a conocer el origen de ésta enfermedad.

En caso de que acepten participar, tu participación consiste en que te haremos algunas preguntas relacionadas con exposiciones a algunos factores ambientales en tu casa y/o escuela, también le haremos preguntas a tus padres o tutores sobre estos factores ambientales. Y también le pediremos al Hemato-oncólogo una muestra de tu médula ósea que tiene que sacar para poder diagnosticarte, y también tomaremos una muestra de sangre venosa de uno de sus brazos, aproximadamente media cucharada de tu sangre, para realizarte un estudio de biología molecular. Nos tardaremos aproximadamente 10 minutos en tomarte una muestra de sangre. El propósito de realizarte el estudio de biología molecular es para identificar la presencia de alguno de estos virus: EBV, MMTV/HMTV, HHV6 y HHCMV y saber más sobre tu enfermedad. Los resultados de estos estudios se le entregarán a tu médico tratante, lo que le ayudará a establecer tu tratamiento para combatir tu enfermedad. Tu médico, puede explicarte el resultado de este estudio y también lo hará con tus papás.

Es muy importante tu participación, no sólo para conocer tu enfermedad, sino para ayudar a que otros niños no la desarrollen.

El Dr (a) _____, te explicó de qué se trata este estudio de investigación, tú sabes que esta investigación está haciéndose para aprender más sobre Leucemia Aguda en los niños. También puedes dejar de ser parte de este estudio de investigación en cualquier momento que lo decidas. Estar en este estudio es tu decisión. Tú deberás recibir respuestas a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda antes y durante el estudio.

Tu puede decir SI o NO. Si dices SI y cambia tu forma de pensar después, no hay problema, pues cualquiera que sea tu decisión, tu Doctor estará al pendiente de ti.

Si los resultados del estudio son publicados, tu identidad permanecerá anónima.

A ti se te ha dado la oportunidad de decidir si participas en el estudio y tus preguntas han sido respondidas. Si se te ocurren algunas preguntas después, puedes llamar a la Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré al teléfono 5627-6900 Ext. 22451 o 22453 o a la M. en C. Abigail Morales Sánchez al teléfono 5627-6900 Ext. 22408.

Si tu firmas este asentimiento, tus padres o representantes legales también deberán firmar el Formato de Consentimiento Informado para poder así hacerlo válido. Una vez que este documento haya sido firmado, tú recibirás una copia.

PACIENTE

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)	

8.3 Anexo 3: Soluciones empleadas en la preparación de células competentes DH5 α

TF-1 (100 ml)

Componente	Concentración (mM)	Peso (g)
Acetato de potasio	30	0.2944
RbCl	100	1.2092
CaCl ₂	10	0.111
MnCl ₂	24.65	0.488
Glicerol	15%	15 ml
Agua destilada c.b.p.	--	100 ml

Ajustar el pH de la solución a 5.8 gota a gota con ácido acético. Filtrar por 0.22 μ m en condiciones de esterilidad.

TF-2 (100 ml)

Componente	Concentración (mM)	Peso (g)
MOPS o PIPES	10	0.2093
RbCl	10	0.12092
CaCl ₂	75	0.8325
Glicerol	15%	15 ml
Agua destilada c.b.p.	--	100 ml

Ajustar el pH de la solución a 6.5 gota a gota con solución de hidróxido de sodio saturada. Filtrar por 0.22 μ m en condiciones de esterilidad.

Medio SOC (80 ml)

Componente	Concentración (mM u otra)	Peso (g)
Triptona	2%	1.6
Extracto de levadura	0.5%	0.4
NaCl	10 mM	0.0472
KCl	2.5 mM	0.0186
MgCl ₂	10 mM	800 μ l de solución stock 1M
MgSO ₄ 7H ₂ O	10mM	0.197
Glucosa	20 mM	0.288
Agua milli-Q c.b.p.	--	80 ml

Adicionar y disolver en agua milli-Q y antes de aforar al volumen final, ajustar el pH a 7, posteriormente esterilizar a 110°C, 10 libras de presión controlada por 30 minutos.

8.4 Artículos publicados

Lack of Evidence for Human T-Lymphotropic Virus Type 1 and Mouse Mammary Tumor–Like Virus Involvement in the Genesis of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia

Abigail Morales-Sánchez^{1,3}, Roberto Bernáldez-Ríos⁴, Francisco Javier Álvarez-Rodríguez⁴, Vilma Carolina Bekker-Méndez⁴, Arturo Fajardo-Gutiérrez⁴, José de Diego Flores-Chapa⁴, Janet Flores-Lujano⁴, Elva Jiménez-Hernández⁴, José Gabriel Peñaloza-González⁴, María del Carmen Rodríguez-Zepeda⁴, José Refugio Torres-Nava⁴, Martha Margarita Velázquez-Aviña⁴, Raquel Amador-Sánchez⁴, Martha Alvarado-Ibarra⁴, Nancy Reyes-Zepeda⁴, Rosa Martha Espinosa-Elizondo⁴, Ezequiel M. Fuentes-Pananá², and Juan Manuel Mejía-Aranguré^{1,4}

Abstract

Background: In Mexico City, the incidence of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) is one of the highest in the world; epidemiologic evidence suggests that infectious agents could be involved in the genesis of this disease. Early transmitted oncogenic retroviruses infecting lymphocytes are important candidates.

Methods: PCR-based assays were used to screen viral genomic sequences of human T-cell lymphotropic virus, type 1 (HTLV1) and mouse mammary tumor virus (MMTV)–like virus (MMTV-LV) in leukemic cells from 67 pediatric patients with ALL.

Results: Viral genomic sequences were not detected in any sample by neither standard nor nested PCR.

Conclusions: Because of the methodologic strictness and high statistical power of the study, these results suggest that HTLV1 and MMTV-LV are not involved in the genesis of childhood ALL in Mexican children.

Impact: To our knowledge, this is the first work exploring the direct participation of HTLV1 and MMTV-LV retroviruses in childhood ALL development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 1–4. ©2013 AACR.

Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common type of childhood malignancy worldwide and Mexico City has one of the highest reported incidence rates at 49.5 cases per million (1). Identification of the causes that

lead to the development of the disease remains a scientific challenge as discernible etiologic factors for almost all cases of primary leukemia are unknown. Several epidemiologic studies have suggested that infections are involved, with different lines of evidence pointing to viral agents acting via direct oncogenic mechanisms; nevertheless, the identity of such agent(s) is presently unknown. This issue is reviewed elsewhere (2). Mexico City presents a higher incidence of infectious diseases than cities from developed countries and a recent study showed that serious infections in the first year of life were associated with increased risk of ALL in children with Down syndrome (3). The *Retroviridae* family members are attractive candidates due to their promotion of oncogenesis through insertional mutagenesis and because they are known causative agents of leukemia in animals and humans. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV1) is responsible for adult human T-cell leukemia (4), while mouse mammary tumor virus (MMTV) is responsible for mouse breast tumors and lymphomas (5), and the participation of an MMTV-like virus (MMTV-LV) has been suggested in human breast cancer. Both HTLV1 and MMTV infect B- and T-lymphocytes and can be transmitted intrauterine and by breast milk (4, 5). In

Authors' Affiliations: Units of Medical Research in ¹Clinical Epidemiology and ²Infectious and Parasitic Diseases, Pediatric Hospital, National Medical Center XXI Century, Mexican Institute of Social Security; ³Medicine Faculty, National Autonomous University of Mexico; and ⁴Mexican Inter-institutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukemia (MIGICL), Mexico City, Mexico

E.M. Fuentes-Pananá and J. M. Mejía-Aranguré contributed equally to this work.

Corresponding Authors: Ezequiel M. Fuentes-Pananá, Unit of Medical Research in Infectious and Parasitic Diseases, Pediatric Hospital, National Medical Center XXI Century, Mexican Institute of Social Security, Av. Cuauhtémoc 330. Col. Doctores, México. D.F. CP. 06720, Mexico. Phone: 52 556276900, ext. 22408; Fax: 52 556276900; E-mail: empanana@yahoo.com; and Juan Manuel Mejía-Aranguré, Unit of Medical Research in Clinical Epidemiology, Pediatric Hospital, National Medical Center XXI Century, Mexican Institute of Social Security, Av. Cuauhtémoc 330. Col. Doctores, México. D.F. CP. 06720, Mexico. Phone: 52 556276900, ext. 22451; Fax: 52 556276942; E-mail: juan.mejiaa@imss.gob.mx

doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0539

©2013 American Association for Cancer Research.

this study, we assessed whether HTLV1 and MMTV-LV are involved in the genesis of childhood B-cell and T-cell ALL.

Materials and Methods

The cases recruited in this study belong to the Mexican Inter-institutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukaemia (MIGICCL; Mexico City, Mexico), member of the Childhood Leukemia International Consortium (CLIC) since 2012. Sixty-seven patients (61 of B-ALL and 6 of T-ALL) were enrolled during the period of the study (January 1, 2010 to August 30, 2012). Parents of enrolled patients signed a letter of consent and children of age more than 10 years also signed a letter of assent and were treated according to the ethical guidelines of our institution. All cases were from Mexico City, patient's age ranged from 0.7 to 15.7 years (median = 7.6 years), gender distribution was 54% female. Diagnostic of precursor B- and T-cell ALL fulfilled the morphologic and phenotypic criteria. The average of leukemic blasts in bone marrow was 86% (range, 25%–100%). The screening of viral sequences was carried out using standard and nested PCR assays. DNA was obtained from bone marrow mononuclear cells fractions using QIAamp DNA extraction kits (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. All samples were subjected to β -actin gene amplification. PCR reactions contained 25 to 100 ng of DNA (first PCR) or 0.05 μ L of product of first round PCR (nested PCR); PCR buffer contained 1.5 to 2.5 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 200 nmol/L of each primer, and 2.5 U of Taq Polymerase (Thermo Fisher Scientific). All primers used are described in Table 1 and the amplification conditions are detailed in Fig. 1.

Results

We screened the presence of HTLV1 and MMTV-LV in bone marrow samples of childhood B- and T-cell ALL

by PCR. The experimental approach to detect retroviral sequences was strict in several aspects (Fig. 1A). Under these conditions, we failed to detect positive samples for none of the retroviruses by standard and nested PCRs (Fig. 1B and C). Because the study's statistical power to detect one or more positive subject from our study population ($N = 67$) from hypothetical 10% and 5% frequencies of infection had a confidence of 99.99% and 95.00%, respectively, our results suggest that these retroviruses are not involved in the genesis of childhood ALL.

Discussion

To our knowledge, this is the first work exploring the direct participation of HTLV1 and MMTV-LV retroviruses in childhood ALL, however, other oncogenic viruses have been screened in leukemic cells, also with negative results (2). The investigation of the role of infectious agents in the etiology of childhood leukemia is based on distinct hypothesis arguing for both direct and indirect mechanisms; this work is based on the original Smith's hypothesis for a direct causative role (reviewed in ref. 2). The delayed infection hypothesis by Greaves argues for an indirect role for infections, however, epidemiologic studies testing Greaves' hypothesis have shown conflicting results [this issue is reviewed elsewhere (6)]. The different proposals about the infectious etiology of ALL have been tested by epidemiologic, demographic, and experimental studies finding the same variable results (6), population genetic traits could explain these differences. It is very likely that childhood leukemia is etiologically linked to infections, however, to show it, the use of new methodologic strategies is the following and necessary step. For direct oncogenic mechanism, the list of candidate viruses is not exhausted; next-generation sequencing is an attractive approach to ask for the presence of known and unknown infectious agents in leukemic cells.

Table 1. Primers used to identify HTLV1 and MMTV-LV genomic sequences by standard and nested PCR

Virus (gene)	HTLV1 (<i>tax</i>)	MMTV-LV (<i>env</i>)	β -Actin
	5' → 3'	5' → 3'	5' → 3'
First round 1	F CGGATACCCAGTCTACGTGT	F CGAGCTAAGCGATTC	F CCTAAGGCCAACCCTGAAAAG
	R CGATGGACGCGTTATCGGCTC (7)	R AGGTATGCCACAGAT ^b (8)	R TCTTCATGGTGCTAGGAGCCA
First round 2	F TGTTCCCTACAACGAATAG	F CCTCACTGCCAGATC	—
	R GTGTGAGAGTAGAAATGAGG ^a	R CATCTGCCTGTGTAC ^c	—
Nested	F ACAAGCGAATAGAAGAAGCTC	F GTATGAAGCAGGATGGGTAG	—
	R ATAAAGGAGGAGGACTGT ^a	R ATAGTCGTAGGCAGAAGAG ^a	—

Abbreviations: F, forward; R, reverse.

^aThese primers were designed for this study using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

^bBecause the presence of MMTV-LV in human breast cancer has been questioned, to reduce false positives, primers targeted regions with low identity to human endogenous retroviral sequences (8).

^cModified sequences of primers 2 and 4 reported in ref. 8.

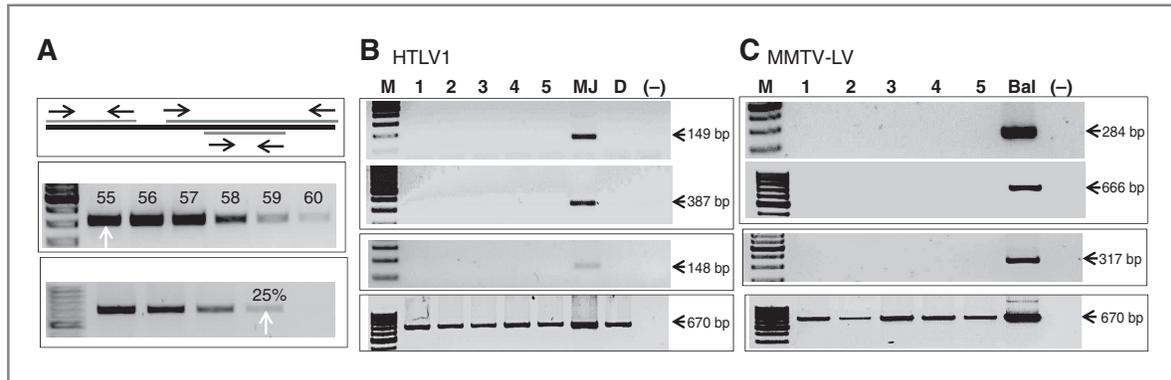


Figure 1. Experimental approach and viral genomic sequences screening in leukemic cells from pediatric ALL samples. **A**, to reduce the possibility of false negatives due to inadequate primer recognition (resulting from the high mutation rate occurring in retroviruses), we expanded the target region of amplification using two pairs of primers for each virus; additionally a nested PCR was implemented to confirm the first PCRs (top shows a schematic representation of primers target sites). Also, a gradient of annealing temperature was carried out to optimize every reaction, and the chosen annealing temperature was 55°C or less (white arrow) to increase the probability of primers hybridization even in the presence of mismatches (middle). The bottom shows a representative template gradient using DNA from positive controls. The bands correspond to the approximate signals we would observe in the samples considering that in ALL at least 25% of bone marrow cells are leukemic cells, then the limit of detection of the reactions was adjusted to equate at least 25% of infected cells (white arrow); fainter signals would indicate that the virus was not present in every leukemic cell. **B** and **C**, five (1–5) representative samples of first round PCRs (top) to detect HTLV1 (**B**) and MMTV-LV (**C**) are shown; two different regions of HTLV1 *tax* and MMTV *env* genes were targeted (amplicons of 149 and 387 and of 284 and 666, respectively). For HTLV1 screening, DNA from MJ (ATCC, CRL-8293) and Daudy (D; kindly provided by Dr. Mario Vega, Oncology Hospital, National Medical Center XXI Century) cell lines were used as positive and negative controls, respectively. In the case of MMTV-LV screening, we used DNA from BALB/c splenocytes (Bal; kindly provided by Dr. K. Chávez, Pediatric Hospital, National Medical Center XXI Century) as positive control. A reaction without DNA was run routinely (–). To discriminate molecular sizes, 100 bp molecular weight marker (M; Thermo Fisher Scientific) was used. The black arrows indicate the expected molecular size for every reaction. The amplification conditions were: 94°C (7'), followed by 35 cycles of 94°C (1'), 55°C (1'), and 72°C (1') with a final extension step of 72°C (10'). Nested PCR for all samples was carried out and confirmed the previous negative results (**B** and **C**, middle). The amplification conditions were: 94°C (5'), followed by 15 cycles of 94°C (45''), 55°C (45''), and 72°C (45'') with a final extension step of 72°C (10'). Amplification of β -actin endogenous gene was positive for all samples (bottom). The amplification conditions for β -actin were the same described for first round PCRs for viral detection. The amplification products were subjected to electrophoresis in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide and photographed under ultraviolet light using the Quantum ST4 System (ViberLourmat).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: R. Bernáldez-Ríos, M. Alvarado-Ibarra, E.M. Fuentes-Pananá, J.M. Mejía-Aranguré

Development of methodology: A. Morales-Sánchez, R. Bernáldez-Ríos, F.J. Álvarez-Rodríguez, V.C. Bekker-Méndez, J. Flores-Lujano, E. Jiménez-Hernández, J.R. Torres-Nava, M. Alvarado-Ibarra, R.M. Espinosa-Elizondo, E.M. Fuentes-Pananá, J.M. Mejía-Aranguré

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): A. Morales-Sánchez, R. Bernáldez-Ríos, F.J. Álvarez-Rodríguez, V.C. Bekker-Méndez, J. de Diego Flores-Chapa, J. Flores-Lujano, E. Jiménez-Hernández, J.G. Peñaloza-González, M. del Carmen Rodríguez-Zepeda, J.R. Torres-Nava, M.M. Velázquez-Aviña, R. Amador-Sánchez, M. Alvarado-Ibarra, N. Reyes-Zepeda, R.M. Espinosa-Elizondo, J.M. Mejía-Aranguré

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): A. Morales-Sánchez, A. Fajardo-Gutiérrez, E.M. Fuentes-Pananá, J.M. Mejía-Aranguré

Writing, review, and/or revision of the manuscript: A. Morales-Sánchez, M. Alvarado-Ibarra, E.M. Fuentes-Pananá, J.M. Mejía-Aranguré

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): J. de Diego Flores-Chapa, J. Flores-

Lujano, E. Jiménez-Hernández, R.M. Espinosa-Elizondo, J.M. Mejía-Aranguré

Study supervision: R. Bernáldez-Ríos, V.C. Bekker-Méndez, M. Alvarado-Ibarra, E.M. Fuentes-Pananá, J.M. Mejía-Aranguré

Acknowledgments

This work constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program of Doctor Degree in Biomedical Sciences, Medicine Faculty, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico. A. Morales-Sánchez acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT), National Autonomous University of Mexico, and Mexican Institute of the Social Security (IMSS).

Grant Support

This work was funded by the National Council of Science and Technology (CONACyT), Grants 2010-1-141026, CB-2007-1-83949, and 2007-1-18-71223, and by the Mexican Institute of Social Security (Mexico City, Mexico), Grants FIS/IMSS/PROT/G10/846 and FIS/IMSS/PROT/C2007/056 (to J.M. Mejía-Aranguré).

Received May 31, 2013; revised August 21, 2013; accepted August 21, 2013; published OnlineFirst September 9, 2013.

References

- Perez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, Martínez-Avalos A, Medina-Sanson A, Espinosa-Hernández L, et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* 2011;11:355.
- Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2006;6:193–203.
- Flores-Lujano J, Perez-Saldivar ML, Fuentes-Pananá EM, Gorodezky C, Bernáldez-Ríos R, Del Campo-Martínez MA, et al. Breastfeeding and

- early infection in the aetiology of childhood leukaemia in Down syndrome. *Br J Cancer* 2009;101:860–4.
4. Lairmore MD, Haines R, Anupam R. Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Curr Opin Virol* 2012; 2:474–81.
 5. Ross SR. MMTV infectious cycle and the contribution of virus-encoded proteins to transformation of mammary tissue. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008;13:299–307.
 6. Morales-Sánchez A, Fuentes-Pananá EM. Infectious etiology of childhood acute lymphoblastic leukemia, hypotheses and evidence. In: Mejia-Arangure JM, editor. *Clinical epidemiology of acute lymphoblastic leukemia—from the molecules to the clinic*. Rijeta, Croatia: Intech; 2013. p. 19–39.
 7. Hjelle B, Scalf R, Swenson S. High frequency of human T-cell leukemia-lymphoma virus type II infection in New Mexico blood donors: determination by sequence-specific oligonucleotide hybridization. *Blood* 1990;76:450–4.
 8. Wang Y, Holland JF, Bleiweiss IJ, Melana S, Liu X, Pelisson I, et al. Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. *Cancer Res* 1995;55:5173–9.

EBV, HCMV, HHV6 and HHV7 screening in bone marrow samples from children with acute lymphoblastic leukemia

Morales-Sánchez A^{1,2,3}, Pompa-Mera EN⁴, Fajardo-Gutiérrez A^{1,5} Alvarez-Rodríguez FJ⁵, Bekker-Méndez VC⁵, de Diego Flores-Chapa J⁵, Flores-Lujano J^{1,5}, Jiménez-Hernández E⁵, Peñaloza-González JG⁵, Del Carmen Rodríguez-Zepeda M⁵, Torres-Nava JR⁵, Velázquez-Aviña MM⁵, Amador-Sánchez R⁵, Alvarado-Ibarra M⁵, Reyes-Zepeda N⁵, Espinosa-Elizondo RM⁵, Nuñez-Enriquez JC^{1,5}, Mejía-Aranguré JM^{1,5}, Fuentes-Pananá EM².

1. Unit of Medical Research in Clinical Epidemiology, Pediatric Hospital, National Medical Center XXI Century, Mexican Institute of Social Security; Mexico City, Mexico.
2. Unit of Research in Virology and Cancer, Federico Gomez Children's Hospital of Mexico; Mexico City, Mexico.
3. Medicine Faculty, National Autonomous University of Mexico; Mexico City, Mexico.
4. Unit of Medical Research in Immunology and Infectology, Infectology Hospital, National Medical Center XXI Century, Mexican Institute of Social Security, Mexico City, Mexico.
5. Mexican Inter-institutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukaemia (MIGICCL).

J. M. Mejía-Aranguré and E. M. Fuentes-Pananá contributed equally to this work.

Abstract

Acute Lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in childhood worldwide and Mexico has reported one of the highest incidence rates. An infectious etiology has been suggested and supported by epidemiological evidences, however the identity of the involved agent(s) is not known. We considered that early transmitted lymphotropic herpesviruses were good candidates, since transforming mechanisms have been described for them and some are already associated with human cancers. In this study we interrogated the direct role of EBV, HCMV, HHV6 and HHV7 human herpesviruses in childhood ALL. Viral genomes were screened in 70 bone marrow samples from ALL patients through standard and a more sensitive nested PCR. Positive samples were detected only by nested PCR indicating a low level of infection. Our result argues that viral genomes were not present in all leukemic cells, and hence, infection most likely was not part of the initial genetic lesions leading to ALL. The high statistical power of the study suggested that these agents are not involved in the genesis of ALL in Mexican children. Additional analysis showed that detected infections or co-infections were not associated with prognosis.

Introduction

Acute Lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood cancer worldwide and Mexico has reported one of the highest ALL incidence rates [1, 2]. While new therapies have notably improved ALL outcome in recent years [3], pathogenic events leading to disease development remain largely unknown [4]. An infectious etiology has been suggested by different hypothesis favoring either direct or indirect mechanisms of transformation [5-7]. For infectious agents, direct oncogenic mechanisms refer to expression of viral oncogenes together with deregulation of cellular oncogenes and/or tumor suppressor genes. Indirect mechanisms are mainly triggered by an inflammatory milieu with production of mutagenic molecules or immunosuppression with loss of the cancer immune surveillance mechanisms [8]. The former mode of transformation implies that the infectious agent acts from within the cell and thus, after the cancer clonal expansion it is carried in all tumor cells, as it has been documented for tumor herpesviruses [9, 10]; while indirect acting infectious carcinogenic agents do not infect the cell forming the tumor.

The *Delayed infection* hypothesis by Greaves proposes that exposure to infectious agents very early in life protects from ALL as it modulates maturation of the immune system. However, late exposures lead to an aberrant immune response promoting leukemogenesis by an indirect mechanism [5]. On the opposite side, Smith proposes that oncogenic viruses transmitted during intrauterine life or the first year of life are able to infect immature lymphocytes and promote leukemia through a direct transformation mechanism [7]. Epidemiological, clinical and molecular evidence have been searched to support either direct or indirect mechanisms with variable and even opposite results (reviewed in [11]). We considered that the high incidence of childhood ALL in Mexico City more closely correlated with a developing country high incidence of early infection [1]. In agreement, we recently showed that serious infections requiring hospitalization in the first year of life were associated with increased risk of ALL in children with Down syndrome [12], better supporting the notion that early infections can promote pediatric leukemia as proposed by the Smith's hypothesis.

In this study, we explored the idea that viruses from which oncogenic capacities have been documented may promote leukemogenesis through a direct transforming mechanism. We selected members of the Herpesviridae family, Epstein Barr virus (EBV), human cytomegalovirus (HCMV), human herpesvirus 6 (HHV6A and B) and 7 (HHV7) because they are lymphotropic viruses often transmitted in the first months of life. EBV is a potent transforming agent and has been consistently associated with several human malignancies including pediatric lymphomas [10]. Although, HCMV and HHV6 are not considered carcinogenic, their transforming ability has been shown in *in vitro* studies [13-16]. Additionally, HCMV has been defined as oncomodulator because of its ability to infect tumor cells and alter proliferation, survival, angiogenesis and invasiveness increasing the tumor aggressiveness [17, 18]. HHV6 has previously been associated with several hematological malignancies, including childhood acute leukemia, through serological case-control studies, although with heterogeneous results [19, 20]. An HHV7 transforming role has not been shown; however, there are proposals about its role as cofactor in T-cell and B-cell lymphomas [21, 22].

Moreover, HHV7 may potentiate the pathogenic role of other herpesviruses [23, 24]. We assessed whether EBV, HCMV, HHV6 and HHV7 were involved in the genesis of childhood B-cell and T-cell ALL through a direct transformation mechanism. ALL bone marrow samples were tested by two PCRs with different detection limits. Considering that viruses acting through direct transforming mechanisms behave like driver genetic lesions that are preserved throughout tumor development, we designed a PCR test to equate the number of infected cells with the number of tumor cells and an even more sensitive PCR to detect evidence of infection. We found that less than 20% of the samples were positive by at least one of the viruses tested. Because positive samples showed low infection levels, these data do not support a direct role for EBV, HCMV, HHV6 and HHV7 in the genesis of pediatric ALL from Mexican children. Further analysis of the positives samples showed no association between detected infections or co-infections and prognosis.

Materials and Methods

Ethics statement. This study was approved by the ethical and scientific review boards of the Mexican Institute of Social Security (IMSS): the National Commission of Scientific Research and the Ethics Committee on Research. Prior to sample collection, parents of enrolled patients were informed on the nature of the study and those who were willing to participate signed a letter of consent; children older than 10 years also signed a letter of assent. All patients enrolled were treated according to the ethical guidelines of our institution.

Patients and biological samples. The cases recruited in this study belong to the Mexican Inter-institutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukaemia (MIGICCL; Mexico City, Mexico), a member of the Childhood Leukemia International Consortium (CLIC) since 2012. During the period of the study (January 1, 2010 to August 30, 2012) there were 589 patients enrolled; however, there were sufficient bone marrow sample from only 70 pre-treatment patients (66 from B-cell ALL and 4 from T-cell ALL) to include in the present study (Table 1). Two ml of bone marrow were collected in 0.1 M sodium citrate solution (TEKNOVA, Hollister CA, USA) from the included patients, and mononuclear cells were isolated by a density gradient centrifugation on Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Luis, NO).

Table 1. Demographic and clinic characteristics of the patients N=70

Age at diagnosis (years)	Median (range) 7.6 (0.8-15.7)
Gender	N (%)
Male	33 (47)
Female	37 (53)
Birthplace	N (%)
Mexico City	63 (91)
Other Southern Mexican State	7 (9)
Percentage of blasts in bone marrow	Average (range) 87% (25%-100%)

Immunophenotype *	N (%)
B-cell precursor	66 (94.3)
T-cell	4 (5.7)
FAB classification	N (%)
L1	43 (62)
L2	26 (36)
L3	1 (2)
Genetic rearrangements **	N (%)
ETV6-RUNX1	6 (12)
E2A-PBX1	2 (4)
No rearrangement	42 (84)

* Immunophenotype was determined according to international parameters [25].

** Molecular diagnosis of ETV6-RUNX1, E2A-PBX1, MLL-AF4 and major and minor BCR-ABL genetic rearrangements was performed only in 50 samples. Percentages shown were calculated using 50 as denominator.

Control cell lines and plasmid DNA. For EBV detection, Raji (ATCC, CCL-86) and Ramos (ATCC, CRL-1596) cell lines were used as positive and negative controls, respectively. Both cell lines were cultured in advanced RPMI medium supplemented with 4% of fetal bovine serum and Hepes 1X (all from Gibco, Carlsbad, CA) and maintained at 37°C in 5% of CO₂. Control plasmids were constructed for HCMV, HHV6 and HHV7 detection. Purified HCMV viral genome was kindly provided by Dr. M. Ruiz-Tachiquin (Pediatric Hospital at the CMN SXXI, IMSS, Mexico City, Mexico). HHV6 DNA was obtained from MOLT3 cell line (ATCC CRL-1552) infected with viral particles of HHV6 Z29 strain (ATCC VR-1467). HHV7 DNA was purified from infected lymphocytes kindly provided by Dr. E. Sevilla (National Institute of Respiratory Diseases, Mexico City, Mexico). A fragment of HCMV UL83, HHV6 U94 and HHV7 U42 genes were PCR amplified using primers described in Table 2 (standard PCR) and cloned into T-easy pGEM plasmid (Promega, Madison, WI) according to manufacturer's instructions. The identity of cloned products was confirmed by sequencing.

DNA purification. DNA was purified from bone marrow mononuclear cells or control cell lines using QIAamp DNA extraction kits (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Plasmid DNA was purified using PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instruction. Purified DNA was quantified using a spectrophotometer NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The DNA quality and integrity were evaluated through electrophoretic landslide, optical density (260/280 ratio) and amplification of β -actin endogenous gene (genomic DNA).

Standard and nested PCRs. Standard and nested PCR mix contained 1x Taq Polymerase buffer, 1.5 to 2.5 mM MgCl₂ (MgCl₂ concentration was optimized for every PCR), 200 μ M deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 2.5 U of Taq Polymerase (all from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and 200 nM of each primer (IDT Technologies). For standard PCR, 100 ng of DNA from samples or control cell lines or 5.5X10⁻⁵ ng from control plasmid (equivalent to the number of moles contained in 100 ng of genomic DNA) were used.

Plasmids were linearized with restriction enzyme NdeI (New England BioLabs) before use and mixed with DNA from Daudi cell line in order to run the amplification reaction under identical mass/volume DNA concentration for both samples and controls. For the nested PCR, 0.5 or 0.05 μ l (1:100 or 1:1000 dilution respectively) of product of first round PCR were used as template. All PCR reactions were carried out in a final volume of 50 μ l. All primer sequences and cycling conditions used are detailed in Table 2. PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.8% agarose gels stained with ethidium bromide and photographed under ultraviolet light using the Quantum ST4 System (VilberLourmat, Torcy, Marne-la-Vallée, FR). The viral identity of PCR amplified fragments was confirmed by sequencing.

Table 2. PCR cycling conditions and primers sequences

Virus/ Endogenous gene	Type of PCR	Cycling conditions *	Primers sequences (5'→3')
EBV	Standard	95°C/40 sec, 57°C/1 min, 72°C/1.5 min (30X)	F CCATGTAAGCTTGCCCTCGAG R GCCTTAGATCTGGCTCTTTG [26]
EBV	Nested	95°C/20 sec, 57°C/30 sec, 72°C/45 sec (15X)	F CTTTGTCCAGATGTCAGGGG R GCCTGAGCTCTACTTTTGG **
CMV	Standard	95°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/1 min (35X)	F AAGATGCGGTAGATGTCGTT R CTGCGCTCTTCTTTTCGAT **
CMV	Nested	95°C/45 sec, 55°C/45 sec, 72°C/45 sec (15X)	F TTCTGACCCTGAACCGTAG R CGACGAAGAACTCGTAACC **
HHV6 ***	Standard	95°C/1 min, 50°C/1 min, 72°C/1 min (30X)	F GTGCGCTATAAAATCGATAGC R TGATTCCGTTGTGTGTTTTCC **
HHV6 ***	Nested	95°C/30 sec, 56°C/30 sec, 72°C/30 sec (15X)	F GTCTTTCGTATCCACGCG R CGTTCCCGTCGAAGAAATC **
HHV7	Standard	95°C/45 sec, 53°C/45 sec, 72°C/45 sec (30X)	F TTTTACATTTGGCTTGCTTTTTG R ATATTCTGTACCTATCTCCCAA [27]
HHV7	Nested	95°C/30 sec, 55°C/30 sec, 72°C/30 sec (15X)	F GAACGTTTGCTTAGATTGC R GCAGACCAAATCCACAAATTC **
β -actin	Standard	95°C/1 min, 60°C/1 min, 72°C/1.5 min (30X)	F CCTAAGGCCAACCGTGAAAAG R TCTTCATGGTGCTAGGAGCCA [28]

*All amplification runs included an initial denaturation step at 95°C for 5 minutes and a final extension step at 72°C for 10 minutes.

Annealing temperatures were optimized for every reaction.

** These primers were designed in our laboratory using the Primer-BLAST program [29].

*** HHV6 primers recognize both HHV6A and HHV6B subtypes.

Nucleotide sequencing. The cloned viral gene fragments and PCR amplified fragments were excised from 1% agarose gels and purified using QIAquick gel extraction kit (Qiagen Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Direct automated sequencing of both forward and reverse strands was carried out using the BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). About 20 ng of template DNA were added for each reaction; the program included 25 cycles as described: denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 50°C for 15 sec and extension at 60°C for 4 min. Samples were analyzed in an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The obtained sequences were

examined using the Nucleotide BLAST program [29].

Statistical analysis. The statistical power of the study was calculated considering the sample size ($N=70$) and the probability to detect viral genomes supporting direct transforming mechanisms in at least one patient. The hypothetical frequencies of infection were 10% and 5%. The statistical package used for this analysis was Epi Info version 7.1.240 (Centers for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov/epiinfo/>). Odds ratios with 95% confidence intervals were calculated to identify if the detected infections were associated with high-risk leukemia, relapse or death. Mann Whitney U test was used to compare age in months and leukocyte count with infection. The statistical package used for these analyses was Epidat version 3.0.

Results

Study population. The study included 70 pretreatment children diagnosed with ALL, 66 were B-cell ALL and 4 were T-cell ALL. The diagnosis of ALL fulfilled the morphological and phenotypic criteria, including that at least 25% of the cells from the bone marrow sample were leukemic blasts. Demographic and clinic characteristics of the patients were extracted from medical records and are presented in Table 1.

PCRs limit of detection. To know the limit of detection of the standard PCRs, we first carried out amplification reactions using serial dilutions of DNA from control cell lines and plasmids (Fig. 1). For EBV detection, we employed Raji cell line, which derives from an EBV-associated lymphoma and carries about 50 viral episomes per cell [30]. The amplification target was the BamHI W fragment, which is eleven times repeated in the EBV genome. The lower limit of detection of our reaction was of 7.5×10^3 viral genomes (fig. 1a). We decided to use 9.5×10^3 cells from bone marrow samples for EBV detection because we speculated that ALL samples might have similar frequencies of EBV episomes than those found in EBV-associated lymphomas. Still, if the number of viral genomes in leukemic cells were as low as the minimum reported for an EBV-associated cancer, namely 7 viral genomes per cell in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma [31], our test would be able to detect positive samples in as low as 25% of blasts (fig 1a). For HCMV, HHV6 and HHV7 detection, we used plasmid DNA as control (see material and methods section). The limit of detection was about 0.97×10^3 plasmid copies for every reaction (fig. 1b, c and d). As we did not know the number of HCMV, HHV6 and HHV7 genomes that could be present in each leukemic blast, DNA from control plasmid and samples were used at equal molar concentration. We determined that using 15.5×10^3 cells from samples (and 15.5×10^3 plasmid copies mixed with DNA from 15.5×10^3 negative cells as control) would be sufficient to detect up to one viral genome per cell even in samples with only 25% of leukemic blasts (fig. 1b, c and d). We have previously used these PCRs in which the frequency of infected cells matches the frequency of cancer cells to address direct viral oncogenesis [32-34].

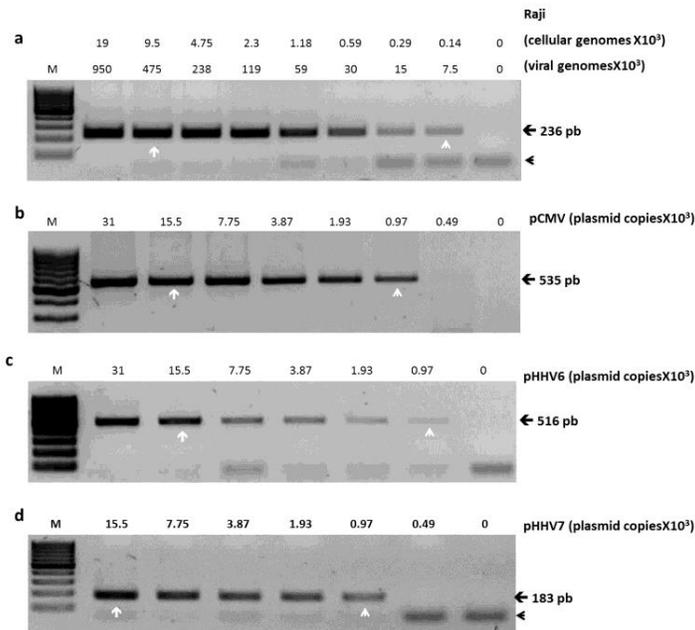


Figure 1. The PCRs limit of detection. Serial dilutions of DNA from control cell line and plasmid were PCR amplified in order to know the lower limit of detection of our screening test. For EBV (a), the limit of detection is expressed in number of cellular and viral genomes (from Raji cell line). For HCMV (b), HHV6 (c) and HHV7 (d) the limits of detection are expressed as plasmid copies. Lower limits of detection are indicated with a white arrowhead. White arrows point to the number of cells or plasmid copies that were used for viral detection in ALL samples. The sizes of PCR products are indicated. Black arrowheads point to residual primers.

Viral screening. Once the limit of detection was established for every reaction, we screened the presence of viral genomes in the samples. We do not observe any positive sample for any herpesvirus tested by the first round PCR (Figs. 2a, 3a, 4a and 5a). EBV, HCMV and HHV6 positive samples were only detected through nested PCR in the following frequencies: 14%, 19%, and 9%, respectively, while HHV7 was not detected by this method (Figs. 2b, 3b, 4b and 5b). Considering that direct carcinogenic viruses contribute to oncogenesis acting like driver genetic lesions, we would consider that if viral infection had a role in the transformation of the cell subjected to oncogenic clonal expansion, the progeny of that cell should all carry the viral genome. In that scenario, the viral genome should have been detected by the first PCR in agreement with the previously established limit of detection. All samples showed high DNA integrity (not shown) and the amplification of *β-actin* endogenous gene was positive (Figs. 2c, 3c, 4c and 5c).

The statistical power of the findings in relation to their ability to detect one or more positive subjects from our study population (N =70) from hypothetical 10% and 5% frequencies of infection had a confidence of 99.99% and 95.00%, respectively. Thus, our results indicate that EBV, HCMV, HHV6 and HHV7 are not involved in the genesis of childhood ALL in Mexican children.

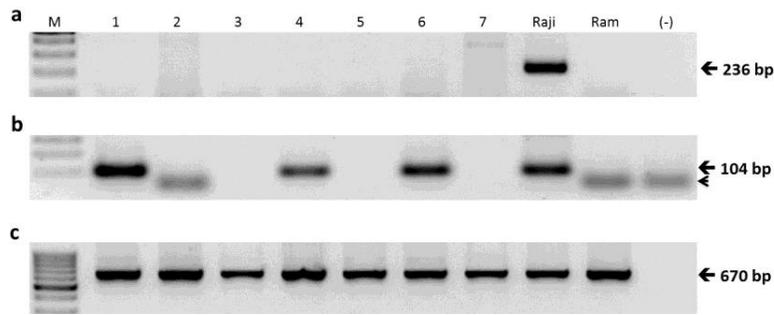


Figure 2. EBV screening. Image of seven representative samples showing that all of them were EBV negative by first round PCR (a) and positivity was only detected by nested PCR in 10 (14%; showing three) samples (b). Raji and Ramos (Ram) cell lines were used as positive and negative controls, respectively. A reaction without DNA was routinely run (-). c. Amplification of β -actin endogenous gene. The sizes of PCR products are indicated. The black arrowhead points to residual primers.

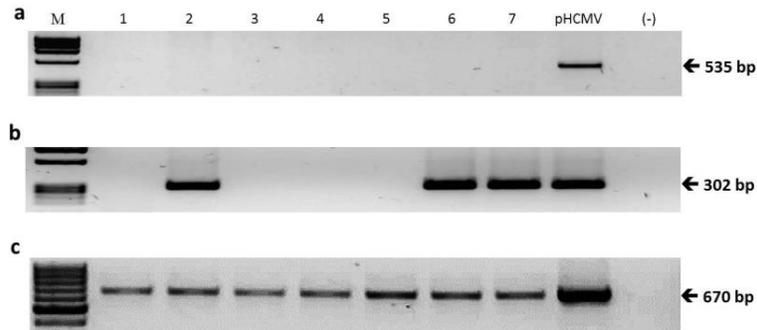


Figure 3. HCMV screening. Image of seven representative samples showing that all of them were HCMV negative by first round PCR (a) and positivity was only detected by nested PCR in 13 (19%, showing three) samples (b). Plasmid DNA was used as positive control (pHCMV). A reaction without DNA was routinely run (-). c. Amplification of β -actin endogenous gene. The sizes of PCR products are indicated.

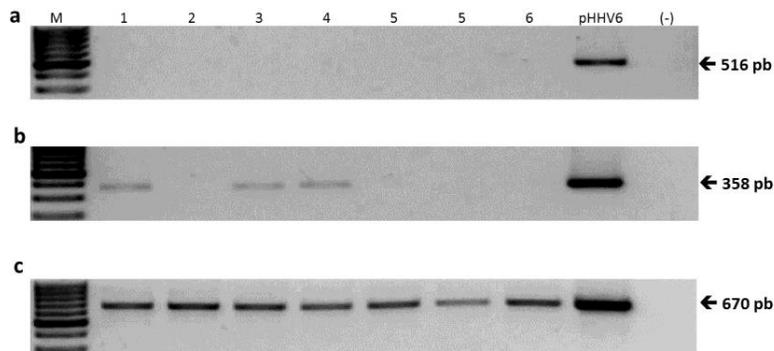


Figure 4. HHV6 screening. Image of seven representative samples showing that all of them were HHV6 negative by first round PCR (a) and positivity was only detected by nested PCR in 6 (9%, showing three) samples (b). Plasmid DNA was used as positive control (pHHV6). A reaction without DNA was routinely run (-). c. Amplification of β -actin endogenous gene. The sizes of PCR products are indicated.

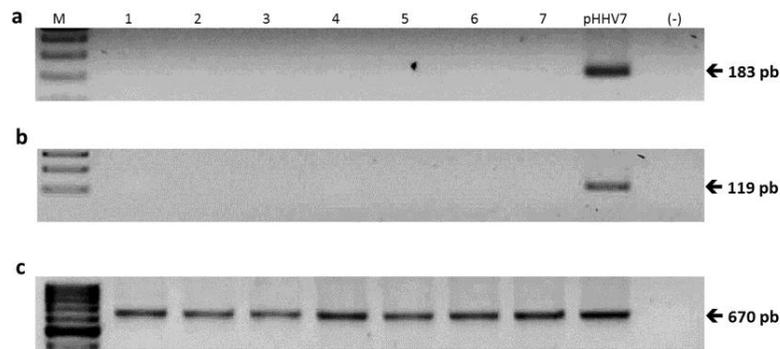


Figure 5. HHV7 screening. Image of seven representative samples showing that all of them were HHV7 negative by both first round PCR (a) and nested PCR (b). Plasmid DNA was used as positive control (pHHV7). A reaction without DNA was routinely run (-). c. Amplification of *β-actin* endogenous gene. The sizes of PCR products are indicated.

Analysis of infection and prognosis. A possible role of the detected infections in prognosis was explored. Considering a previously documented probable interaction between the herpesviruses tested [35-39] we calculated the association between every infection or co-infection and the risk for high-risk leukemia, relapse or death (Table 3). Co-infections included only double-infections: EBV+/HCMV+, EBV+/HHV6+ and HCMV+/HHV6+; triple infections were not detected. We did not find any significant association with this analysis (Table 3). We also compared the age (in months) at the moment of diagnosis and the leukocyte count between infected and non-infected children finding no significant differences (not shown). These results argued against a possible indirect role of these infections in the onset and the course of disease.

Table 3. Infection and prognostic factors

Virus N (%)	EBV+ 10 (14%)	HCMV+ 13 (19%)	HHV6+ 6 (9%)	Any co-infection 6 (9%)
High-risk leukemia				
OR (95% IC)	0.43 (0.12-1.57)	0.72 (0.22-2.32)	2.29 (0.4-15.32)	1.12 (0.24-5.2)
p	0.29	0.75	0.4	1
Relapse				
OR (95% IC)	1.19 (0.27-5.36)	0.88 (0.20-3.82)	1.10 (0-15-6.63)	0.81 (0.12-4.67)
p	1	1	1	1
Death				
OR (95% IC)	0.17 (0.02)	0.16 (0.02-1.08)	0.04 (0.04-2.81)	0.37 (0.05-2.03)
p	0.89	0.08	0.65	0.41

OR: odds ratio; CI: confidence interval. $p < 0.05$ was considered significant.

Discussion

Epidemiological data suggest the involvement of infections in the etiology of childhood ALL; however, the identity of the potentially implicated agent(s) has not been identified. Based on the original Smith's proposal about a direct causative role of viral agents in ALL development [7], we screened the presence of EBV, HCMV, HHV6 and HHV7 viral genomes in B-cell and T-cell ALL samples by a standard PCR aiming to match the number of infected cells with the number of leukemic blasts, founding no evidence of the

participation of these viruses in the leukemogenesis process. Positive samples were detected only through a more sensitive nested PCR, most likely reflecting normal levels of infection according to the age of the tested population. Positivity only by nested PCR does not support a relationship between infection and leukemogenesis. Still, the nested PCR was implemented as an additional control to globally validate our detection system. Based on the knowledge that the herpesviruses under study are ubiquitously acquired early in life and maintain a reservoir population in bone marrow, we expected to obtain positive samples by a sensitive detection, reflecting the common infection occurring in the pediatric population.

Previous studies looked for the presence of DNA viruses in bone marrow or peripheral blood from childhood ALL samples, namely JVC, BKV and SV40 polyomaviruses [40, 41]; TT anellovirus [42] and EBV, HHV-6, -7 and -8 herpesviruses [43]. Nevertheless all of them have failed to find evidence of their participation in the disease. Although, there is a previous work analyzing the participation of herpesviruses in leukemogenesis with similar negative results, based in the epidemiological differences between our country and developed countries related to the increased prevalence of infections and childhood leukemias in Mexico [1], we hypothesized that a mechanism of direct leukemogenesis could explain some cases of leukemia in our population. An advantage of our work over previous studies is the number of samples analyzed, N=70 in our study vs N=15-47 in others; which conferred it a higher statistical power. Also, other works screened the presence of viral genomes of EBV and HHV6 herpesviruses [44], JVC and BKV polyomaviruses [45] and parvovirus B19 [46] in archived neonatal blood spots collected at birth from children who developed leukemia, however these works lost the window of infections happening from birth to the presentation of the disease. Additionally, this is the first work reporting no association between HCMV and childhood ALL. We have also previously reported that human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV1) and mouse mammary tumor virus (MMTV)-like virus (MMTV-LV) were not involved in the genesis of childhood ALL [33].

Indirect mechanisms of leukemogenesis are also possible but addressing those mechanisms were beyond the aim of this study. Still, we did not find any evident association between nested PCR positive patients and clinical data. Previous studies have supported a role for EBV in genetic instability and EBV-associated Burkitt's lymphoma is characterized by a *Myc* genetic translocation [47-49]. However, the low number of patients with genetic translocations in our study (N=8) precluded an analysis of EBV infection and ALL-associated genetic translocations with significant statistical power. It is proposed that herpesviruses often act in concert potentiating their pathological effects in cases of chronic fatigue syndrome, infectious mononucleosis and/or post-transplant disease [35-39]. Although, we have a sizable number of infection positive patients, most of them are single infected with only 6 (9%) showing evidence of infection by more than one herpesvirus (see Table 3). Therefore, we do not have any evidence of a possible interaction by the tested viruses.

It is possible that the lymphoproliferation that characterizes ALL results from continuous immune stimulation triggered by repetitive infections. However, almost any infectious agent would be responsible for this effect and only tumor viruses with documented or possible direct transforming properties were tested here. There

exist some examples of chronic antigenic stimulation leading to lymphomas, for instance, MALT lymphoma after *Helicobacter pylori* persistent infection and hepatitis C virus associated lymphoma [50-53]. Since those are adult neoplasias arising after decades of antigenic stimulation it is unlikely that pediatric ALL could result from a similar mechanism and arise as the immune system responds to a single infection. In any case, it is more likely that multiple antigenic challenges combined with maturing lymphocytes with a genetic lesion, e.g. an intrauterine translocation, were involved in the genesis of ALL. In lymphomas of mature cells the identity of the target of the antigen receptor (VDJ recombination clone) gives light to the origin of the lymphoproliferation. Since ALL occurs in progenitor cells in which more often the leukemic blasts have not completed the rearrangements of the antigen receptor, this is a scenario more difficult to corroborate.

An important limitation of all studies searching for infectious agents in pediatric ALL is that all have been performed individually testing samples through standard techniques of molecular biology (PCR and/or Southern blot). Such strategies are restricted to agents whose genomic sequences have been at least partially described. Future investigations should use next-generation sequencing technologies and bioinformatic analysis more able to detect the full spectrum of viruses including those still not described, as it has been recently shown for Merkel cell polyomavirus [54]. Besides tumor viruses, indirect mechanisms of leukemogenesis also need to be addressed in order to better understand the role that a history of infection has in the development of pediatric ALL.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was funded by the National Council of Science and Technology (CONACyT), Grants 2010-1-141026, CB-2007-1-83949 and 2007-1-18-71223; by the Mexican Institute of Social Security (Mexico City, Mexico), Grant FIS/IMSS/PROT/G10/846 (to J.M. Mejia-Aranguré) and by Fondo de Apoyo a la Investigación HIMFG (to E.M. Fuentes-Pananá). This work constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program of Doctor Degree in Biomedical Sciences, Medicine Faculty, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico. A. Morales-Sánchez acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT), National Autonomous University of Mexico and Mexican Institute of the Social Security (IMSS).

References

1. Perez-Saldivar, M.L., et al., *Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 355.
2. Curado, M.P., et al., *Cancer incidence in five continents IARC Scientific Publications*. 2007, The International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, France.
3. Pui, C.H., et al., *Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update*. J Clin Oncol, 2011. **29**(5): p. 551-65.
4. Pui, C.H., L.L. Robison, and A.T. Look, *Acute lymphoblastic leukaemia*. Lancet, 2008. **371**(9617): p. 1030-43.

5. Greaves, M., *Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(3): p. 193-203.
6. Kinlen, L., *Childhood leukaemia, nuclear sites, and population mixing*. Br J Cancer, 2011. **104**(1): p. 12-8.
7. Smith, M., *Considerations on a possible viral etiology for B-precursor acute lymphoblastic leukemia of childhood*. J Immunother, 1997. **20**(2): p. 89-100.
8. Moore, P.S. and Y. Chang, *Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(12): p. 878-89.
9. Wen, K.W. and B. Damania, *Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis*. Cancer Lett, 2010. **289**(2): p. 140-50.
10. Young, L.S. and P.G. Murray, *Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours*. Oncogene, 2003. **22**(33): p. 5108-21.
11. Morales-Sánchez, A. and E.M. Fuentes-Panana, *Infectious etiology of childhood acute lymphoblastic leukemia, hypotheses and evidence*, in *Clinical epidemiology of acute lymphoblastic leukemia—from the molecules to the clinic*, J.M. Mejia-Arangure, Editor. 2013, Intech: Rijeta, Croatia. p. 19-39.
12. Flores-Lujano, J., et al., *Breastfeeding and early infection in the aetiology of childhood leukaemia in Down syndrome*. Br J Cancer, 2009. **101**(5): p. 860-4.
13. Razzaque, A., *Oncogenic potential of human herpesvirus-6 DNA*. Oncogene, 1990. **5**(9): p. 1365-70.
14. Razzaque, A., et al., *Neoplastic transformation of immortalized human epidermal keratinocytes by two HHV-6 DNA clones*. Virology, 1993. **195**(1): p. 113-20.
15. Geder, K.M., et al., *Oncogenic transformation of human embryo lung cells by human cytomegalovirus*. Science, 1976. **192**(4244): p. 1134-7.
16. Geder, L., J. Kreider, and F. Rapp, *Human cells transformed in vitro by human cytomegalovirus: tumorigenicity in athymic nude mice*. J Natl Cancer Inst, 1977. **58**(4): p. 1003-9.
17. Barami, K., *Oncomodulatory mechanisms of human cytomegalovirus in gliomas*. J Clin Neurosci, 2010. **17**(7): p. 819-23.
18. 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.
19. Salonen, M.J., et al., *Antibody status to HHV-6 in children with leukaemia*. Leukemia, 2002. **16**(4): p. 716-9.
20. Levine, P.H., et al., *Antibodies to human herpes virus-6 in patients with acute lymphocytic leukemia*. Leukemia, 1992. **6**(11): p. 1229-31.
21. Nagore, E., et al., *Detection of Epstein-Barr virus and human herpesvirus 7 and 8 genomes in primary cutaneous T- and B-cell lymphomas*. Br J Dermatol, 2000. **143**(2): p. 320-3.
22. 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.
23. Chapenko, S., et al., *Co-infection of two beta-herpesviruses (CMV and HHV-7) as an increased risk factor for 'CMV disease' in patients undergoing renal transplantation*. Clin Transplant, 2000. **14**(5): p. 486-92.
24. Osman, H.K., et al., *"Cytomegalovirus disease" in renal allograft recipients: is human herpesvirus 7 a co-factor for disease progression?* J Med Virol, 1996. **48**(4): p. 295-301.
25. Bernaldez-Rios, R., et al., *The age incidence of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Mexico City*. J Pediatr Hematol Oncol, 2008. **30**(3): p. 199-203.

26. Labrecque, L.G., et al., *Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study*. *Cancer Res*, 1995. **55**(1): p. 39-45.
27. Kidd, I.M., et al., *Measurement of human herpesvirus 7 load in peripheral blood and saliva of healthy subjects by quantitative polymerase chain reaction*. *J Infect Dis*, 1996. **174**(2): p. 396-401.
28. Fuentes-Panana, E.M., et al., *Basal Igalpha/Igbeta signals trigger the coordinated initiation of pre-B cell antigen receptor-dependent processes*. *J Immunol*, 2004. **173**(2): p. 1000-11.
29. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. *J Mol Biol*, 1990. **215**(3): p. 403-10.
30. Adams, A., *Replication of latent Epstein-Barr virus genomes in Raji cells*. *J Virol*, 1987. **61**(5): p. 1743-6.
31. Liu, P., et al., *Direct sequencing and characterization of a clinical isolate of Epstein-Barr virus from nasopharyngeal carcinoma tissue by using next-generation sequencing technology*. *J Virol*, 2011. **85**(21): p. 11291-9.
32. Martinez-Lopez, J.L., et al., *Evidence of Epstein-Barr virus association with gastric cancer and non-atrophic gastritis*. *Viruses*, 2014. **6**(1): p. 301-18.
33. Morales-Sanchez, A., et al., *Lack of evidence for human T-lymphotropic virus type 1 and mouse mammary tumor-like virus involvement in the genesis of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013. **22**(11): p. 2130-3.
34. Morales-Sanchez, A., et al., *No association between Epstein-Barr Virus and Mouse Mammary Tumor Virus with breast cancer in Mexican women*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 2970.
35. Chapenko, S., et al., *Association of active human herpesvirus-6, -7 and parvovirus b19 infection with clinical outcomes in patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome*. *Adv Virol*, 2012. **2012**: p. 205085.
36. Wang, X., et al., *Coinfection with EBV/CMV and other respiratory agents in children with suspected infectious mononucleosis*. *Virol J*, 2010. **7**: p. 247.
37. *Other herpesviruses: HHV-6, HHV-7, HHV-8, HSV-1 and -2, VZV*. *Am J Transplant*, 2004. **4 Suppl 10**: p. 66-71.
38. 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.
39. Ratnamohan, V.M., et al., *Cytomegalovirus and human herpesvirus 6 both cause viral disease after renal transplantation*. *Transplantation*, 1998. **66**(7): p. 877-82.
40. MacKenzie, J., et al., *JC and BK virus sequences are not detectable in leukaemic samples from children with common acute lymphoblastic leukaemia*. *Br J Cancer*, 1999. **81**(5): p. 898-9.
41. Smith, M.A., et al., *Investigation of leukemia cells from children with common acute lymphoblastic leukemia for genomic sequences of the primate polyomaviruses JC virus, BK virus, and simian virus 40*. *Med Pediatr Oncol*, 1999. **33**(5): p. 441-3.
42. Shiramizu, B., et al., *Investigation of TT virus in the etiology of pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Hematol Oncol*, 2002. **19**(8): p. 543-51.
43. MacKenzie, J., et al., *Screening for herpesvirus genomes in common acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2001. **15**(3): p. 415-21.
44. Bogdanovic, G., et al., *Human herpes virus 6 or Epstein-Barr virus were not detected in Guthrie cards from children who later developed leukaemia*. *Br J Cancer*, 2004. **91**(5): p. 913-5.
45. Priftakis, P., et al., *Human polyomavirus DNA is not detected in Guthrie cards (dried blood spots) from children who developed acute lymphoblastic leukemia*. *Med Pediatr Oncol*, 2003. **40**(4): p. 219-23.

46. Isa, A., et al., *Human parvovirus B19 DNA is not detected in Guthrie cards from children who have developed acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2004. **42**(4): p. 357-60.
47. Kim, J.H., W.S. Kim, and C. Park, *Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 increases genomic instability through Egr-1-mediated up-regulation of activation-induced cytidine deaminase in B-cell lymphoma*. *Leuk Lymphoma*, 2013. **54**(9): p. 2035-40.
48. Kamranvar, S.A., et al., *Epstein-Barr virus promotes genomic instability in Burkitt's lymphoma*. *Oncogene*, 2007. **26**(35): p. 5115-23.
49. Bornkamm, G.W., *Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(8): p. 1745-55.
50. Isaacson, P.G. and M.Q. Du, *MALT lymphoma: from morphology to molecules*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(8): p. 644-53.
51. Rosa, D., et al., *Activation of naive B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(51): p. 18544-9.
52. Sagaert, X., et al., *Gastric MALT lymphoma: a model of chronic inflammation-induced tumor development*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010. **7**(6): p. 336-46.
53. Viswanatha, D.S. and A. Dogan, *Hepatitis C virus and lymphoma*. *J Clin Pathol*, 2007. **60**(12): p. 1378-83.
54. Feng, H., et al., *Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma*. *Science*, 2008. **319**(5866): p. 1096-100.