



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**POSIBLE PARTICIPACIÓN DE LOS HERPESVIRUS
 β Y γ EN LA HEPATITIS CRÓNICA PEDIÁTRICA
CON CARACTERÍSTICAS DE AUTOINMUNIDAD**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:
RAUL JONATHAN SOL ORTEGA**

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA ISABEL TUSSIÉ LUNA**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. A DICIEMBRE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Índice

AGRADECIMIENTOS:.....	2
ÍNDICE DE ABREVIATURAS:.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS:.....	4
ÍNDICE DE TABLAS:.....	5
RESUMEN:.....	6
ANTECEDENTES:.....	7
VIRUS.....	7
CLASIFICACIÓN.....	9
CARACTERÍSTICAS.....	10
BETAHERPESVIRIDAE.....	13
<i>HCMV o Citomegalovirus Humano</i>	13
<i>HHV6 o Herpesvirus Humano 6</i>	14
<i>HHV 7 o Herpesvirus Humano 7</i>	14
GAMAHERPESVIRUS.....	15
<i>EBV o Virus de Epstein-Barr</i>	15
<i>KSV o Virus de Sarcoma de Kaposi</i>	18
EL HÍGADO.....	19
Funciones.....	20
Hepatitis.....	21
Hepatitis autoinmune (HAI).....	22
HERPESVIRUS EN HEPATITIS.....	25
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:.....	30
HIPÓTESIS DEL TRABAJO:.....	30
OBJETIVOS:.....	30
GENERAL:.....	30
PARTICULARES:.....	30
DISEÑO DEL ESTUDIO:.....	31
POBLACIÓN DE ESTUDIO:.....	31
PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.....	32
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	33
OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS.....	33
EXTRACCIÓN DE DNA/RNA.....	33
qPCR MULTIPLEX.....	34
ELISA.....	36
RESULTADOS:.....	37
OBJETIVO PARTICULAR 1:.....	38
OBJETIVO PARTICULAR 2:.....	45
OBJETIVO PARTICULAR 3:.....	48
<i>Correlación entre daño hepático y CV de EBV en plasma</i>	48
<i>Correlación entre daño hepático y serología anti-EBV</i>	50
<i>Correlación entre la serología anti-EBV y el título de los ANAs</i>	52
DISCUSIÓN:.....	55
CONCLUSIONES:.....	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	64
BIBLIOGRAFÍA:.....	77
APÉNDICE:.....	78
PCR CUANTITATIVA MÚLTIPLEX.....	78
ALT Y AST, COMO MARCADORES DE DAÑO HEPÁTICO.....	79
CARTAS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO, ASENTAMIENTO INFORMADO Y REVOCACIÓN.....	79

Agradecimientos:

Este trabajo fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Proyectos IA208417 e IA210720 y, por Fondos Federales de Apoyo a la Investigación, Hospital Infantil de México Federico Gómez (Proyectos HIM-2016-080 y HIM-2017-139). Se recibió una beca de Licenciatura como parte del proyecto CONACyT-CB-2012-CO1-176880.

Índice de abreviaturas:

HAI/AIH	Hepatitis autoinmune/Autoimmune hepatitis
HCI/ICH	Hepatitis crónica idiopática/Idiopathic chronic hepatitis
HCD/CHD	Hepatitis crónica de causa definida/Chronic hepatitis of defined cause
VEB/EBV	Virus de Epstein-Barr/Epstein Barr Virus
CMVH/HCMV	Citomegalovirus Humano/Human Citomegalovirus
HHV6/HHV6	Herpesvirus Humano 6/Human Herpesvirus 6
HHV7/HHV7	Herpesvirus Humano 7/Human Herpesvirus 7
VSK/KSV	Virus de Sarcoma de Kaposi/Kaposi Sarcoma Virus
PCRC/qPCR	PCR cuantitativo/quantitative PCR
RCP/PCR	Reacción en cadena de la polimerasa/Polimerase Chain Reaction
LH/HL	Linfoma de Hodgkin/Hodgkin Lymphoma
LB/BL	Linfoma de Burkkit/Burkkit Lymphoma
SK/KS	Sarcoma de Kaposi/Kaposi Sarcoma
CG/GC	Cáncer Gástrico/Gastric Cancer
VIH/HIV	Virus de inmunodeficiencia Humano/Human Immunodeficiency Virus
SIDA/AIDS	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida/Acquired Immunodeficiency Syndrome
MI/IM	Mononucleosis Infecciosa/Infectious Mononucleosis
CAVEB/CAEBV	Infección Crónica Activa por Virus de Epstein-Barr/Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection
LHH/HLH	Linfocitosis Hemofagocítica/Hemophagocytic Lymphohistiocytosis
PR/PR	Pitiriasis Rosada/Pitiriasis Roseae
RI/RI	Roseola Infantil/Roseola Infantum
EICH/GVHD	Enfermedad Injerto contra Huésped/Graft vs Host Disease
ICCMV/CCMVI	Infección crónica por Citomegalovirus/Chronic Citomegalovirus Infection
SS/SS	Síndrome de Sjögren/Sjörgen Syndrome
DT1/T1D	Diabetes tipo 1/Type 1 Diabetes
LES/SLE	Lupus Eritematoso Sistémico/Systemic Lupus Erythematosus
EC/CD	Enfermedad de Castleman/Castleman Disease
LEP/PEL	Linfoma de Efusión Primario/Primary Efusion Lymphoma
SCIK/KICS	Síndrome de Citocinas Inflamatorias de KSV/KSV Inflammatory Cytokine Syndrome
IARC	International Agency for Research on Cancer
PMADs/DAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Daño/Damage Associated Molecular Patterns
APs/PsA	Artritis psoriática/Psoriatic Arthritis
OA/OA	Osteoartritis/Osteoarthritis
ANAs	Anticuerpos anti-nucleares/Anti-nuclear antibodies
Hc1/Lc1	Anticuerpos anti-hígado citosol 1/Anti-liver Cytosol 1 Antibodies
VHA/HAV	Virus de la hepatitis A/Hepatitis A virus
VHB/HBV	Virus de la hepatitis B/Hepatitis B virus
VHC/HBC	Virus de la hepatitis C/Hepatitis C virus
VHD/HBD	Virus de la hepatitis D/Hepatitis D virus

Índice de Figuras:

Ilustración 1: Comparación morfológica entre virus de importancia clínica	8
Ilustración 2: Árbol Taxonómico de los Herpesvirus que infectan al humano.....	9
Ilustración 3: Estructura del virión compartida por los Herpesvirus.	10
Ilustración 4: Secuencia y función de los genes líticos de EBV	12
Ilustración 5: Célula epitelial de bronquio infectada por HCMV.....	13
Ilustración 6: Latencias canónicas de EBV y las neoplasias asociadas a cada una	16
Ilustración 7: Estructuras básicas del hígado a diferentes niveles.....	19
Ilustración 8: Funciones más importantes del hígado sano.....	20
Ilustración 9: Frecuencia de Pacientes positivos a EBV	39
Ilustración 10: Media de Copias Virales de EBV	40
Ilustración 11: Frecuencia de Pacientes positivos a HHV6	42
Ilustración 12: Media de Copias Virales de HHV6	42
Ilustración 13: Frecuencia de Pacientes positivos a HHV7.	44
Ilustración 14: Media de Copias Virales de HHV7	44
Ilustración 15: Frecuencia de muestras positivas por diagnóstico.....	46
Ilustración 16: Concentración de cada anticuerpo detectado por diagnóstico.....	46
Ilustración 17: Correlación entre CV en plasma y ALT en HAI.....	49
Ilustración 18: Correlación entre CV en plasma y AST en HAI.....	49
Ilustración 19: Correlación entre unidades/ml de anti-VCAG y ALT en HAI.....	51
Ilustración 20: Correlación entre unidades/ml de anti-EA y ALT en HAI	51
Ilustración 21: Correlación entre unidades de anti-VCAG y ANAs en HAI.....	53
Ilustración 22: Correlación entre unidades de anti-EBNA-1 y ANAs en HAI.....	53
Ilustración 23: Correlación entre unidades de anti-EBNA-1 y ANAs en HCI.....	54
Ilustración 24: PCR cuantitativa múltiplex.....	78

Índice de Tablas:

Tabla 1: Resumen de etiologías y agentes causales de las hepatitis.	22
Tabla 2: Criterios simplificados para el diagnóstico de HAI	24
Tabla 3: Resumen de los pacientes en seguimiento por diagnóstico.	32
Tabla 4: Diagnósticos del grupo de hepatitis de causa definida	32
Tabla 4: Secuencias de los primers y sondas utilizados.....	35
Tabla 5: Condiciones utilizadas para la qPCR múltiplex	35
Tabla 6: Concentraciones y cantidades de cada reactivo para la qPCR múltiplex	36
Tabla 7: Resumen de cargas virales para EBV en los cuatro grupos de estudio.	39
Tabla 8: Resumen de cargas virales para HHV6 en los cuatro grupos de estudio.....	41
Tabla 9: Resumen de cargas virales para HHV7 en los cuatro grupos de estudio.....	43
Tabla 11: Resumen de los resultados obtenidos para anticuerpos contra EBV.....	47
Tabla 12: Resumen de coeficientes de correlación de Spearman entre CV de EBV en plasma y ALT/AST.	48
Tabla 13: Resumen de coeficientes de correlación de Spearman entre los anticuerpos anti-EBV en plasma y ALT/AST.	50
Tabla 14: Resumen de coeficientes de correlación de Spearman entre los anticuerpos anti-EBV en plasma y los anticuerpos antinucleares (ANAs).	52

Resumen:

Los herpesvirus son patógenos ubicuos cuya infección regularmente es asintomática, sin embargo, el origen y progresión de un creciente número de enfermedades autoinmunes ha sido asociado con un control inapropiado de estos virus en individuos inmunocompetentes. La hepatitis autoinmune (HAI) es una enfermedad crónica, diagnosticada 4/5 veces antes de los 18 años, cuya etiología aún se desconoce. En este trabajo se cuantificó la carga viral del virus de Epstein Barr (EBV), el citomegalovirus humano (HCMV), el herpesvirus humano 6 (HHV6) y el herpesvirus humano 7 (HHV7), junto con la serología anti-EBV en una cohorte de 44 pacientes pediátricos reclutados en el Departamento de Gastroenterología del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Se encontró que los pacientes con HAI o con HCI presentan cargas virales para EBV con mayor frecuencia (50-52%, respectivamente) y de mayor magnitud en plasma (media de 22,018 y 12,107 copias/mL de plasma, respectivamente) que, en leucocitos o tejido hepático, y esto contrasta, con la nula detección de EBV en plasma o leucocitos de pacientes sin hepatitis. Por otro lado, se encontró una mayor cantidad de anticuerpos IgG anti-antígeno de cápside viral (VCAG) de EBV (116 U/mL de plasma) en los pacientes con HAI que en los pacientes con HCI o HCD, asimismo, los anticuerpos IgG anti-antígeno nuclear de Epstein-Barr (EBNA) e IgG anti-antígeno temprano (EA), estuvieron presentes en mayor frecuencia (87 y 47%, respectivamente) en los pacientes con HAI que en los pacientes con los otros diagnósticos. Finalmente, en los pacientes con HAI se identificó una correlación positiva entre anti-VCAG y anti-EA con los marcadores de daño hepático ALT/AST, así como, otras correlaciones entre anti-VCAG y anti-EBNA-1 con los autoanticuerpos antinucleares. Sin embargo, no se encontraron cambios o correlaciones con los otros herpesvirus evaluados. En conclusión, creemos que hay evidencia de una posible participación de EBV en la hepatitis autoinmune pediátrica. Aunque este trabajo es únicamente correlativo y esto no es evidencia de causalidad, sí se justifica continuar estudiando a estos virus en el contexto de la hepatitis autoinmune para determinar cuál es su papel en el inicio y progresión de la enfermedad.

Antecedentes:

Virus

Los virus son agentes infecciosos que han coexistido y participado en la evolución de la vida desde sus orígenes, y fueron descubiertos por primera vez en 1899 por Martinus Willem Beijerinck en la planta del tabaco. Gracias a los avances en la secuenciación genómica y la cristalografía de rayos X, actualmente sabemos que existen millones de especies en el ambiente, siendo posiblemente la estructura orgánica más numerosa y variable. En este aspecto es posible encontrar a los virus en todos los ecosistemas del mundo, infectando a prácticamente todos los organismos conocidos, incluyendo a otros virus (Domingo E y col., 2008). La característica primordial de todos los virus es su incapacidad para reproducirse por sí mismos, requiriendo infectar una célula que proporcione la maquinaria molecular necesaria para replicarse. Están compuestos por material genético, el cual puede ser DNA o RNA de cadena sencilla o doble, una cápside proteica codificada en su genoma y en algunos casos una envoltura lipídica obtenida de la membrana celular o en algunos casos del aparato de Golgi y de núcleo. Su diversidad también es visible en las diferentes formas y tamaños registrados, oscilando entre 20 y 1400 nanómetros, siendo las más comunes, con simetrías helicoidales o icosaédricas (ver ilustración 1).

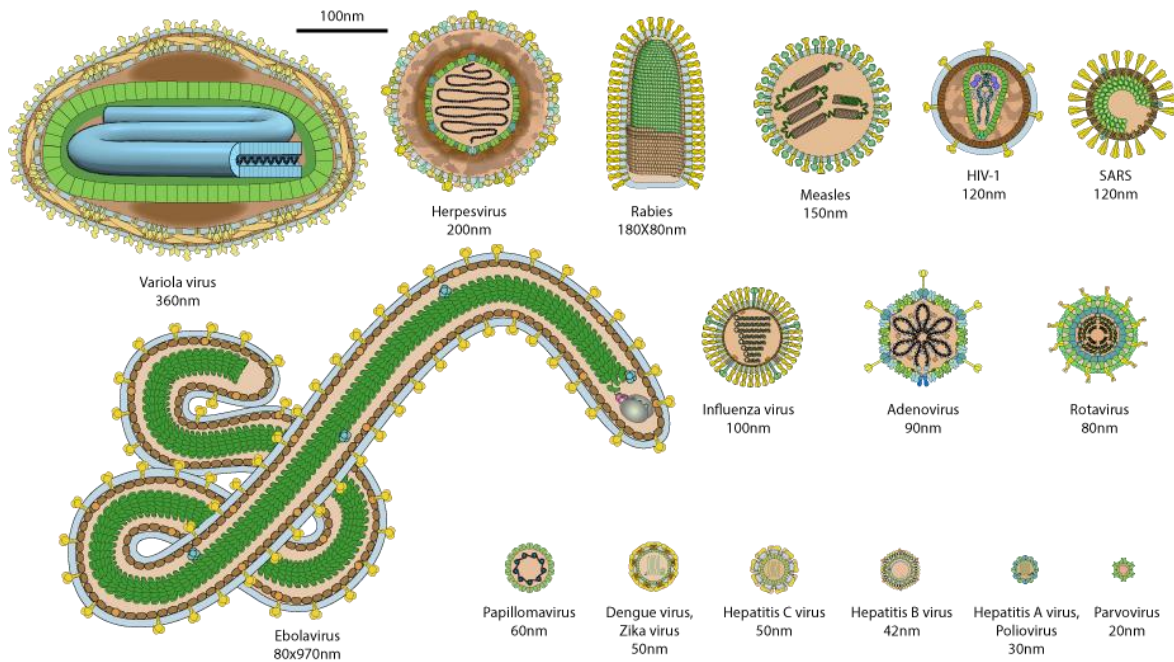


Ilustración 1: Comparación morfológica entre virus de importancia clínica. (ViralZone, 2017)

Uno de los principales retos de estudiar la enorme diversidad de virus existentes es clasificarlos, aunque muchos sistemas han sido propuestos, los más aceptados y aplicados en parte por ser complementarios son: la clasificación de Baltimore, establecida en 1971 por el Dr. David Baltimore que considera el tipo de material genético (RNA, DNA), monocatenario (cadena + o -) o bicatenario y el método de replicación (transcripción directa o por retro transcripción) empleado por el virus para definir siete categorías. Y la clasificación del Comité Internacional de Taxonomía de Virus establecida en 1966, que agrupa a los virus de manera similar a la clasificación taxonómica de la vida, donde los encontramos distribuidos en 14 órdenes, uno de los cuales y en el que se enfoca este trabajo se denomina *Herpesvirales* (Fields B y col., 2013).

Clasificación

Dentro de los *Herpesvirales* están definidas tres familias: la *Malacoherpesviridae* que infecta moluscos, la *Alloherpesviridae* que infecta peces y anfibios, y finalmente *Herpesviridae* que infecta reptiles, aves y humanos (Davison AJ, 2010). La familia de los *Herpesviridae* comprende oficialmente 122 especies de virus distribuidos en 3 subfamilias: Alfa, Beta y Gamma que se clasifican de acuerdo con su tropismo, velocidad de replicación y similitud genética, tomando como base la proteína estructural gH que se encuentra conservada en todas las especies. Actualmente se conocen 9 especies con la capacidad de infectar humanos (ver ilustración 2): el Virus Herpes Simple 1 (HSV1), el Virus Herpes Simple 2 (HSV2) y el Virus de Varicela Zoster (VZV) de la subfamilia alfa; el Citomegalovirus Humano (HCMV), el Herpesvirus Humano 6A (HHV6A), el Herpesvirus Humano 6B (HHV6B) y el Herpesvirus Humano 7 (HHV7) de la subfamilia beta; y el Virus de Epstein Barr (EBV) y el Virus del Sarcoma de Kaposi (KSV) de la subfamilia gamma (ICTV Master Species List, 2020). Este trabajo se enfocará en las subfamilias beta y gamma por lo que más adelante se explorará en detalle cada una de ellas.

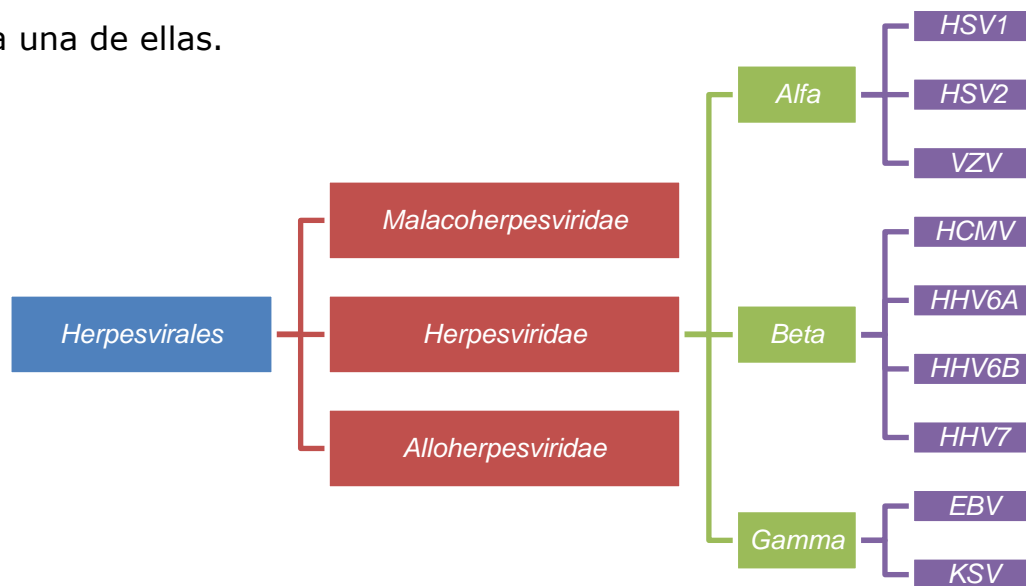


Ilustración 2: Árbol Taxonómico de los Herpesvirus que infectan al humano.

Características

Los Herpesvirus que infectan a la población humana se encuentran homogéneamente distribuidos en el mundo y presentan una seroprevalencia en adultos cercana al 90% sin embargo, en países desarrollados es del 80% gracias a las mejoras en las condiciones de vida, con excepción de KSV, del cual no existen estudios poblacionales fuera de las regiones endémicas de África y Asia donde presenta una seroprevalencia de entre 20-80% (Minhas V & Wood C, 2014).

Estos virus se caracterizan por tener una estructura compuesta (en orden de adentro hacia afuera, ver ilustración 3) por: una molécula lineal de DNA de doble cadena con 124-295 kb (variando con cada virus) en forma de toroide, que codifica para 100-200 proteínas, incluyendo homólogos de proteínas humanas que el virus utiliza para modular la respuesta inmune del huésped, una cápside proteica compuesta de 162 capsómeros con forma icosaédrica sintetizada por el virus durante las etapas finales de replicación viral (la nucleocápside), una estructura asimétrica y amorfa de proteínas fibrosas y RNA viral, denominada tegumento y una envoltura lipídica de membrana adquirida en el aparato de Golgi durante su salida de la célula (Nanbo A y col., 2018), modificada con glicoproteínas virales que permiten la detección y el anclaje a células blanco. En conjunto, estas cuatro estructuras se denominan virión o partícula infectiva (Fields B y col., 2013).

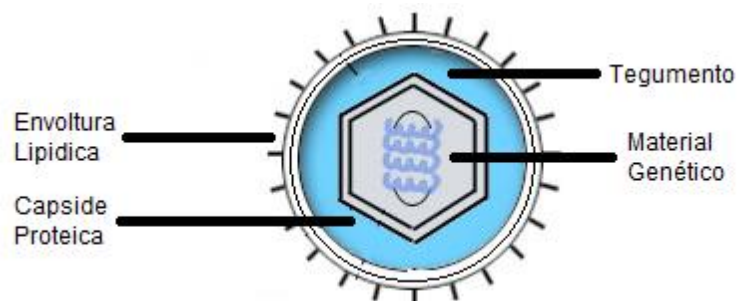


Ilustración 3: Estructura del virión compartida por los Herpesvirus. (Thayer N 2001)

Estos virus se consideran nucleares debido a que, se transcriben y replican en el núcleo de la célula infectada, mientras que el ensamblaje de las partículas virales tiene lugar en el citoplasma y la diseminación de las partículas virales nuevas ocurre mediante la destrucción de la célula hospedero. Una de las características de estos virus que explica su amplia distribución es su capacidad de establecer infecciones benignas pero persistentes en sus huéspedes durante toda la vida del individuo, durante la cual, el virus continúa diseminándose con pocos o ningún síntoma. Un estudio reporta que la infección latente por EBV puede traer beneficios al hospedero mediante la producción basal de $INF\gamma$ y la activación sistémica de macrófagos, resistiendo a la infección por patógenos como *Yersinia pestis* y *Listeria monocytogenes* en un modelo de ratón infectado con Gammaherpesvirus murino 68 (Barton ES y col., 2007). La clave de estos virus radica en poseer un ciclo de vida bifásico, lo que les permite permanecer ocultos del sistema inmune, alternando entre la producción masiva de viriones y un estado discreto de mínima o nula expresión de genes virales y, por lo tanto, ausencia de respuesta inmune (Hulo Ch y col., 2011; Masson P y col., 2013). El ciclo lítico o productivo, se caracteriza por la formación de partículas virales que son liberadas al exterior mediante la lisis de la célula infectada, lo que le permite propagarse a otras células dentro de su hospedero, así como, infectar a otros individuos. Durante esta etapa se observa una alta expresión del genoma viral de manera cronológica, tomando como ejemplo a EBV, se inicia con la activación de los genes inmediatos tempranos, BZLF1 y BRLF1, que codifican las proteínas ZTA y RTA, ambos factores de transcripción que guían la expresión del siguiente bloque, los genes tempranos, involucrados en el metabolismo de nucleótidos, la duplicación del genoma viral (mediada por BALF-5 o BamHI A Leftward Reading frame 5, la polimerasa viral) y el bloqueo del procesamiento de antígeno (Hammerschmidt W, 2015; Jiang S y col., 2017).

La síntesis de genomas nuevos funciona como un “checkpoint” que regula la activación de los genes tardíos que codifican principalmente para las proteínas estructurales de la nueva partícula viral pero también para proteínas que le ayudan a evadir la respuesta inmune, como BCRF1 también llamado vIL-10 (ver ilustración 4) (Ersing I y col., 2017; Cruz ME & Fuentes EM, 2018). Con todas estas piezas sintetizadas ocurre el ensamblaje de la nucleocápside en el citoplasma, así como, la maduración de la partícula viral, que se envuelve en el aparato de Golgi y se libera al medio (Johnson DC & Baines JD, 2011; Nanbo A. y col., 2018).

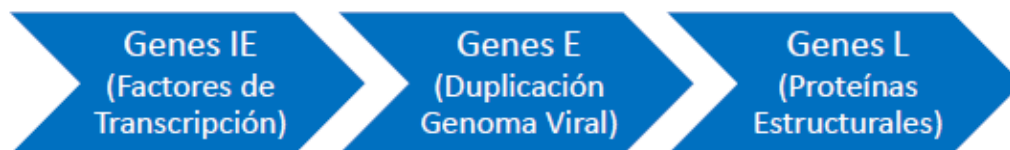


Ilustración 4: Secuencia y función de los genes líticos de EBV.

Por otro lado, el ciclo latente o de persistencia se caracteriza por una baja o nula expresión de genes virales y, por lo tanto, ausencia de producción de proteínas virales, limitándose únicamente a las necesarias para mantener la latencia, duplicar el genoma viral e interactuar con la célula huésped, deteniendo la formación de nuevas partículas infecciosas. En estas condiciones el genoma viral, que en el virión es lineal, se circulariza formando un episoma que persiste de forma indeterminada dentro de la célula infectada, duplicándose en conjunto con la división de la célula hospedera por la polimerasa celular (Stempel M y col., 2019). Esta estrategia le permite a los herpesvirus permanecer de manera asintomática en el huésped por periodos de tiempo prolongados (en la mayoría de los casos, de por vida) sin activar una respuesta inmune al reducir su inmunogenicidad. La frecuencia con la que estos virus cambian entre estadios, así como las células mas propensas a la infección por cada uno varía en función de la subfamilia y el virus, y en el caso de HHV6A, HHV6B y HHV7 el conocimiento es limitado, ya que no se han estudiado sus latencias a fondo.

Betaherpesviridae

En esta subfamilia se encuentran virus con un tropismo muy amplio, incluyendo principalmente células del sistema inmune y un ciclo reproductivo largo de varios días que causa un mayor tamaño de las células infectadas. Resaltan 4 virus que infectan humanos de manera asintomática, en raras ocasiones causando patologías

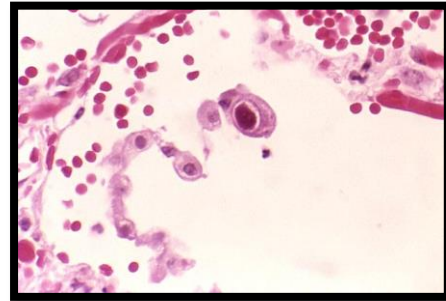


Ilustración 5: Célula epitelial de bronquio infectada por HCMV. (Ewing, 1982)

HCMV o Citomegalovirus Humano

El más estudiado de la subfamilia beta, HCMV es un virus ubicuo con seroprevalencias de entre 50 y 90% de acuerdo con el desarrollo del país y el estatus socioeconómico de la población, en adultos mexicanos se reporta una seroprevalencia cercana al 70% (Alvarado C y col., 2014). La primoinfección del virus infecta un espectro muy amplio de células en prácticamente todos los órganos del cuerpo (ver ilustración 5), pasando a establecer su persistencia en progenitores mieloides CD34+ mediante la proteína viral LUNA (Keyes LR y col., 2012). En personas sanas, el sistema inmunitario es incapaz de eliminar al virus, pero lo regula de manera que no se presenten patologías. En individuos inmunocomprometidos, particularmente pacientes post-transplantados, se pueden originar patologías linfoproliferativas y su infección congénita es una de las causas más importantes de la pérdida de audición y el retraso mental en neonatos (Dupont L & Reeves MB, 2017). Este virus establece su infección latente en monocitos de sangre periférica, y células de la medula ósea. Como en EBV, los estudios serológicos han demostrado una asociación entre CMV y algunas enfermedades autoinmunes, en particular: Síndrome de Sjögren, Diabetes tipo 1 y Lupus Eritematoso Sistémico (Manicklal S y col., 2013).

HHV6 o Herpesvirus Humano 6

Se refiere a dos especies (HHV6A y HHV6B) altamente relacionadas, que infectan casi en su totalidad a la población humana, con una seroprevalencia reportada mayor al 95% (De Bolle L y col., 2005) el número de estudios en México es muy limitado, reportando valores aproximados de 80%. La especie A se ha asociado con encefalopatías agudas y alteraciones del sistema nervioso central (incluyendo esclerosis múltiple), mientras que la especie B se ha asociado con enfermedades cutáneas benignas como Roséola infantum y Pitiriasis rosea (Drago F y col., 2015; Rizzo R y col., 2017), así como con hepatitis agudas y en algunos casos, con hepatitis fulminante (Charnot A y col., 2016). Ambas especies tienen tropismo por monocitos y linfocitos T, donde establecen su infección latente utilizando CD46 y CD134 respectivamente, como su receptor (Eliassen E y col., 2018). En este caso, el genoma viral de HHV6 frecuentemente se integra a los cromosomas entre los telómeros y subtelómeros. HHV6 también se ha asociado con pneumonitis y la enfermedad de injerto contra huésped (Broccolo F y col., 2013; Caccuri F y col., 2017; Caselli E y col., 2017; Phan TL y col., 2018).

HHV 7 o Herpesvirus Humano 7

Es un virus con muchas similitudes a HHV6, presentando una epidemiología, genética y antigenicidad similar, con 85% de la población mundial siendo seropositiva, incluyendo México. Tiene un tropismo por linfocitos T CD4, donde establece su infección latente. Debido a que su primoinfección suele ser asintomática y que no se ha asociado definitivamente con ninguna patología, solo existe evidencia tenue de su participación en algunas enfermedades cutáneas. Este virus permanece poco estudiado (Black JB & Pellett PE, 1999; Ablashi DB y col., 1998; Watanabe T y col., 2002).

Gama herpesvirus

Esta subfamilia comprende aquellos virus con un tropismo limitado a linfocitos B y la capacidad de infectar epitelio de manera transitoria; únicamente incluye dos especies que infectan humanos: EBV y KSV, relevantes por estar asociados de manera directa con la aparición de cáncer (Ackermann M, 2006).

EBV o Virus de Epstein-Barr

De todos los Herpesvirus, el virus de Epstein-Barr es el más estudiado clínica y molecularmente debido su asociación con diversas enfermedades. Fue descubierto en 1958 por Sir Michael Epstein e Yvonne Barr al detectarlo en muestras de sangre obtenidas de pacientes pediátricos africanos con linfoma de Burkitt endémico, siendo el primer agente carcinogénico de naturaleza biológica descubierto en humanos, cambiando el paradigma de su época con respecto a los orígenes del cáncer, y actualmente siendo la causa de al menos 200,000 muertes al año, 15% del cáncer asociado a agentes infecciosos o un 2% del total de fallecimientos por cáncer al año en el mundo (Smith E, 2014).

Estudios posteriores encontraron que el virus, con un genoma de 172 kb, se transmite en la saliva de individuos infectados y se adquiere entre los primeros dos años de vida y la adolescencia, tal que aproximadamente 90% de la población adulta (18 años) ya ha tenido contacto con el virus y es seropositiva, siendo menos predominante en países desarrollados que en países en vías de desarrollo. Su tropismo está dirigido a linfocitos B donde utiliza la proteína CD21 como receptor para infectarlos y a epitelio donde infecta mediante EPHR2A (Chen J y col., 2018). Su objetivo es establecerse en linfocitos B de memoria, una población que perdura durante la vida del individuo, donde el virus acompaña al linfocito durante su desarrollo o lo lleva activamente a este destino (aún no está bien definido).

Una vez en linfocitos B de memoria, el virus persiste durante toda la vida del individuo de manera latente, a la par que se reactiva esporádicamente en el epitelio de la orofaringe, como una infección asintomática (Fagin U y col., 2017; CDC, 2018; Kanakry JA y col., 2016; Tracy SI y col., 2012). Durante su latencia, EBV expresa hasta nueve proteínas cuyas funciones ya han sido estudiadas extensamente; EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -3-LP, LMP1, LMP2A y LMP2B (Avolio TM y col., 2001; Kim JH y col., 2017; Liu S y col., 2018; Ma SD y col., 2017; Minamitani T y col., 2015). Estudios previos han encontrado “programas” de expresión determinados donde se expresa un número diferente de esas proteínas (ver ilustración 6) (Ribeiro J y col., 2017).

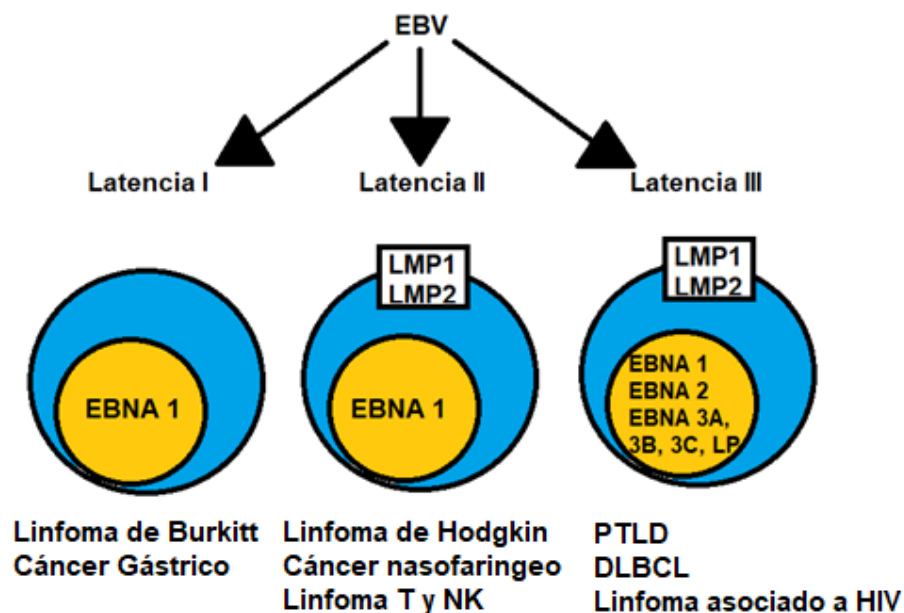


Ilustración 6: Latencias canónicas de EBV y las neoplasias asociadas a cada una. Cesarman, E (2011)

Además de codificar proteínas, se ha demostrado que el virus tiene tres grupos de RNAs no codificantes que se expresan constantemente durante todos los programas de latencia y el ciclo lítico. Están conformados por: los EBERs (1 y 2) o Epstein Barr Encoded RNA's, los primeros en ser descubiertos en 1981 y usados hasta la actualidad como el estándar de oro para la detección del virus mediante la hibridación *in situ* debido a su expresión constante (mediante Pol III) y el alto número de copias por célula, su función aun no es clara pero se asocia con la capacidad transformante *in vitro* e *in vivo* del virus, la estabilidad de la latencia y la regulación de señales celulares de las vías de señalización del BCR, la apoptosis y el INF γ . Los BARTs o (BamHI A Rightward Transcripts) son una familia de, al momento, 44 miRNAs que modulan la expresión de genes líticos y latentes del virus, inhiben la respuesta inmune, promueven el crecimiento tumoral e inactivan proteínas pro-apoptóticas y supresores de tumores. Los miRNAs derivados de BHRF son 4 RNAs resultado de splicing alternativo y los segundos en ser descubiertos en 1989, la evidencia con respecto a su función indica que participan en la inmortalización de las células, pero no son necesarios. (De Re V y col., 2020)

EBV es clasificado como un carcinogénico de tipo I por la IARC (International Agency for Research on Cancer) debido a su alto potencial carcinogénico, que se observa por la capacidad de las proteínas LMP1 y LMP2A/B para inmortalizar linfocitos B en cultivo (Caldwell RG y col., 1998) así como por su asociación con diversas enfermedades linfoproliferativas y neoplásicas (IARC, 2002; Kutok JL & Wang F, 2006), entre las que encontramos: el linfoma de Hodgkin, una neoplasia que inicia en el sistema inmune y presenta un claro perfil de latencia tipo II. Asimismo, el linfoma de Burkitt, caracterizado por ser más agresivo y de peor pronóstico presenta un perfil de latencia tipo I (Abate F y col., 2015; Chene A y col., 2019). Por otro lado, se asocia con tumores epiteliales

como el carcinoma nasofaríngeo (Chan KCA y col., 2017; Cheng S y col., 2019) y el cáncer gástrico y finalmente, con alteraciones del sistema inmunitario como la linfocitosis hemofagocítica y la mononucleosis infecciosa, caracterizadas por una hiperactivación anormal de linfocitos no neoplásicos (Aruna DR y col., 2011; George M, 2014). Asimismo, se asocia con algunas inmunodeficiencias primarias relacionadas con señalización, actividad efectora y degranulación de linfocitos T citotóxicos (Latour S & Winter S, 2018; Izawa K y col., 2017; Winter S y col., 2018). Una característica interesante de estas enfermedades es la elevación de las enzimas hepáticas (ALT y AST), así como la detección de esplenomegalia y en algunos casos hepatomegalia (Aruna DR y col., 2011; Rigopoulou EI y col., 2012).

KSV o Virus de Sarcoma de Kaposi

El segundo miembro de los Gammaherpesvirus que afecta al humano, KSV, también está asociado en pacientes inmunocomprometidos a neoplasias. Al momento se ha determinado como agente causal del SK, EC, PEL y KICS (Purushothaman P y col., 2016). A diferencia de los otros Herpesvirus, KSV se encuentra distribuido heterogéneamente en el mundo, en regiones de África y el Mediterráneo, con seroprevalencia de entre 20-80% en adultos, mientras que, en Europa y EU es menor al 10% (Minhas V & Wood C, 2014). En México no se han realizado estudios para determinar la frecuencia de seropositividad. Tiene un tropismo limitado a linfocitos B, donde establece una infección persistente, pero a diferencia de EBV la latencia de KSV no está bien definida. Se sabe que utiliza la proteína "antígeno nuclear asociado a latencia" o LANA como control maestro para establecer y regular su ciclo latente. Entre las proteínas que codifica KSV encontramos homólogos virales de IL-6, BCL-2, ciclina D, FLIP, CCL2, CCL3, e IRF, entre otros (Polizzotto MN y col., 2015; Bonsignore L y col., 2017).

El hígado

Es un órgano sólido que se encuentra únicamente en animales vertebrados, en tamaño y masa es el más grande del cuerpo humano, con un peso normal de 1.8 Kg en hombres y 1.3 Kg en mujeres. Está compuesto de dos lóbulos principales asimétricos, separados por un ligamento, que luego se divide en 8 segmentos anatómicos, sin diferencias funcionales. Cada lóbulo está compuesto de lobulillos hexagonales de hepatocitos formados alrededor de una vena central, rodeada de triadas hepáticas, compuestas de una vena, una arteria y un conducto biliar, como se muestra en la ilustración 7.

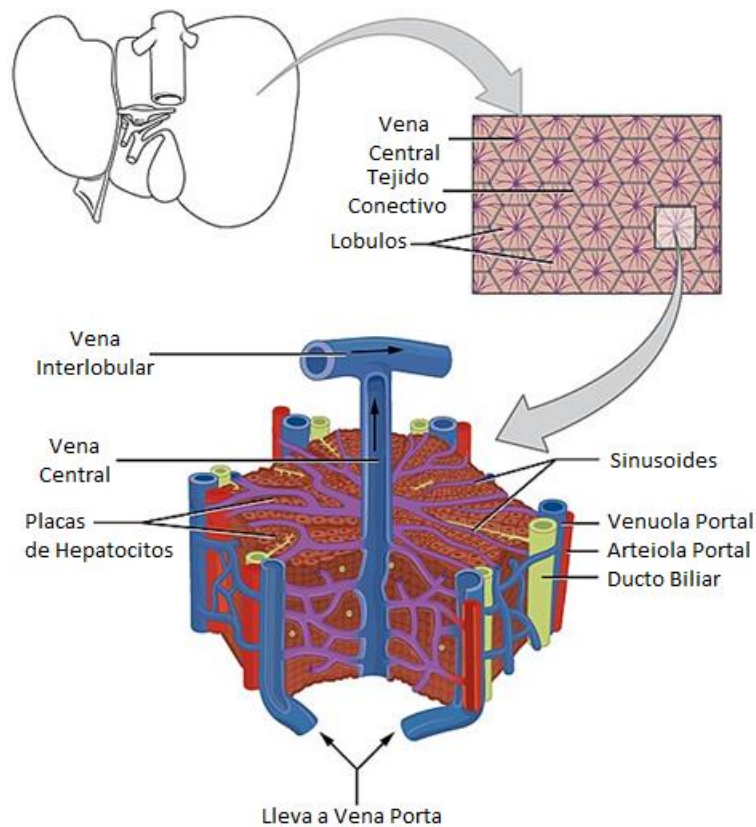
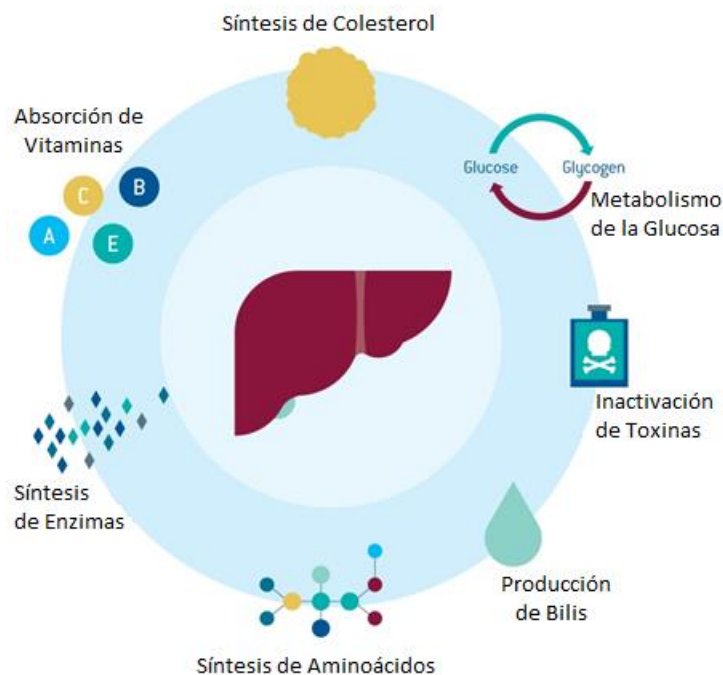


Ilustración 7: Estructuras básicas del hígado a diferentes niveles. (OpenStax College. (2013). Anatomy & physiology. OpenStax. <http://cnx.org/content/col11496/latest/>)

Funciones

El hígado tiene más de 500 funciones conocidas relacionadas a diversos procesos entre los que encontramos: la producción de bilis necesaria para la apropiada digestión de lípidos, el almacenamiento de energía en forma de glucógeno y de nutrientes como hierro, cobre y vitaminas, se encarga de realizar y regular el ciclo de la urea para eliminar el exceso de nitrógeno, metaboliza compuestos endógenos (como la hemoglobina) y xenobióticos como mecanismo de protección contra toxicidad, es el único órgano capaz de realizar gluconeogénesis, participa de manera importante en el metabolismo de lípidos y aminoácidos, sintetiza y regula una cantidad importante de hormonas (como angiotensina), así como otras proteínas como albumina, trombotocina, así como muchos de los factores de coagulación, entre otras, resumiendo las más relevantes en la ilustración 8.



*Ilustración 8: Funciones más importantes del hígado sano. Lonza
https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/US/en/hepatocyte-inventory.*

Aproximadamente 70% a 85% de la masa del hígado consiste en hepatocitos, células epiteliales de 20-30 um especializadas para realizar las múltiples funciones del hígado, tienen una vida promedio de 150 días y a pesar de estar diferenciadas pueden realizar mitosis para mantener sus números, dándole al órgano en su totalidad una capacidad regenerativa muy alta (Marieb EN & Hoehn KN, 2012).

Hepatitis

Las patologías hepáticas agudas son muy comunes, particularmente en niños menores de 6 años, sin embargo, estos son eventos limitados y no requieren intervención médica. En algunos casos estos eventos pueden ocurrir periódicamente o por periodos prolongados. Cuando las alteraciones hepáticas perduran más de 6 meses se da un diagnóstico de hepatitis crónica. La hepatitis crónica es una lesión necro-inflamatoria difusa del hígado, de diferentes etiologías, entre las que se incluyen el alcohol, las infecciones virales, los fenómenos autoinmunes, las enfermedades metabólicas, la intoxicación por medicamentos (la cual suele remitir al retirar el fármaco causal), algunos trastornos hereditarios y en casos donde no se logra identificar la etiología, se le clasifica como hepatitis crónica idiopática (ver Tabla 1). En su totalidad estas patologías están asociadas con 3.5% de los fallecimientos a nivel mundial (Asrani SK y col., 2019). La hepatopatía crónica puede tener diferentes formas de presentación, puede tener un comienzo lento con síntomas generales como dolor abdominal, cansancio, pérdida de peso, aumento del tamaño del hígado, del bazo o puede ser asintomática, donde sólo se encuentran alteradas las funciones hepáticas y de coagulación, así como, los niveles de bilirrubina.

Tabla 1: Resumen de etiologías y agentes causales de las hepatitis.

Tipo	Agente causal	Agente etiológico
Infecciosas	Virales	VHA, VHB, VHC, VHE, EBV, CMV
	Bacterianas	<i>Brucela, Leptospira, Rickettsia, Salmonella</i>
	Parasitarias	<i>Amebas, Equinococos, Toxoplasma y Plasmodium</i>
Toxicas	Alcohólicas	Consumo de Etanol
	Medicamentosas	
Autoinmunes	?	?
Hereditarias	Obstructivas	Atresia de vías Biliares, Tumores, Colestasis intrahepática
	Metabólicas	Enfermedad de Wilson, Hemocromatosis, Glucogenosis, Síndrome de Alagille
Idiopáticas	?	?

Hepatitis autoinmune (HAI)

Es una enfermedad inflamatoria crónica con destrucción progresiva del hígado que produce necrosis, fibrosis y finalmente cirrosis. Se estima que tiene una incidencia entre 0.7 y 2 personas por cada 100,000 individuos a nivel global y una prevalencia de 10 a 17 por 1000,000 en Europa (Feld JJ & Heathcote EJ, 2003). Existe evidencia de una predisposición genética (para HAI tipo I: HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR13; para HAI tipo II: HLA-DR3, HLA-DR7, HLA-DR15) que, mediante un factor desencadenante ambiental, genera una respuesta autoinmune dirigida contra los hepatocitos. Afecta con mayor frecuencia a mujeres jóvenes entre 10 a 30 años con respecto a varones en una proporción de 4:1 (Gregorio GV y col., 1997; Liberal R y col., 2015). No existe ninguna característica clínica propia de HAI pero los síntomas pueden ser ligeros o graves, con o sin manifestaciones extrahepáticas. El cuadro puede manifestarse con anorexia, náuseas, vómitos, malestar general, ictericia, coluria, acolia y ligera alteración de las pruebas clínicas. En el examen físico se puede encontrar hepatomegalia y/o esplenomegalia. En algunas ocasiones el daño hepático es tan importante que se manifiesta cirrosis hepática, hemorragia digestiva, encefalopatía o incluso falla hepática aguda y/ o fulminante (Than NN y col., 2016; Tan ZH y col., 2015).

En los estudios de laboratorio de estos pacientes es frecuente encontrar elevación de transaminasas en forma moderada entre 200 a 400 U/ml y con menos frecuencia se pueden encontrar valores más elevados (ver Anexo II). La elevación de la inmunoglobulina G (o hipergammaglobulinemia) es una característica de esta patología. Y estos hallazgos junto a la positividad de alguno de los siguientes autoanticuerpos: antinucleares (ANAs), anti-músculo liso (ASMA) y anti-microsoma hepato-renal (LKM) en títulos elevados, son criterios diagnósticos. Actualmente, HAI se clasifica según la positividad a algunos autoanticuerpos: HAI Tipo I, si se presentan ANAs o anti-SMA elevados y HAI Tipo II, si presentan anti-LKM1, anti-LKM3 o anti-Lc1 elevados (Czaja AJ, 1999; Hennes EM y col., 2008; Montañó A & Angulo P, 2007; Mack CL y col., 2020).

Para el diagnóstico probable o definitivo de HAI, se necesita la confirmación histológica en una muestra de biopsia hepática y la exclusión de hepatitis asociadas a infecciones por virus hepatotrópicos (VHA, VHB, VHC, VHD, VHE), diferenciar de otras hepatitis autoinmunes como la colangitis biliar primaria (PBC) y la colangitis esclerosante primaria (PSC), o de daño hepático inducido por medicamentos o la enfermedad de Wilson. El Grupo Internacional de Hepatitis Autoinmune elaboró una guía simplificada para el diagnóstico de HAI en adultos y posteriormente, la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición propuso un sistema de puntos para el diagnóstico de HAI en niños (ver Tabla 2).

Tabla 2: Criterios simplificados para el diagnóstico de HAI. (Hennes, 2008)

Elevación de la IgG	
IgG superior al límite normal	1 punto
IgG 1,10 veces superior al límite normal	2 puntos
Autoanticuerpos	
ANA o SMA $\geq 1,40$	1 punto
ANA o SMA $\geq 1,80$	1 punto
LKM $\geq 1,40$	2 puntos
SLA/LP positivos	2 puntos
Histología de hepatitis crónica	
Compatible con HAI	1 punto
Típica de HAI	2 puntos
Ausencia de hepatitis viral	
2 puntos	
Puntuación ≥ 6 : HAI PROBABLE	
Puntuación ≥ 7 : HAI DEFINITIVA	
IgG, nivel sérico de inmunoglobulina G; ANA, anticuerpos antinucleares; SMA, anticuerpos contra el músculo liso; SLA/LP, anticuerpos contra el antígeno hepático soluble/hígado; LKM, anticuerpos contra hígado/riñón.	

HAI puede traslapar con colangitis biliar primaria (CBP) y la colangitis esclerosante primaria (CEP) pero también puede cursar con otras enfermedades autoinmunes extrahepáticas como las tiroiditis autoinmunes (incluida la tiroiditis de Hashimoto o la enfermedad de Graves), vitiligo, artritis reumatoide (AR), Síndrome de Sjögren (SS), colitis ulcerativa, enfermedad celiaca, lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes tipo 1 (DT1), esclerosis múltiple (EM), anemia hemolítica, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn y púrpura autoinmune (Teufel A y col., 2010). HAI también se puede asociar a otras enfermedades inmunológicas como esclerodermia, vasculitis y psoriasis (Harley JB y col., 2018). Es interesante que varias de estas enfermedades también están asociadas con EBV u otros herpesvirus (Rigopoulou EI y col, 2012; Peña R & Almanza E, 2017; Nares J & Jaramillo Y, 2014).

Los esquemas de tratamiento propuestos contemplan el uso de altas dosis de prednisona (un corticoesteroide), el cual se baja gradualmente para minimizar los efectos adversos y se introduce, azatioprina (un análogo de purinas). Algunos pacientes no responden al tratamiento porque ya han iniciado en una etapa muy avanzada de su enfermedad o por causas que se desconocen, la hepatopatía progresa hacia la cirrosis hepática. Se ha propuesto como terapia alternativa en pacientes que no responden, el uso de micofenolato de mofetilo (inhibidor de la síntesis de purinas), ciclofosfamida (agente citostático alquilante), e inhibidores de calcineurina (como la ciclosporina), inhibidores de mTOR (como sirolimus/everolimus), u otros agentes biológicos y en última instancia, para aquellos que no responden a ninguna terapia el único tratamiento eficaz es el trasplante hepático, sin embargo, incluso esta medida puede ser temporal (Michielsen P y col., 2012). Esta reportado que una minoría de los pacientes puede desarrollar HAI de novo post-trasplante (Lowe D & John S, 2018; Tanaka T y col., 2015).

En relación con este proyecto es relevante mencionar la evidencia que puede ligar a los herpesvirus, en particular a EBV con el daño hepático, así como, las propuestas que pudieran explicar el origen del daño hepático con o sin su participación directa.

Herpesvirus en Hepatitis

Numerosos reportes de casos han detectado a EBV, HCMV, HHV6 y HHV7 en pacientes con procesos de daño hepático idiopático, tanto agudo como crónico, así como en falla hepática, en ausencia de virus hepatotrópicos o agentes hepatotóxicos (Hara S y col., 2006; Ishikawa K y col., 2002; Petrova M y col., 2006; Phan TL y col., 2018; Tan ZH y col., 2015). Asimismo, estos herpesvirus se han asociado con diversas enfermedades autoinmunes, mencionadas previamente (Broccolo F y col., 2013).

Se ha evidenciado la presencia de estos virus mediante la detección de genomas virales por PCR en sangre, la determinación de anticuerpos contra estos virus, por ELISA o mediante la detección de RNAs virales por hibridación *in situ* (Cisneros JM & Herreros M, 2006). De entre los herpesvirus, EBV podría ser un buen cofactor/inductor o agente causal de la hepatitis autoinmune ya que, debido a sus características y a su persistencia en el organismo causa un estímulo crónico al sistema inmune dirigido contra células propias (infectadas), y posee un ciclo de reactivación característico (Banko A y col., 2016; Kofteridis DP y col., 2011). Aunque no forzosamente correlaciona temporalmente con los picos de sintomatología en HAI, tampoco lo hace en la mayoría de las enfermedades autoinmunes sistémicas donde ya existe evidencia más sólida de la relevancia de EBV y HCMV (Lossius A y col., 2012; Min CY y col., 2017). Asimismo, la infección de varios de los herpesvirus de manera simultánea puede tener un papel sinérgico, promoviendo el desarrollo y progresión de autoinmunidad, como se observa en otras enfermedades como PEL o KISKC (Tamburro y col., 2012). Los factores que relacionan a estos virus con otras enfermedades autoinmunes son: la presencia de linfocitos T citotóxicos, células NK/NKTs y macrófagos hiper-reactivos, la detección de copias virales sistémicas, un aumento en la expresión de proteínas líticas, así como un alto nivel de anticuerpos dirigidos contra el virus (especialmente contra EBV). En su conjunto, estos datos indican un estado de replicación lítica desregulado. Estas alteraciones podrían ser causadas por mutaciones que afectan el desarrollo, el número o la funcionalidad de los linfocitos T citotóxicos, sin embargo, no se han encontrado genes que se encuentren homogéneamente mutados en todas las enfermedades autoinmunes asociadas a los herpesvirus, aunque sí se proponen algunos como WNT, STAT4, IRF5 y TNFSF4, la norma es encontrar genes asociados a enfermedades específicas (Rigopoulou EI y col., 2012; Draborg AH y col., 2013; Tan y col., 2020).

Aunque no existe un consenso de como los herpesvirus pudieran causar o agravar procesos de daño hepático, ya existen diversas propuestas, en particular para EBV, que buscan explicar las observaciones previas, ya sea de manera directa, al infectar diversos tipos de linfocitos (Hara S y col., 2006), alterando su función, dando señales de sobrevida a células autorreactivas y por exceso de ciclo lítico, llevando a la acumulación de detrito celular (patrones moleculares asociados a daño, PMADs). En paralelo, el efecto indirecto es la producción de moléculas inmunomoduladoras que permiten una ruptura de la tolerancia, la exposición de antígenos intracelulares por muerte debido a un efecto "bystander"; un fenómeno de mimetismo molecular entre las proteínas de estos virus y proteínas propias o finalmente una activación policlonal de linfocitos B (Bolis V y col., 2016). Ya sea en conjunto o solos, algunos de estos mecanismos podrían explicar cómo los herpesvirus pudieran agravar o desencadenar procesos de hepatitis autoinmune, y es lógico pensar que, de existir diferentes causas, éstas debieran estar asociadas con diferentes enfermedades o síntomas.

En individuos inmunocompetentes, los linfocitos T CD8+ normalmente regulan la proliferación viral, manteniendo el número de células infectadas bajo control. Pero en enfermedades asociadas a los herpesvirus, se ha observado que la deficiencia numérica o funcional de los linfocitos T CD8+ causa un control inadecuado de estos virus, y que, al acumularse en los órganos dentro de células positivas, pueden inducir los procesos patológicos observados en estas enfermedades. Aunque en lo reportado actualmente no existe evidencia de infección viral en hepatocitos, sí hay evidencia de infección viral en los linfocitos B y T que forman parte del infiltrado inmune normal del hígado (Hara S y col., 2006; Winter S y col., 2018).

Aunque la infección de las células T por EBV no es normal, ya que estas células no representan su tropismo clásico, esta infección es característica de enfermedades linfoproliferativas asociadas al virus, incluyendo el linfoma de células T/NK. Las células T expresan menos antígenos virales y por lo tanto tienen mayor facilidad para evadir la respuesta inmune. Por otro lado, las células T son reclutadas al hígado, donde los productos de su activación e infección por EBV, en particular interferón gamma ($IFN\gamma$), factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) y ligando de Fas (FASL) son potentes inductores de hepatitis (Coleman CB y col., 2015; Draborg AH y col., 2013; Drebber U y col., 2006).

A partir de la infección por EBV de los linfocitos B naïve, el virus acompaña al linfocito B durante su diferenciación y éste transita desde la latencia III hasta la latencia cero en los linfocitos B de memoria. En este proceso, la expresión de las proteínas virales LMP1 y LMP2, le proporcionan al linfocito B señales de supervivencia y de maduración a la célula, que se cree, podrían reemplazar a las señales del antígeno y del centro germinal. Es posible que, los linfocitos B autoreactivos infectados por EBV proliferen con estas señales y/o al encontrar un antígeno propio proliferen hacia una respuesta autoinmune humoral, que además de expresar proteínas de EBV involucradas en la evasión inmune y la inhibición de la apoptosis, resultaría probablemente en la pérdida de la tolerancia y el desarrollo de la autoinmunidad (Harley JB y col., 2018; Minamitani, T y col., 2015) (Tracy SE y col., 2012). El antígeno de una proteína externa (del virus, en este caso) sería lo suficientemente parecido a un antígeno propio (de un hepatocito, por ej.) tal que, un anticuerpo contra ese antígeno (así como linfocitos B y T dirigidos contra ese mismo antígeno), podría reaccionar con el antígeno viral y el propio.

Este evento se conoce como mimetismo molecular y en particular para EBV, se han propuesto varias proteínas con el potencial de cruzar con proteínas propias, pero la que tiene más evidencia es EBNA-1, con la que se ha confirmado una reactividad cruzada con anticuerpos antinucleares (Anti-Ro) en esclerosis múltiple (EM) y lupus eritematoso sistémico (LES), así como con CYP2D6 en hepatitis autoinmune (Rigopoulou EI y col., 2012; Poole BD, 2006). La evidencia actual sugiere que los linfocitos infectados están entrando constantemente en fase lítica de manera crónica, contrario a la propensión del virus a permanecer latente, lo que resulta en muerte celular, inducción de inflamación local y mayor reclutamiento de linfocitos T (CD8+, CD4+) (Bolis V y col., 2016). Los linfocitos T CD8+ específicos para EBV, se encuentran enriquecidos en o cerca de los órganos afectados en pacientes con AR o EM, o en el líquido sinovial de pacientes con artritis psoriática (APs) u osteoartritis (OA) (Farina A y col., 2017). Otro mecanismo, es por "activación colateral". En este caso, la inflamación producida por la infección promueve la activación o expansión de linfocitos previamente activados, linfocitos autoreactivos. También hay activación y expansión de células T autoreactivas debido a la inflamación local severa inducida por el virus y la producción local de citocinas. En las enfermedades autoinmunes, los altos títulos de anticuerpos contra EBV pueden ser el resultado de la activación policlonal de los linfocitos B (Nagata K y col., 2017). Particularmente en HAI se observa un incremento de anticuerpos IgG policlonales, que pueden originarse de la reactivación de EBV en los linfocitos B.

En el caso de HCMV se ha confirmado que los anticuerpos contra la proteína UL94 interactúan con las células epiteliales en la esclerosis sistémica, así como los anticuerpos contra la proteína de la región IE2 interactúan con la cadena beta del HLA, en el rechazo de transplantes (Lunardi C y col., 2000; Fujinami RS y col., 1988).

Justificación y planteamiento del problema:

Con base en la evidencia que asocia al VEB con procesos de autoinmunidad y a los herpesvirus de las familias Beta y Gamma con marcadores de daño hepático, es importante evaluar la participación que estos virus puedan tener individualmente o en conjunto como detonantes o agravantes en pacientes con hepatitis autoinmune y/o hepatitis idiopática.

Hipótesis del trabajo:

La detección de copias virales provenientes de uno o más herpesvirus, en plasma y tejido hepático, así como la detección de anticuerpos elevados contra proteínas de EBV, correlacionarán con un cuadro clínico de hepatitis con características de autoinmunidad, en pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México "Federico Gómez".

Objetivos:

General:

Evaluar la infección por EBV, CMV, HHV6, HHV7 y KSV en pacientes pediátricos con diagnóstico de hepatitis crónica, con y sin marcadores de autoinmunidad.

Particulares:

- ❑ Cuantificación de la carga viral de EBV, CMV, HHV6, HHV7 y KSV en leucocitos, plasma y tejido hepático mediante qPCR múltiplex.
- ❑ Medición de la presencia de anticuerpos contra EBV en plasma por ELISA.
- ❑ Análisis estadístico de la infección por los herpesvirus con el diagnóstico de hepatitis crónica (con o sin marcadores de

autoinmunidad) y algunos marcadores de daño hepático y auto-anticuerpos.

Diseño del estudio:

Estudio transversal descriptivo y observacional de una cohorte prospectiva de pacientes con enfermedad hepática crónica con y sin características de autoinmunidad.

Población de estudio:

Pacientes pediátricos del Departamento de Gastroenterología que acuden al Hospital Infantil de México "Federico Gómez" con diagnóstico de hepatitis crónica con y sin características de autoinmunidad. Los padres o tutores de todos los pacientes pediátricos incluidos en el estudio dieron su aprobación mediante la firma de una carta de consentimiento informado, y los mayores de 10 años firmaron también una carta de asentimiento informado, ambas previamente aprobadas por el comité de Investigación y Ética del Hospital Infantil de México Federico Gómez (ver apéndice).

Criterios de Inclusión

- Pacientes con diagnóstico de hepatitis autoinmune o compatible con autoinmunidad de acuerdo con los criterios de El Grupo Internacional de la Hepatitis Autoinmune (Hennes EM y col., 2008)

Criterios de exclusión

- Evidencia de infección por otros agentes biológicos que causen Hepatitis (VHA, VHB, VHC), contacto con agentes químicos hepatotóxicos, toma de medicamentos o infusiones herbolarias con daño hepático reportado o traumatismo físico que resulte en pérdida de función hepática.

Criterios de eliminación

- Decisión del paciente o sus familiares de no participar en el estudio.

- Ausencia de la información clínica completa.
- Insuficiente o inadecuado material biológico.
- Pacientes que decidan abandonar el estudio.

Pacientes incluidos en el estudio.

44 pacientes pediátricos del Departamento de Gastroenterología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, clasificados en 3 grupos de estudio según la etiología de su enfermedad.

Tabla 3: Resumen de los pacientes en seguimiento por diagnóstico. Detallando el número de muestras de sangre periférica (SP) y el número de biopsias hepáticas (pareadas temporalmente con la SP). Así como la edad promedio y el porcentaje de cada género.

Diagnóstico	#Pacientes	#MuestrasSP	#Biopsias	Edad	Genero
Hepatitis Crónica Autoinmune (HAI)	10	23	6	130M	80% F 20% M
Hepatitis Crónica idiopática (HCI)	23	33	12	101M	57% F 43% M
Hepatitis Crónica de causa Definida (HCD)	11	20	6	106M	27% F 73% M
Voluntarios Sanos Pediátricos (VSP)	7	7	0	112M	57% F 43% M

Los tres grupos se definieron de acuerdo con diagnóstico clínico establecido por el Departamento de Gastroenterología del HIMFG. El grupo de HAI está conformado por pacientes con un puntaje igual o mayor a 6 de acuerdo con los criterios para el diagnóstico de HAI (Hennes EM y col., 2008). El grupo de HCI está conformado por pacientes con síntomas de enfermedad hepática por más de seis meses que no tuvieron una causa determinada al terminar el análisis de los datos. Finalmente, el grupo de HCD está conformado por pacientes con diagnósticos crónicos establecidos (no autoinmunes), estos datos se resumen en la Tabla #4.

Tabla 4: Diagnósticos del grupo de hepatitis de causa definida incluidos en el estudio.

Paciente	Diagnostico
G004	Deficiencia de Lipasa Acida
G016	Esteatosis Hepática
G025	Esteatosis Hepática
G041	Colestasis Intrahepática Familiar
G050	Esteatosis Hepática + Síndrome de Gilbert

G059	Colangitis Esclerosante
G063	Colestasis Multifactorial
G064	Esteatosis Hepática
G069	Enfermedad Venoclusiva Hepática
G073	Hepatoblastoma
G080	Glucogenosis Tipo III

Procedimiento Experimental

Obtención de Leucocitos

Partiendo de una muestra de 1-4 mL de sangre periférica obtenida de pacientes pediátricos, se obtuvieron los leucocitos utilizando un método de lisis de eritrocitos. Se centrifugó la sangre a 3500 rpm durante 10 minutos para separar el plasma (que se almacenó a -80°C para su posterior uso en ELISA y cuantificación de carga viral) y el paquete celular, se resuspendió en Buffer EL (QIAGEN #Catalogo 79217) y se colocó en hielo durante 15 minutos con agitación cada 5 minutos, seguido de una centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se repitió este procedimiento y posteriormente se realizaron tres lavados con PBS (GIBCO #Catalogo 10-010) y se cuantificaron las células obtenidas. Del total se separaron 4 millones (cuando el número obtenido fue menor se utilizó la mitad de lo obtenido) para la extracción de DNA y RNA, congelando el resto a -80°C y luego en nitrógeno líquido, en 30% medio RPMI 1640 (GIBCO #Catalogo 11875), 60% de suero fetal bovino y 10% de dimetilsulfoxido para su uso en estudios posteriores.

Extracción de DNA/RNA

Para la extracción de DNA/RNA se utilizaron los kits: All Prep DNA/RNA (QIAGEN #Catalogo 80204) y All Prep DNA/RNA/miRNA Universal (QIAGEN #Catalogo 80224), siguiendo los protocolos descritos en sus manuales, e implementando las columnas QIAshedder (QIAGEN

#Catalogo 79656) para homogeneizar el lisado resultante de la lisis de leucocitos, utilizando buffer RLT plus con beta-mercaptoetanol. Se eluyó el DNA en Buffer TE_{0.1 mM} y el RNA en agua libre de nucleasas.

qPCR Multiplex

La cuantificación de copias virales se realizó mediante dos reacciones de PCR cuantitativa multiplex previamente estandarizados en nuestro laboratorio (Sánchez Y y col., 2018), la primera dirigida a EBV, HCMV y un gen celular (Actina-B) y la segunda dirigida a HHV6, HHV7 y el VSK. Para la detección estos virus se seleccionaron genes con una sola copia, con baja tasa de mutación, necesarios para la replicación viral y que fueran específicos de cada virus.

Para EBV se seleccionó el gen BALF-5 que codifica para la subunidad catalítica de la DNA polimerasa viral, para HCMV se seleccionó el gen UL123 que codifica para un transactivador involucrado en la expresión de genes virales y celulares de CMV durante la fase latente, para HHV6 se seleccionó el gen U31 que se encuentra conservado en ambas especies y codifica para una proteína del tegumento con diversas funciones virales, para HHV7 virus se seleccionó el gen U57 que codifica para la proteína mayor de la cápside y para KSV se seleccionó el gen LANA (Latency Associated Nuclear Antigen) que regula el estado latente del virus (Sánchez Y y col., 2018).

Se sintetizaron los oligonucleótidos de los genes seleccionados junto con 6 sondas Taqman dirigidas a los fragmentos amplificados por los primers, conjugadas a tres fluorocromos diferentes para permitir su detección simultánea. Las secuencias de primers y sondas utilizadas se resumen en la tabla 5:

Tabla 5: Secuencias de los primers y sondas utilizadas para la detección de los cinco virus estudiados y el gen constitutivo control, junto con los fluorocromos conjugados a cada sonda.

Reacción	Virus	Gen	Función	Secuencia 5' → 3'	Fluorocromo
1	B-Actina		Primer F	CCAGGCTAACCTCGGAAATCT	Cy-5
			Primer R	CATCGTCATTCCTGTGCAACT	
			Sonda	TGGGGTGCCGGCTCTCTGCT	
	EBV	BALF-5	Primer F	CGG AAG CCC TCT GGA CTT C	FAM
			Primer R	CCC TGT TTA TCC GAT GGA ATG	
			Sonda	TGTACACGCACGAGAAATGCGCC	
	HCMV	UL-123	Primer F	GACTAGTGTGATGCTGGCCAAG	HEX
			Primer R	GCTACAATAGCCTCTTCCTCATCTG	
			Sonda	AGCCTGAGGTTATCAGTGAATGAAGCGCC	
2	HHV6	U31	Primer F	CGACTCTCACCCCTACTGAACGA	FAM
			Primer R	GAGGCTGGCGTCGTAGTAGAA	
			Sonda	AGCCACAGCAGCCATCTACATCTGTCAA	
	HHV7	U57	Primer F	CGGAAGTCACTGGAGTAATGACAA	HEX
			Primer R	ATGCTTTAAACATCCTTTCTTTTCGG	
			Sonda	CTCGCAGATTGCTTGTGGCCATG	
	KSV	LANA	Primer F	AGTTATGGGCGACTGGTCTG	Cy-5
			Primer R	GGATGGAAGACGAGATCCAA	
			Sonda	AAGTCCGTATGGGTCATTGC	

Se utilizó la mezcla de reacción comercial QuantiTect Probe PCR Kit (200) (QIAGEN #Catalogo 204343) en el equipo Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform (QIAGEN #Catalogo 9001580). Para cuantificar la carga viral en las muestras se utilizaron curvas estándar de plásmidos que contienen cada uno de los diferentes genes de interés, y que fueron construidos en el laboratorio. Las condiciones de la reacción, así como las concentraciones y cantidades utilizadas se resumen en las siguientes tablas.

Tabla 6: Condiciones utilizadas para la qPCR multiplex (Sanchez-Ponce, 2018).

Paso	Hold 1	Hold 2	50 ciclos	
			Desnaturalización	Extensión
Temperatura (°C)	52	95	95	60
Duración (min)	2	10	15	60

Tabla 7: Concentraciones y cantidades de cada reactivo para una reacción de 12.5 uL.

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen por reacción (uL)
QuantiTect PCR Master Mix	2x	1x	6.250
Primer (EBV/HHV6) F	10 nM	200 µM	0.250
Primer (EBV/HHV6) R	10 nM	200 µM	0.250
Sonda (EBV/HHV6)	10 nM	100 µM	0.125
Primer (HCMV/HHV7) F	10 nM	200 µM	0.250
Primer (HCMV/HHV7) R	10 nM	200 µM	0.250
Sonda (HCMV/HHV7)	10 nM	100 µM	0.125
Primer (Act-β/KSV) F	10 nM	200 µM	0.250
Primer (Act-β/KSV) R	10 nM	200 µM	0.250
Sonda (Act-β/KSV)	10 nM	100 µM	0.125
Agua libre de nucleasas	NA	NA	0.375
Muestra	NA	NA	4 uL
Volumen final	NA	NA	12.5

ELISA

Se realizó la detección de 4 anticuerpos contra proteínas características del virus de Epstein-Bar. Anti-antígeno de la cápside viral (VCA) en las isoformas IgG e IgM, anti-antígeno temprano (EA) en su isoforma IgG y anti-antígeno nuclear de Epstein-Bar 1 (EBNA-1) en su isoforma IgG, utilizando los kits: Epstein-Barr virus EA IgG ELISA #Catalogo RE57311, Epstein-Barr virus EBNA-1 IgG ELISA #Catalogo RE56251, ambos de la marca IBL International y Epstein-Barr virus VCA IgM ELISA #Catalogo 51104 y Epstein-Barr virus VCA IgG ELISA #Catalogo 51204 de la marca Human. Se siguieron los protocolos descritos individualmente en cada uno de los kits.

Resultados:

Dentro de los pacientes pediátricos que se reciben en el Departamento de Gastroenterología del Hospital Infantil de México, un alto porcentaje corresponde a pacientes con patologías hepáticas agudas o crónicas con una etiología definida, donde no se considera la posible contribución de los herpesvirus.

La presencia de EBV (cargas virales y anticuerpos anti-EBV) en varios reportes de casos de pacientes adultos con hepatitis crónicas ha generado la propuesta de que EBV, pudiera estar relacionado como agente causal o agravante en las hepatitis idiopáticas crónicas y en particular, en las hepatitis crónicas autoinmunes. Asimismo, el resto de los herpesvirus gamma y beta al tener similitud con EBV y ser moduladores del sistema inmune podrían estar asociados con el inicio de los procesos autoinmunes, de manera individual o conjunta. Como un primer paso para determinar esta relación es necesario comprobar si realmente están presentes estos virus en números relevantes en estos pacientes, por lo que para comprobar la hipótesis antes mencionada se planteó monitorear el número de copias virales de cada uno de los herpesvirus humanos beta y gamma en una corte de pacientes con hepatitis crónicas de diferentes etiologías o hepatitis crónicas idiopáticas, que permitiera comparar la presencia de estos virus entre aquellos donde esperamos encontrar una participación y aquellos que ya son explicados por una etiología sólida. Las muestras de sangre periférica fueron separadas en plasma y células mononucleares, de tal forma que por cada muestra de sangre periférica se obtuvieran dos valores de carga viral (CV): en leucocitos, que corresponde a los virus en fase latente (copias/ μ g de DNA), y en el plasma, que corresponde a las partículas infecciosas producidas por los ciclos líticos (copias/ml de plasma).

Objetivo particular 1:

Cuantificación de la carga viral de EBV, HCMV, HHV6, HHV7 y KSV en leucocitos, plasma y tejido hepático mediante qPCR múltiplex.

No se observó la presencia de HCMV ó KSV en la cohorte de pacientes evaluada, por lo que estos dos virus se omiten en los resultados presentados más adelante.

El virus detectado más recurrente y con mayor carga viral en plasma y leucocitos con respecto a los otros virus, fue Epstein Barr (ver ilustraciones 9 y 10), y no se observaron diferencias entre los tres grupos diagnósticos de hepatitis crónica: autoinmune (HAI), idiopática (HCI) o de causa definida (HCD), detectando al virus en 20% de las muestras de leucocitos y 50% de las muestras de plasma (ver tabla 7). Por otro lado, el número de copias virales de EBV, aunque no fue significativamente diferente entre las muestras de los grupos diagnósticos si mostró una tendencia a números mayores en HAI con respecto a los otros dos diagnósticos (ver ilustración 10). Un dato que llama la atención es la ausencia de cargas virales para EBV en los voluntarios sanos, donde ninguno de los siete mostró detección alguna, sin embargo, al ser una muestra limitada, no hay una diferencia significativa. Finalmente, al analizar estos datos se determinó que el porcentaje de pacientes positivos a EBV (ver ilustración 9) así como el número de copias virales de EBV (ver ilustración 10) era superior en plasma con respecto a leucocitos independientemente del grupo diagnóstico de manera significativa, utilizando una prueba de Chi-Cuadrada ($p=0.035$ HAI, $p=0.034$ HCI y $p=0.061$ HCD) y Kruskal-Wallis ($p=0.045$ HAI, $p=0.0001$ HCI y $p=0.065$ HCD), respectivamente.

Tabla 8: Resumen de cargas virales para EBV en los cuatro grupos de estudio.

EBV en HAI	Plasma		Leucocitos		Tejido Hepático	
Muestras +	30.4%	(7/23)	8.7%	(2/23)	16.7%	(1/6)
Pacientes +	50.0%	(5/10)	20.0%	(2/10)	16.7%	(1/6)
Media	22018		173		216	
Mediana	1196		173		216	
Máximo	137100		246		216	
EBV en HCI	Plasma		Leucocitos		Tejido Hepático	
Muestras +	42.4%	(14/33)	18.2%	(6/33)	16.7%	(2/12)
Pacientes +	52.2%	(12/23)	26.1%	(6/23)	18.2%	(2/11)
Media	12107		469		217	
Mediana	2053		415		217	
Máximo	87738		970		250	
EBV en HCD	Plasma		Leucocitos		Tejido Hepático	
Muestras +	35.0%	(7/20)	10.0%	(2/20)	33.3%	(2/6)
Pacientes +	45.5%	(5/11)	18.2%	(2/11)	33.3%	(2/6)
Media	6535		235		110	
Mediana	750		235		110	
Máximo	40133		277		110	
EBV en VSP	Plasma		Leucocitos			
Muestras +	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/7)		
Pacientes +	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/7)		
Media	0		0			
Mediana	0		0			
Máximo	0		0			

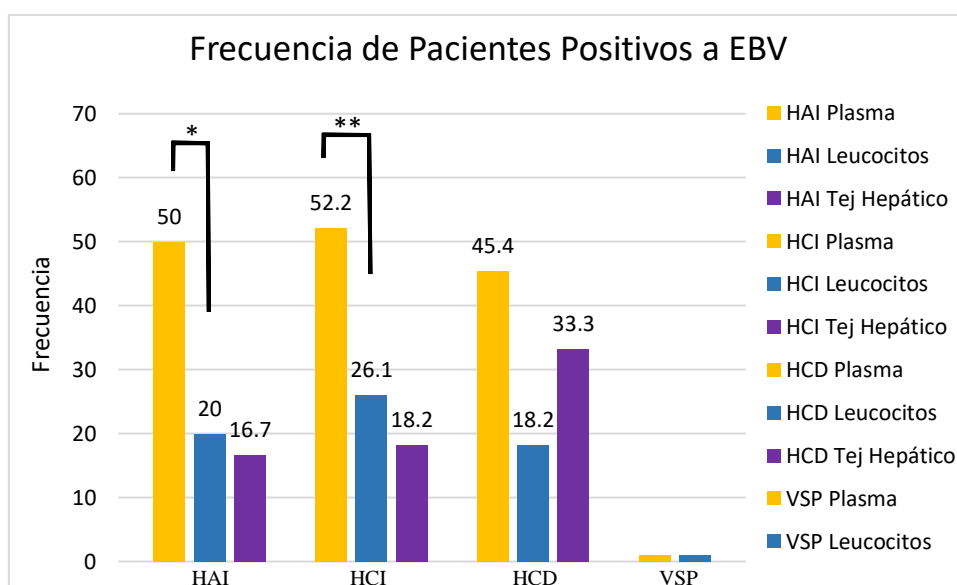


Ilustración 9: Frecuencia de Pacientes positivos a EBV por qPCR. Se consideró positiva una detección de 100 copias por microgramo de DNA en leucocitos en hígado y 400 copias por mL en

plasma. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrada para determinar significancia entre valores. * $p=0.035$ ** $p=0.034$.

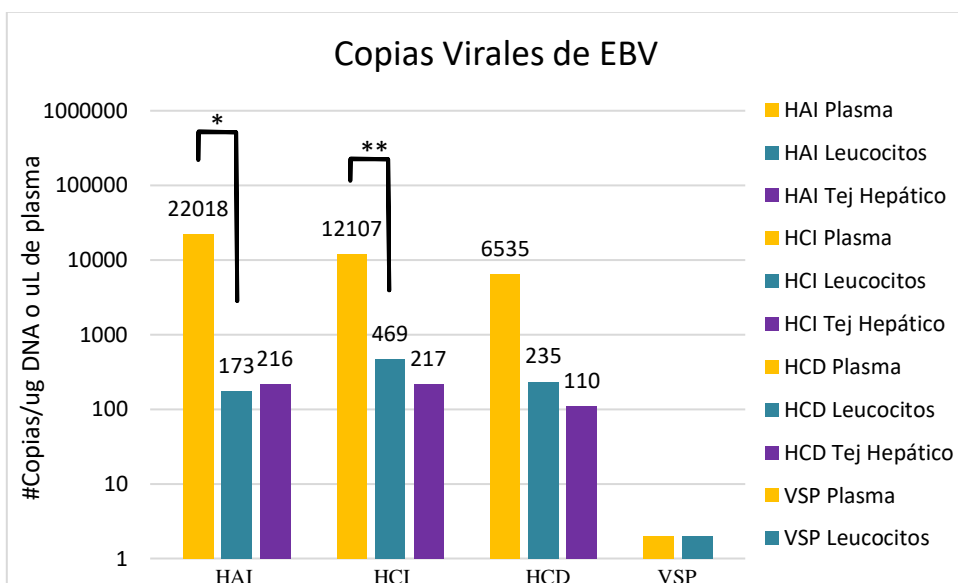


Ilustración 10: Media de Copias Virales de EBV detectadas por qPCR en pacientes positivos. Se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para determinar la significancia entre valores. * $p=0.045$ ** $p=0.0001$.

Por otro lado, se observó, ausencia de correlación entre las cargas virales de EBV que se detectan en plasma con las cargas virales del mismo, que se detectan en hígado.

Respecto a HHV6, se encontró un número mínimo de muestras positivas con una carga viral baja en relación con EBV para leucocitos y plasma, sin diferencias por grupo diagnóstico o una tendencia clara (ver tabla 8). Lo que llamó la atención fue la mayor frecuencia de pacientes positivos a HHV6 en tejido hepático (ver ilustración 11), y con cargas virales un poco más elevadas en los grupos diagnósticos de HCI y HCD (ver ilustración 12). Es importante remarcar que se cuenta con un bajo número de biopsias por lo que no es posible establecer conclusiones sólidas, por esto mismo en ninguna de las comparaciones previamente exploradas se determinó una diferencia estadística utilizando la prueba de Chi-Cuadrada para los porcentajes y de Kruskal-Wallis para las medias.

Tabla 9: Resumen de cargas virales para HHV6 en los cuatro grupos de estudio.

HHV6 en HAI	Plasma		Leucocitos		Tejido Hepático	
Muestras +	4.3%	(1/23)	0.0%	(0/23)	33.3%	(2/6)
Pacientes +	10.0%	(1/10)	0.0%	(0/10)	33.3%	(2/6)
Media	450		0		530	
Mediana	450		0		530	
Máximo	450		0		946	
HHV6 en HCI	Plasma		Leucocitos		Tejido Hepático	
Muestras +	0.0%	(0/33)	3.0%	(1/33)	25.0%	(3/12)
Pacientes +	0.0%	(0/23)	4.3%	(1/23)	27.3%	(3/11)
Media	0		110		217	
Mediana	0		110		217	
Máximo	0		0		250	
HHV6 en HCD	Plasma		Leucocitos		Tejido Hepático	
Muestras +	5.0%	(1/20)	10.0%	(2/20)	66.7%	(4/6)
Pacientes +	9.1%	(1/11)	18.2%	(2/11)	66.7%	(4/6)
Media	460		160		1185	
Mediana	460		160		1185	
Máximo	460		180		2150	
HHV6 en VSP	Plasma		Leucocitos			
Muestras +	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/7)		
Pacientes +	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/7)		
Media	0		0			
Mediana	0		0			
Máximo	0		0			

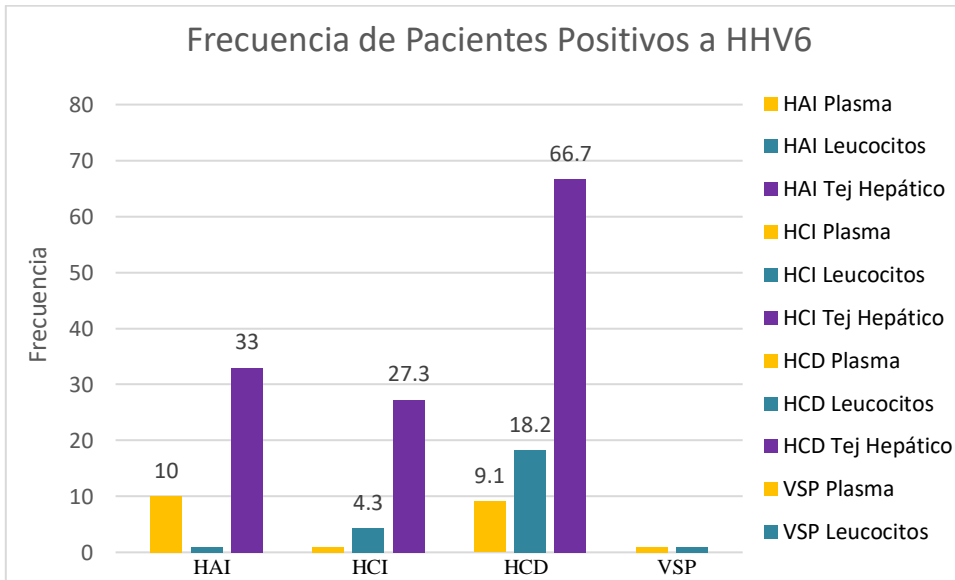


Ilustración 11: Frecuencia de Pacientes positivos a HHV6 por qPCR. Se consideró positiva una detección de 100 copias por microgramo de DNA en leucocitos e hígado y 400 copias por mL en plasma. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrada para determinar significancia entre valores.

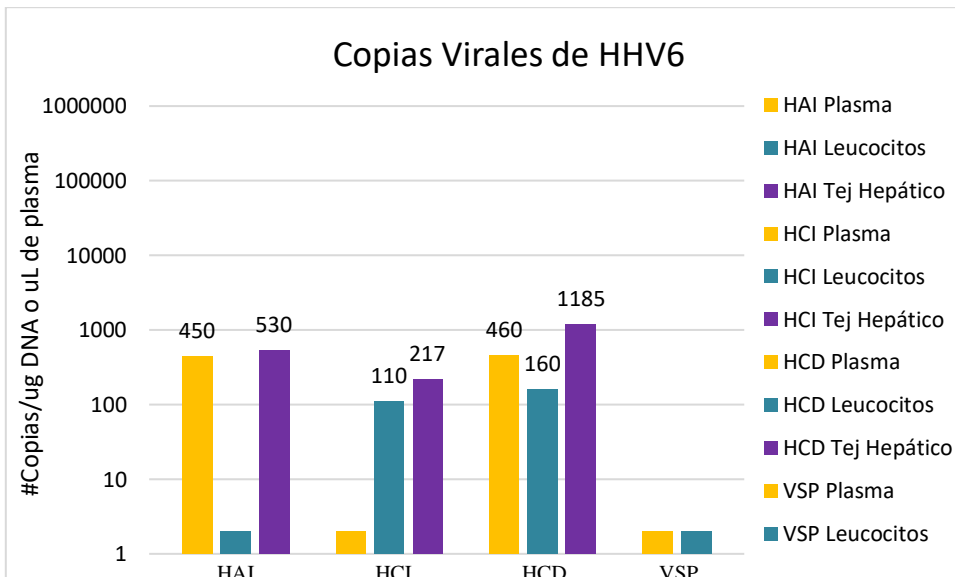


Ilustración 12: Media de Copias Virales de HHV6 detectadas por qPCR en pacientes positivos. Se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para determinar la significancia entre valores.

Por último, la detección de HHV7 presentó un comportamiento más similar a EBV (ver tabla 9), encontrándolo principalmente en plasma y leucocitos en comparación con tejido hepático, aunque en frecuencias de pacientes positivos menores que EBV (ver ilustración 13), el número de copias virales detectadas fue muy elevado (ver ilustración 14), en algunos casos similar a lo encontrado para EBV, pero debido a la gran diferencia entre los valores de desviación estándar, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos diagnósticos o entre los tejidos evaluados, aunque se observa una tendencia de mayores cargas virales para HHV7 en plasma que en leucocitos o tejido hepático, en dos de los grupos diagnósticos (HAI y HCD).

Tabla 10: Resumen de cargas virales para HHV7 en los cuatro grupos de estudio.

HHV7 en HAI	Plasma		Leucocitos		Tejido Hepático	
Muestras +	8.7%	(2/23)	8.7%	(2/23)	0.0%	(0/6)
Pacientes +	20.0%	(2/10)	20.0%	(2/10)	0.0%	(0/6)
Media	58449		164		0	
Mediana	58449		164		0	
Máximo	115564		167		0	
HHV7 en HCI	Plasma		Leucocitos		Tejido Hepático	
Muestras +	9.1%	(3/33)	9.1%	(3/33)	0.0%	(0/12)
Pacientes +	8.7%	(2/23)	8.7%	(2/23)	0.0%	(0/11)
Media	2995		260		0	
Mediana	2445		260		0	
Máximo	4500		320		0	
HHV7 en HCD	Plasma		Leucocitos		Tejido Hepático	
Muestras +	15.0%	(3/20)	10.0%	(2/20)	33.0%	(2/6)
Pacientes +	27.3%	(3/11)	18.2%	(2/11)	33.0%	(2/6)
Media	4614		210		230	
Mediana	760		210		230	
Máximo	12648		280		230	
HHV7 en VSP	Plasma		Leucocitos			
Muestras +	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/7)		
Pacientes +	0.0%	(0/7)	0.0%	(0/7)		
Media	0		0			
Mediana	0		0			
Máximo	0		0			

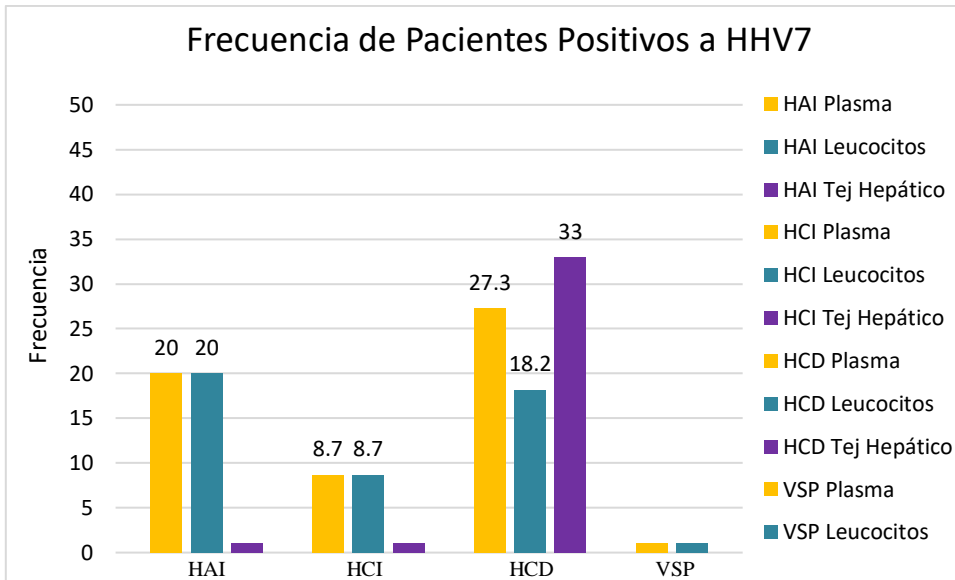


Ilustración 13: Frecuencia de Pacientes positivos a HHV7 por qPCR. Se consideró positiva una detección de 100 copias por microgramo de DNA en leucocitos e hígado y 400 copias por mL de plasma. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrada para determinar significancia entre valores.

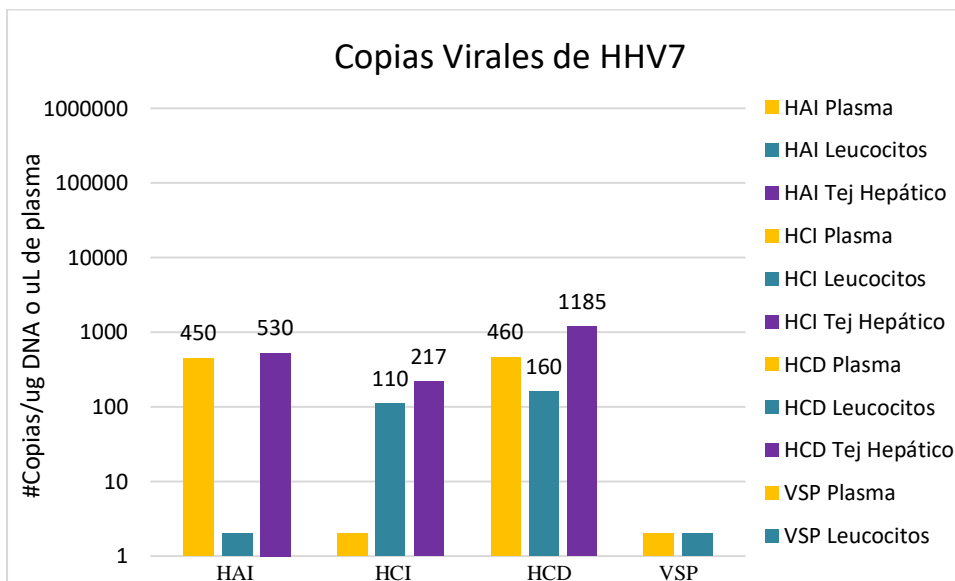


Ilustración 14: Media de Copias Virales de HHV7 detectadas por qPCR en pacientes positivos. Se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para determinar la significancia entre valores.

Objetivo particular 2:

Medición de la presencia de anticuerpos contra EBV en plasma por ELISA.

Con las cuantificaciones de carga viral previas, se confirmó la presencia de 3 de los cinco Herpesvirus evaluados: EBV, HHV6 y HHV7. Y de éstos, EBV se detectó en un mayor porcentaje de pacientes y con un número de copias importante. Para continuar explorando la presencia de este virus decidimos evaluar el perfil serológico anti-EBV de estos pacientes mediante la cuantificación de 4 anticuerpos en plasma: anti-VCA-IgM, anti-VCA-IgG, anti-EBNA-1-IgG y anti-EA-IgG.

Con respecto a la seropositividad (ver ilustración 15) encontramos que el 90% de las muestras provenientes de pacientes con hepatitis crónica fueron positivos a anti-VCAG, sin embargo, de estos solo aquellos con diagnóstico de HAI mostraron una diferencia significativa con los controles sanos evaluado por una prueba Chi-cuadrada ($p=0.006$). Por el contrario, el porcentaje de pacientes positivos a anti-VCAM fue casi nulo (0%-10%) en todos los grupos de estudio. Para la seropositividad a anti-EBNA-1 y anti-EA se observó una diferencia significativa entre los pacientes diagnosticados con HAI en relación con el resto de los grupos de estudio. Por otro lado, para tres de los anticuerpos (anti-VCAG, anti-EBNA-1 y anti-EA) se obtuvo una medición cuantitativa con la que se comparó el valor absoluto por grupo de estudio (ver tabla 11 e ilustración 16). Aunque no se observó diferencia significativa para anti-EBNA-1 y anti-EA, si se observó un valor promedio menor en los controles sanos. Por el contrario, el valor de anti-VCAG fue superior en pacientes con HAI con respecto a los otros tres grupos diagnóstico, con una significancia estadística evaluada por Kruskal-Wallis ($p=0.001$, 0.003 y 0.007 , para HCI, HCD y VSP respectivamente).

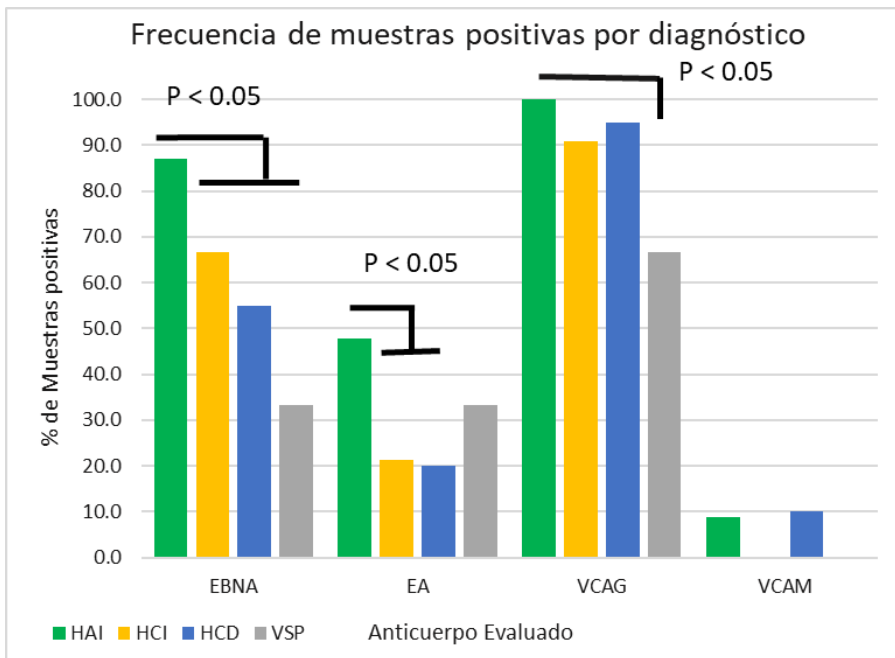


Ilustración 15: Frecuencia de muestras positivas por diagnóstico.

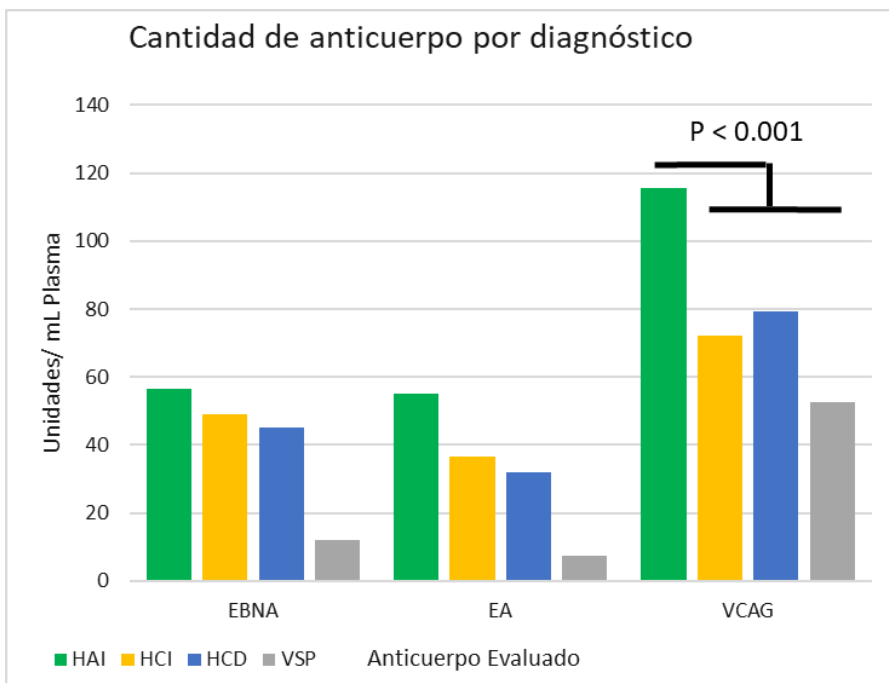


Ilustración 16: Concentración de cada anticuerpo detectado por diagnóstico.

Tabla 5: Resumen de los resultados obtenidos para anticuerpos contra EBV.

Diagnóstico	Variable	α -EBNA-1	α -EA	α -VCAG
HAI	Promedio	56	55	116
	SD	43	109	30
	Mediana	38	9	114
N=23	Positivos	87	47.8	100
HCI	Promedio	49	37	72
	SD	38	121	36
	Mediana	51	6	70
N=33	Positivos	66.7	21.2	90.9
HCD	Promedio	45	32	79
	SD	45	121	32
	Mediana	45	3	77
N=20	Positivos	55	20	95
VSP	Promedio	29	16	43
	SD	32	18	35
	Mediana	12	7	53
N=7	Positivos	33.3	33.3	66.7

Objetivo particular 3:

Análisis estadístico de la infección por los herpesvirus con el diagnóstico de hepatitis crónica (con o sin marcadores de autoinmunidad) y algunos marcadores de daño hepático y auto-anticuerpos.

Correlación entre daño hepático y CV de EBV en plasma

Se buscó evaluar la posible relación de las cargas virales obtenidas con marcadores clásicos de daño hepático, en particular las enzimas ALT y AST. Estos marcadores son cuantificados previo a cada consulta por el laboratorio central del hospital, por lo que los datos fueron recopilados de los expedientes clínicos de cada paciente. Para el análisis de carga viral se tomaron únicamente los datos de EBV en plasma para los tres grupos diagnóstico (ver tabla 12), debido a que el resto de los tejidos y virus fueron mayoritariamente negativos, tal que no sería lógico aplicar una prueba estadística en estos casos.

Tabla 6: Resumen de coeficientes de correlación de Spearman entre CV de EBV en plasma y ALT/AST.

Dx.	N	ALT		AST	
		R	p	R	p
HAI	23	0.0500	0.8207	0.0883	0.6886
HCD	20	0.0632	0.7912	0.0361	0.8798
HCI	33	0.0063	0.9722	0.0173	0.9239

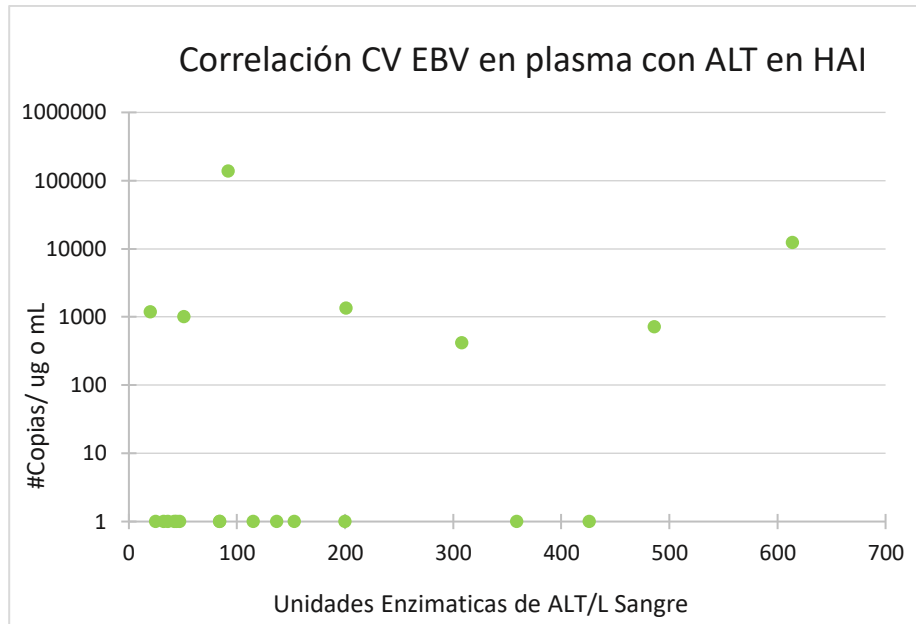


Ilustración 17: Correlación entre CV en plasma y ALT en sangre de pacientes con HAI. $R=0.050$

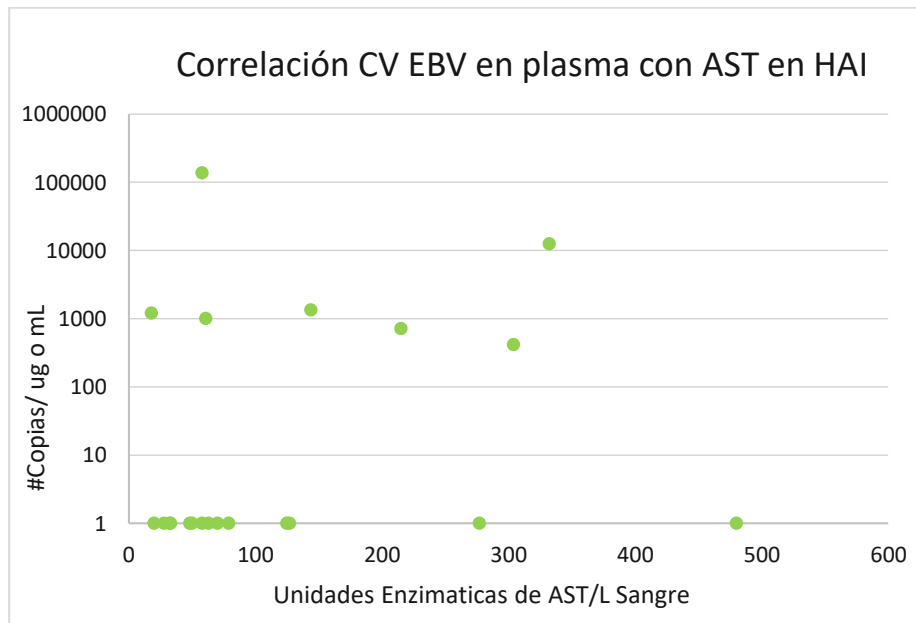


Ilustración 18: Correlación entre CV en plasma y AST en sangre de pacientes con HAI. $R=0.088$

En la cohorte de pacientes evaluada por el estudio no se identificó una correlación entre el número de copias virales para EBV y los marcadores de daño hepático (ALT/AST) en ninguno de los grupos diagnóstico (ver tabla 12 e ilustraciones 17 y 18) así como, para ninguno de los virus estudiados.

Correlación entre daño hepático y serología anti-EBV

También se buscó evaluar la posible relación de la respuesta anti-EBV con marcadores clásicos de daño hepático (ALT y AST) al tener un mayor porcentaje de muestras positivas para todos los diagnósticos y anticuerpos evaluados. Se identificó una correlación significativa entre la serología anti-EBV y los marcadores de daño hepático (ALT/AST) exclusivamente para pacientes con HAI (ver tabla 13). En las ilustraciones 19 y 20 se pueden observar las correlaciones anti-VCAG/ALT y anti-EA/ALT respectivamente, en pacientes con HAI.

Tabla 7: Resumen de coeficientes de correlación de Spearman entre los anticuerpos anti-EBV en plasma y ALT/AST.

Anticuerpo y Dx.		N+	ALT		AST	
			R	p	R	p
VCAG	HAI	23	0.5052	0.0139	0.5037	0.0143
	HCI	33	0.1456	0.4188	0.14	0.4371
	HCD	20	0.4365	0.0543	0.4237	0.0627
EBNA-1	HAI	23	0.1113	0.6132	0.1392	0.5254
	HCI	33	0.2236	0.211	0.2724	0.1251
	HCD	20	0.2211	0.3489	0.1959	0.4093
EA	HAI	23	0.6691	0.0005	0.4776	0.0221
	HCI	33	0.1212	0.5017	0.0831	0.6457
	HCD	20	0.1783	0.452	0.2353	0.318

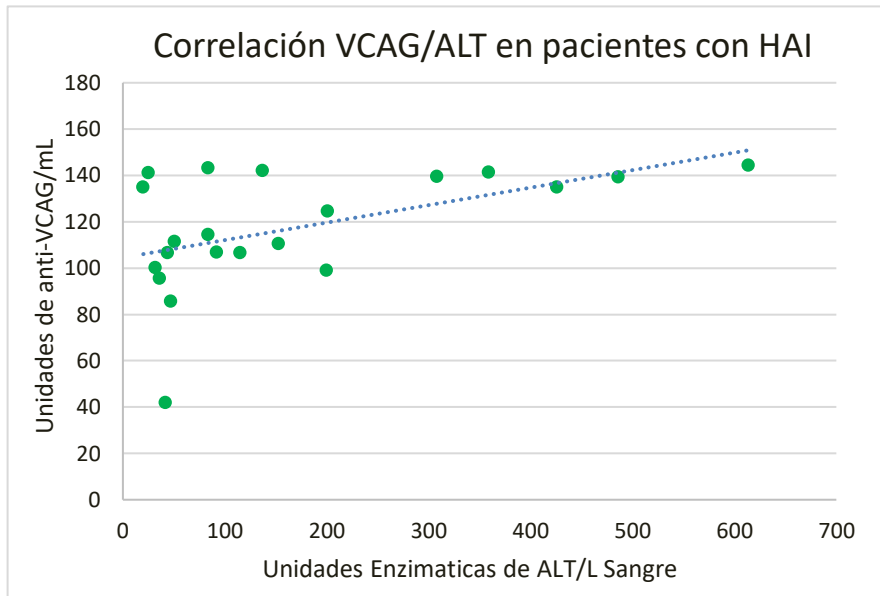


Ilustración 19: Correlación entre unidades/ml de anti-VCAG en plasma y ALT en sangre de pacientes con HAI. $R=0.505$ $p=0.01$

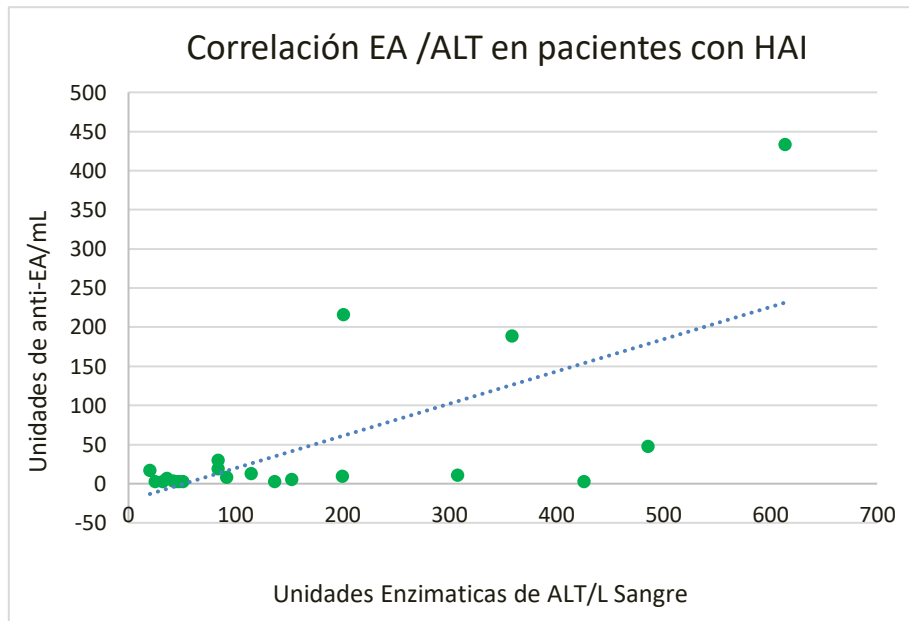


Ilustración 20: Correlación entre unidades/ml de anti-EA en plasma y ALT en sangre de pacientes con HAI. $R=0.669$ $p=0.0005$

Correlación entre la serología anti-EBV y el título de los ANAs

Como último análisis se decidió explorar la relación entre la serología anti-EBV y el título detectado de ANAs (ver tabla 14), otra prueba bioquímica realizada en el laboratorio central del hospital. Es importante enfatizar que, a diferencia del perfil hepático, los ANAs no son medidos consistentemente, por lo que no se adquirieron datos de todos los pacientes, reduciendo la N para este análisis. Se identificó una correlación negativa entre anti-VCAG y los anticuerpos antinucleares (ver ilustración 21) y una correlación positiva entre anti-EBNA-1 y los anticuerpos antinucleares, en pacientes con HAI (ver ilustración 22) así como, una correlación positiva entre anti-EBNA-1 y los anticuerpos antinucleares en pacientes con HCI (ver ilustración 23).

Tabla 8: Resumen de coeficientes de correlación de Spearman entre los anticuerpos anti-EBV en plasma y los anticuerpos antinucleares (ANAs).

Diagnóstico y Anticuerpo		ANAs	
		R	p
HAI N=13	VCAG	0.6796	0.005
	EBNA-1	0.5624	0.045
	EA	0.4555	0.117
HCI N=13	VCAG	0.3684	0.215
	EBNA-1	0.6043	0.028
	EA	0.3028	0.3145
HCD N=5	VCAG	0.3183	0.6013
	EBNA-1	0.5345	0.3534
	EA	0.7564	0.1389

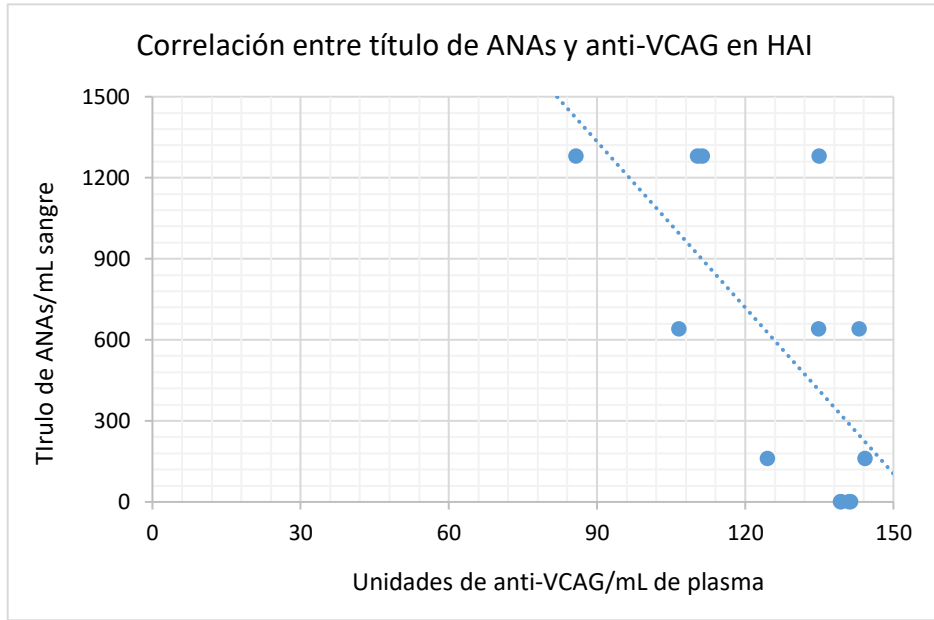


Ilustración 21: Correlación entre unidades de anti-VCAG en plasma y ANAs en pacientes con HAI. $R=0.679$ $p=0.005$

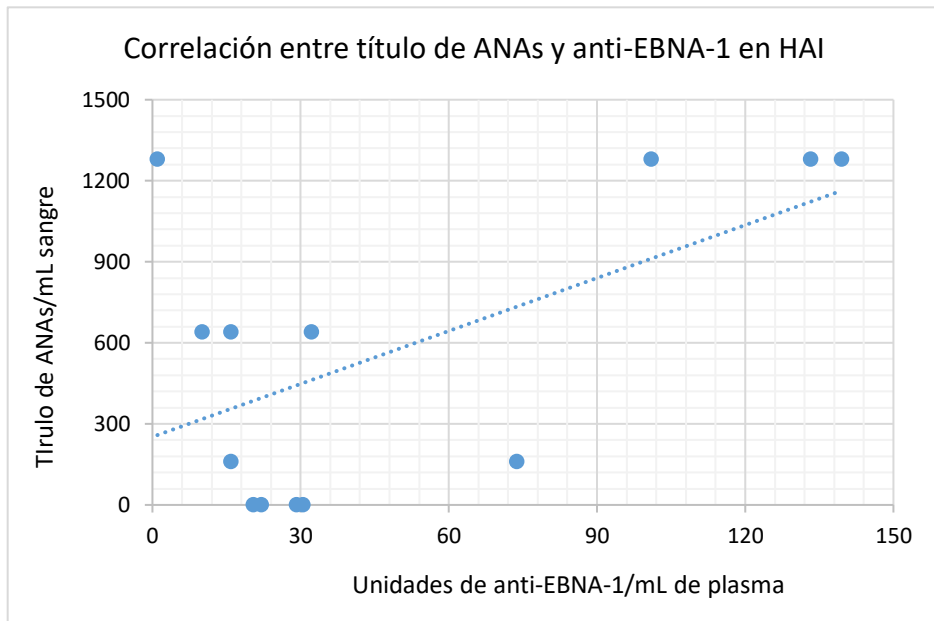


Ilustración 22: Correlación entre unidades de anti-EBNA-1 en plasma y ANAs en pacientes con HAI. $R=0.562$ $p=0.045$

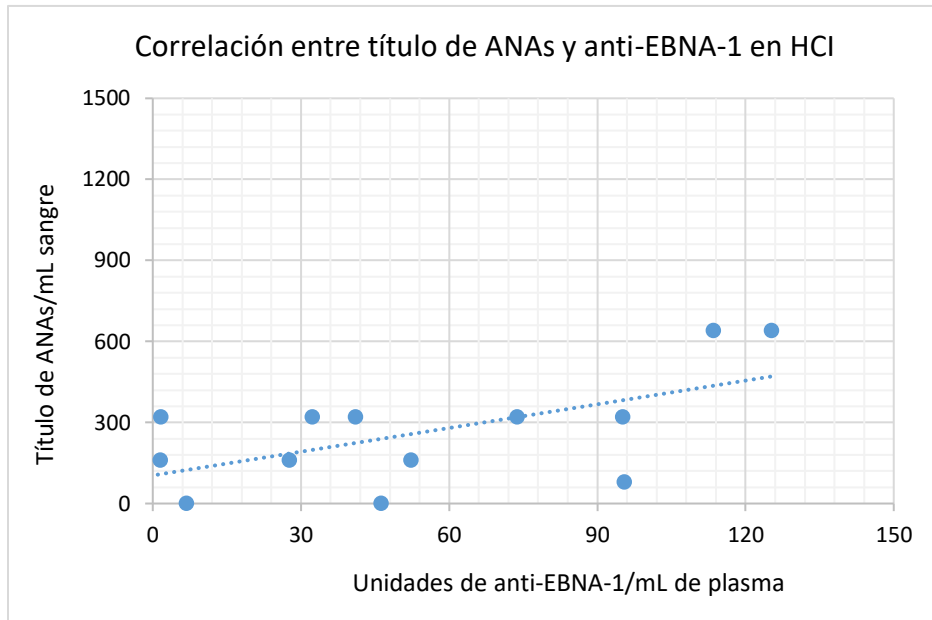


Ilustración 23: Correlación entre unidades de anti-EBNA-1 en plasma y ANAs en pacientes con HCl. $R=0.604$ $p=0.028$

Discusión:

Como se mencionó anteriormente, tanto KSV como HCMV no fueron detectados en ninguno de los pacientes evaluados durante el estudio. Del primero, es un resultado lógico si se considera su distribución global, siendo de los herpesvirus el más confinado a una región geográfica específica con pocos casos reportados en otras áreas (Minhas V & Wood C, 2014), de igual manera su transmisión requiere de contacto sexual o sanguíneo, que no se espera en pacientes pediátricos. Asimismo, un estudio previo en población pediátrica mexicana encontró un resultado similar indicando que este virus no parece tener una presencia significativa en nuestro país (Sánchez Y y col., 2018).

Por el contrario, HCMV es un virus que se encuentra en población pediátrica (Manicklal S y col., 2013) asociado con algunos ejemplos de hepatitis (Min CY y col., 2017), y particularmente en trasplante de hígado donde su reactivación, como consecuencia de la inmunosupresión farmacológica, es una complicación grave (Azevedo LS y col., 2015). Por un lado la ausencia de detección de copias virales de HCMV en plasma, leucocitos y tejido hepático, no descarta que estos pacientes sean positivos al virus, únicamente que a diferencia de EBV, HHV6 y HHV7, HCMV no está siendo reactivado en condiciones de hepatitis, esta observación puede ser una característica propia del virus para resistir las señales inespecíficas de estrés o inflamación de las hepatitis crónicas o que la señal responsable de activar los otros herpesvirus no tenga un efecto sobre HCMV y por tanto no induzca su reactivación.

De particular interés es la detección de copias virales de HHV6 en tejido hepático de pacientes con distintos diagnósticos de hepatitis (ver tabla 8, ilustración 11). Aunque previamente se ha propuesto que HHV6 puede residir en diversos órganos en función de un tropismo mas amplio sin consecuencias clínicas (Ishikawa K y col., 2002), y se ha crecido al virus

en líneas celulares derivadas de tejido hepático (Cermelli C y col., 1996), al no tener tejidos control no es posible determinar si las copias virales detectadas provienen de una proliferación latente exclusiva de hígado, ya que no se observan en sangre periférica, o representa un valor fisiológico en personas sanas. Estudios previos han identificado al virus en tejido hepático de pacientes pediátricos con hepatitis por PCR y específicamente en hepatocitos de pacientes post trasplante de hígado, por *hibridación in situ* (Ozaki Y y col., 2001). Un estudio similar en pacientes con hepatitis idiopática post trasplante encontró cargas virales de HHV6 en 10 de 26 biopsias hepáticas (38.5%) con un promedio de 1150 copias/ug de DNA (Buyse S y col., 2013). Este dato corrobora lo encontrado en este estudio, sugiriendo que estas cargas virales están asociadas a un proceso patológico en hígado independientemente de su origen. Asimismo, los autores identifican que pacientes con más de 1600 copias/ug de DNA se caracterizan por presentar necrosis periportal; mientras que pacientes por debajo del punto de corte presentan actividad lobular con ligero o moderado infiltrado portal (Buyse S y col., 2013). Buscar estas características histológicas, así como determinar la presencia del virus mediante hibridación *in situ* en pacientes con detecciones positivas de HHV6, así como de los otros virus evaluados, representa una oportunidad para estudios posteriores.

El virus de Epstein Barr se ha detectado en varios reportes de falla hepática y hepatitis idiopática, tanto pediátrica como adulta en lo que se determina como hepatitis primaria por EBV, sin embargo, estos reportes se limitan a pacientes aislados, usando técnicas cualitativas. Por ello, la detección de copias virales de EBV en plasma en la mitad de estos pacientes, pero no en voluntarios sanos sugiere una reactivación específica en la patología hepática (ver tabla 7). Otras patologías asociadas con EBV se caracterizan por una proliferación de linfocitos B infectados, es decir a través de ciclo latente, donde se expresan los

oncogenes virales que inducen su sobrevida. Por otro lado, en este estudio se identificaron cargas virales principalmente en plasma que se asocian con un ciclo lítico, es importante remarcar que los genomas virales que detectamos pueden no ser todos, partículas virales infectivas, una cierta proporción, podrían ser genomas o fragmentos liberados durante la muerte de células por ciclo lítico o por citotoxicidad. Para confirmar que las copias virales detectadas son partículas infectivas sería necesario aplicar un tratamiento con DNAsa para eliminar las copias virales no encapsuladas y para confirmar el origen de las copias virales (por reactivación lítica) se podría determinar el bajo nivel de metilación de ZTA, por ejemplo, por tratamiento con bisulfito y amplificación por PCR, ya que únicamente los genomas virales que vienen de fase latente tendrían ZTA metilado (Lam WK y col., 2019). Un ciclo lítico sostenido puede ser un fuerte inductor de inflamación dentro del huésped infectado en pacientes con un número de copias virales arriba de los miles por mL de plasma. En el Departamento de Trasplantes del Hospital Infantil de México, en trasplante de órgano sólido, más de 2000 copias/mL de plasma se considera un factor de riesgo para el rechazo y el establecimiento de una enfermedad linfoproliferativa, a consecuencia de la expansión de alguno o varios Herpesvirus (Sánchez Y y col., 2018; Franceschini E y col., 2017; Allen U y col., 2002). Un estudio identifico como relevantes en el contexto clínico 2000 copias de EBV por millón de PBMC's o 160 copias por microgramo de DNA en sangre o 700 copias por mililitro de plasma, para mononucleosis infecciosa; y 1000-5000 copias de EBV por cada millón de PBMC's o 5000 copias por microgramo de DNA en enfermedad linfoproliferativa post-transplante (Kimura H y col., 1999) Otro estudio determinó que 12,600 copias por microgramo de DNA para CAEBV era un valor de relevancia clínica (Kanakry JA y col., 2016). Qué efecto podría tener una carga viral de esta magnitud en hepatopatías no es claro. Al tratar de establecer una correlación entre las copias virales de EBV en

plasma y los dos marcadores de daño hepático clásicos (ALT/AST) no se encontró una relación clara (ver tabla 12), sugiriendo que la reactivación viral pudiera ser una consecuencia de la hepatitis y no su causa, sin embargo, también es posible que las copias virales en sangre periférica no sean el marcador sistémico adecuado para entender el grado de reactivación viral local. En el hígado, la presencia de linfocitos infectados por EBV induce una respuesta inmune caracterizada por linfocitos T citotóxicos, que además de eliminar a las células infectadas podrían eliminar también a los hepatocitos, como daño colateral o “Bystander Effect” (Bolis V y col., 2016).

Una forma de relacionar la reactivación del virus con el daño hepático (medido por la escala METAVIR o ISHAK) sería buscar al virus directamente en hígado (por hibridación *in situ*), utilizando las biopsias hepáticas que se toman esporádicamente para establecer los diagnósticos. Por desgracia el número recolectado fue limitado para todos los diagnósticos particularmente HAI y HCD, además de que no se cuenta con biopsias de voluntarios sanos, por lo que la población evaluada en tejido hepático se redujo considerablemente, no permitió concluir satisfactoriamente y nos dio una visión limitada del contexto viral. Por otro lado, se detectó un número mínimo de copias virales de EBV en una sexta parte de las biopsias evaluadas (ver tabla 7). Al no correlacionar las copias virales detectadas en plasma con las detectadas en hígado se puede concluir que el origen de la reactivación viral pudiera no ser el hígado, no obstante que EBV no está reportado como un virus hepatotrópico (Negro F, 2006) y por tanto, su detección aun en números bajos, representa una observación interesante, ya sea que esté presente en las células que forman parte de infiltrado inmune o infectando directamente a los hepatocitos (que son células epiteliales especializadas). Esta es una pregunta para responder en estudios posteriores. Al mismo tiempo las biopsias hepáticas son ínfimas y la presencia del virus puede

no ser homogénea en todo el órgano, por esto, sin muestras de diversas regiones es difícil concluir la ausencia y expansión del virus en este órgano, así como la importancia clínica que pueda tener. Cabe mencionar que la infección directa de los hepatocitos produciría la exposición de antígenos propios intracelulares que regularmente están ocultos del sistema inmune, y que, en el contexto de inflamación crónica, podrían estimular a los linfocitos B, que a su vez producirían anticuerpos autorreactivos, dando lugar a la autoinmunidad como se observa en diversas enfermedades autoinmunes asociadas con los herpesvirus (Kimura y col., 2001).

Como marcador sistémico de la presencia de EBV se cuantificaron 4 de los anticuerpos dirigidos contra el virus. Es importante enfatizar que la cuantificación de estos anticuerpos no está estandarizada a nivel internacional, existiendo diversas metodologías y productos con sus propios valores subjetivos, por lo que la cantidad no es comparable entre estudios sin un estándar internacional que facilite la validación de un factor de conversión, mientras que la positividad, al estar basada en estudios clínicos es homogénea y fácil de comparar. Anti-VCAM es un marcador de primoinfección presente únicamente durante los primeros meses posteriores al contacto con el virus; anti-VCAG se comienza a producir 1-3 semanas después de la infección con EBV y permanece detectable durante toda la vida del paciente, por lo que se utiliza como estándar de oro para determinar la seroprevalencia del virus. Anti-EBNA-1 aparece 4-6 meses después en cantidades y positividad variables, pero usualmente menores a VCAG. Finalmente, anti-EA, únicamente es positivo durante periodos de reactivación lítica del virus, detectándose de manera intermitente a lo largo de la vida del paciente (De Paschale M, 2012). Concretamente en este estudio se detectó el anticuerpo anti-VCAG en cerca del 100% de los pacientes y por el contrario los anti-VCAM en cerca del 10%, indicando que practicante toda nuestra población ya había

sido expuesta previamente al virus. Conviene subrayar que la frecuencia de positividad de anti-VCAG fue muy similar en los pacientes con enfermedad hepática, independiente de su diagnóstico, mientras que para los voluntarios sanos fue cerca de 66%. Al no existir diferencias de edad importantes entre estos grupos, este resultado sugiere una relación entre el contacto con EBV y la enfermedad hepática, sin embargo el número reducido de pacientes en el grupo control impide concluir satisfactoriamente (lo que se refleja en los valores de p), asimismo no es suficiente para establecerlo como una agente detonante o exacerbante de la hepatitis, ya que es necesario explorar la temporalidad que existe entre la infección con el virus y el inicio de la hepatitis para tener una evidencia sólida. Al mismo tiempo la detección de anti-EA con mayor frecuencia y cantidad en HAI (ver tabla 11), apoya la hipótesis propuesta con los resultados de carga viral de una reactivación lítica en pacientes con HAI. Con los datos generados en este trabajo, se buscó establecer una relación con los marcadores de daño hepático, resultando en dos correlaciones de Spearman significativas entre anti-VCAG y anti-EA con ALT/AST exclusivamente para HAI (ver tabla 13). En las gráficas correspondientes podemos observar que es necesario llegar a más de 100 unidades de anti-VCAG para que éste se correlacione con un aumento de enzimas hepáticas en sangre, que hace sentido con lo establecido en la literatura, donde encontramos que el anticuerpo es detectable constantemente, pero aumenta su título en respuesta a periodos de reactivación lítica (De Paschale M, 2012). Por otro lado anti-EA tiene una correlación con ALT/AST en cualquier cantidad, de nuevo acorde a la literatura donde únicamente es positivo en periodos de reactivación viral (De Paschale M, 2012). Llama la atención que, aunque podemos detectar cargas virales similares en todos los pacientes con hepatitis, únicamente se observa una producción de anti-EA y una mayor cantidad de anti-VCAG en aquellos con características de autoinmunidad (ilustración 16). Estudios previos

han ligado a EBV con el desarrollo de reactividad cruzada, como parte de su asociación con enfermedades autoinmunes como Lupus eritematoso sistémico (Harley JB y col., 2018; Yadav P y col., 2011). Determinar el posible papel de anti-EA, anti-EBNA-1 o anti-VCAG para detonar o estimular una respuesta autoinmune permanece un objetivo para estudios posteriores.

El sistema inmune produce autoanticuerpos como LMK1 (anti-hígado/riñón) que reconocen a EBNA-1, pero por mimetismo molecular, estos anticuerpos también reconocen a la proteína CYP2D6 que se expresa en la membrana celular de los hepatocitos, causando daño a los hepatocitos (Rigopoulou EI y col., 2012). Con esto en mente, evaluamos la correlación entre la serología anti-EBV y el autoanticuerpo más común en pacientes con hepatitis autoinmune, los anticuerpos antinucleares (ANAs) encontrando nuevamente que, anti-VCAG y en este caso, anti-EBNA-1 mostraban una relación significativa con los anticuerpos antinucleares en los pacientes con HAI (ver tabla 14). Por un lado, el resultado observado con anti-EBNA-1 corresponde con lo esperado de acuerdo a la literatura y puede indicar que la respuesta contra EBV está relacionada con el desarrollo o el mantenimiento de las características de autoinmunidad presentes en estos pacientes, y que posiblemente se establezcan en un futuro para pacientes con hepatitis idiopática (Yadav P y col., 2011) sin embargo, es necesario mencionar que los anticuerpos antinucleares no correlacionan perfectamente con el progreso o severidad de la hepatitis autoinmune, por lo que es necesario continuar estudiando que relación pueda existir entre EBV y HAI (Soto ME y col., 2015). En ambos casos esta evidencia tampoco es suficiente para establecerlo como un detonante o exacerbante de la hepatitis, ya que sin tener una temporalidad establecida es igualmente posible que la respuesta contra EBV sea consecuencia o incluso algo independiente de la autoinmunidad. Al tratarse un virus ubicuo no existe una relación clásica entre patógeno

y enfermedad (Criterios de Robert Koch) haciendo más complejo establecer una asociación, en adición la hepatitis autoinmune es una entidad clínica compleja de diagnosticar debido a la falta de características patognomónicas, una evolución que continuamente cambia el puntaje de los criterios para su caracterización y la posibilidad de que el tratamiento no sea efectivo, poniendo en duda el diagnóstico. Es necesario un estudio de mayor duración y posiblemente con pacientes más jóvenes donde se pueda dar un seguimiento desde el contacto con el virus hasta el desarrollo de autoinmunidad para establecerlo como un agente causal de la enfermedad. En un análisis preliminar realizado sobre la misma cohorte de pacientes, se buscó determinar si la detección de cargas virales de EBV en plasma antecede o coincide con la elevación de aminotransferasas, como evidencia de una relación temporal entre el virus y el daño hepático, pero de 10 pacientes con HAI y 13 pacientes con HCI o HCD analizados, solo se encontró esta asociación en un paciente con HAI y en dos pacientes con HCI. Esto sugiere que el virus de Epstein Barr pudiera no ser un detonante del daño hepático, siendo sólo un pasajero en el transcurso de la enfermedad o bien, que otra variable no explorada relacione al virus con la hepatitis y/o la autoinmunidad (De la Cruz, M. Reporte de SS, 2019). Por otro lado, la correlación inversa de anti-VCAG con los anticuerpos antinucleares (ANAs), no correlaciona con lo esperado de acuerdo con la literatura, donde la serología de EBV se asocia positivamente con LES y EM y es incluso contrario al resto de los resultados encontrados en la cohorte de pacientes (Harley JB y col., 2018). Esto quizás podría explicarse por la heterogeneidad de los anticuerpos antinucleares que pueden estar dirigidos contra diversos componentes nucleares y citoplasmáticos, y se consideran de acuerdo a los patrones (de membrana celular, nucleoplasmático, nucleolar, de huso mitótico, citoplásmico, homogéneo, moteado fino, grueso, granular, etc) que se observan en la detección de ANAs en células HEp-2 mediante

inmunofluorescencia indirecta. Los ANAs aparecen en muchas condiciones patológicas y no son específicos de HAI. Aparecen con mayor frecuencia en las enfermedades reumáticas sistémicas, por consiguiente, su determinación es una importante ayuda para el diagnóstico diferencial. Así, por ejemplo, los anticuerpos SS-A (Ro) y SS-B (La) se asocian con el Lupus eritematoso sistémico (LES) y el síndrome de Sjögren (SS), y los anticuerpos anti-dsDNA y anti-Sm, contra las histonas y contra los nucleosomas se relacionan con LES. Los anticuerpos anti-RNP se asocian con las enfermedades mixtas del tejido conectivo y LES, los anticuerpos anti-Scl-70 con la esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva), y los anticuerpos anti-Jo-1 con la polimiositis y la dermatomiositis (Lightfoote MM y col., 2006).

Conclusiones:

Se detectó la presencia de copias virales de EBV, HHV6 y HHV7 en pacientes con hepatitis, observando mayor carga viral para EBV en plasma con respecto a leucocitos y biopsia hepática. Se detectó mayor frecuencia y cantidad de anti-VCAG en pacientes con hepatitis autoinmune con respecto a las hepatitis no autoinmunes y los controles sanos; los anticuerpos anti-EBV correlacionaron con las enzimas ALT/AST y los anticuerpos antinucleares. Los datos experimentales y los recopilados de los expedientes clínicos se incorporaron a una base de datos, para su uso en estudios posteriores. En conclusión, se confirmó la presencia de EBV en pacientes con hepatitis autoinmune, así como su relación con el daño hepático. Sin embargo se requieren más estudios para definir la posible relación de este patógeno con HAI.

Referencias Bibliográficas:

- Abate, F., Ambrosio, M. R., Mundo, L., Laginestra, M. A., Fuligni, F., Rossi, M., Zairis, S., Gazaneo, S., De Falco, G., Lazzi, S., Bellan, C., Rocca, B. J., Amato, T., Marasco, E., Etebari, M., Ogwang, M., Calbi, V., Ndede, I., Patel, K., ... Rabadan, R. (2015). Distinct Viral and Mutational Spectrum of Endemic Burkitt Lymphoma. *PLoS Pathogens*, *11*(10), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005158>
- Ablashi, D. V., Handy, M., Bernbaum, J., Chatlynne, L. G., Lapps, W., Kramarsky, B., Berneman, Z. N., Komaroff, A. L., & Whitman, J. E. (1998). Propagation and characterization of human herpesvirus-7 (HHV-7) isolates in a continuous T-lymphoblastoid cell line (SupT1). *Journal of Virological Methods*, *73*(2), 123–140. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(98\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00037-8)
- Ackermann, M. (2006). Pathogenesis of Gammaherpesvirus Infections. *Veterinary Microbiology*, *113*(3–4), 211–222. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16332416/>
- Allen, U., Alfieri, C., Preiksaitis, J., Humar, A., Moore, D., Tapiero, B., Tellier, R., Green, M., Davies, D., Hébert, D., Weitzman, S., Petric, M., Jacobson, K., Acott, P., Arbus, G., Arnold, S., Atkinson, P., Cheung, R., Cockfield, S., ... Wolff, J. L. (2002). Epstein-Barr virus infection in transplant recipients: Summary of a workshop on surveillance, prevention and treatment. *Canadian Journal of Infectious Diseases*, *13*(2), 89–99. <https://doi.org/10.1155/2002/634318>
- Alvarado-Esquivel, C., Hernández-Tinoco, J., Sánchez-Anguiano, L. F., Ramos-Nevárez, A., Cerrillo-Soto, S. M., Estrada-Martínez, S., Martínez-Ramírez, L., Pérez-álamos, A. R., & Guido-Arreola, C. A. (2014). Seroepidemiology of cytomegalovirus infection in pregnant women in Durango City, Mexico. *BMC Infectious Diseases*, *14*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-484>
- Aruna, D. R., Pushpalatha, G., Galgali, S., & Prashanthi. (2011). Langerhans cell histiocytosis. *Journal of Indian Society of Periodontology*, *15*(3), 276–279. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.85675>
- Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J., & Kamath, P. S. (2019). Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology*, *70*(1), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>
- Avolio-Hunter, T. M. Lewis P.N. & Frappier L. (2001). Epstein-Barr nuclear antigen 1 binds and destabilizes nucleosomes at the viral origin of latent DNA replication. *Nucleic Acids Research*, *29*(17), 3520–3528. <https://doi.org/10.1093/nar/29.17.3520>

- Azevedo, L. S., Pierrotti, L. C., Abdala, E., Costa, S. F., Strabelli, T. M. V., Campos, S. V., Ramos, J. F., Latif, A. Z. A., Litvinov, N., Maluf, N. Z., Filho, H. H. C., Pannuti, C. S., Lopes, M. H., dos Santos, V. A., Linardi, C. da C. G., Yasuda, M. A. S., & Marques, H. H. de S. (2015). Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clinics*, *70*(7), 515–523. [https://doi.org/10.6061/clinics/2015\(07\)09](https://doi.org/10.6061/clinics/2015(07)09)
- Banko, A., Lazarevic, I., Stevanovic, G., Cirkovic, A., Karalic, D., Cupic, M., Banko, B., Milovanovic, J., & Jovanovic, T. (2016). Analysis of the variability of Epstein-Barr virus genes in infectious mononucleosis: Investigation of the potential correlation with biochemical parameters of hepatic involvement. *Journal of Medical Biochemistry*, *35*(3), 337–346. <https://doi.org/10.1515/jomb-2015-0021>
- Barton, E. S., White, D. W., Cathelyn, J. S., Brett-McClellan, K. A., Engle, M., Diamond, M. S., Miller, V. L., & Virgin IV, H. W. (2007). Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature*, *447*(7142), 326–329. <https://doi.org/10.1038/nature05762>
- Berrueta, T. U. (2015). *Generalidades de Virus*. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.
- Bioinformatics, S. S. I. of. (n.d.). *Human virus relative size*.
- Bioinformatics, S. S. I. of. (n.d.). *Herpesviridae*. https://viralzone.expasy.org/176?outline=all_by_species
- Black, J. B., & Pellett, P. E. (1999). Human herpesvirus 7. *Reviews in Medical Virology*, *9*(4), 245–262. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1654\(199910/12\)9:4<245::AID-RMV253>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1654(199910/12)9:4<245::AID-RMV253>3.0.CO;2-I)
- Bolis, V., Karadedos, C., Chiotis, I., Chaliasos, N., & Tsabouri, S. (2016). Atypical manifestations of Epstein-Barr virus in children: A diagnostic challenge. *Journal de Pediatria*, *92*(2), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2015.06.007>
- Bonsignore, L., Passelli, K., Pelzer, C., Perroud, M., Konrad, A., Thurau, M., Stürzl, M., Dai, L., Trillo-Tinoco, J., Del Valle, L., Qin, Z., & Thome, M. (2017). A role for MALT1 activity in Kaposi's sarcoma-associated herpes virus latency and growth of primary effusion lymphoma. *Leukemia*, *31*(3), 614–624. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.239>
- Broccolo, F., Fusetti, L., & Ceccherini-Nelli, L. (2013). Possible role of human herpesvirus 6 as a trigger of autoimmune disease. *The Scientific World Journal*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/867389>
- Buyse S, Roque-Afonso AM, Vaghefi P, Gigou M, Dussaix E, Duclos-Vallée JC, Samuel D, Guettier C. Acute hepatitis with periportal confluent necrosis associated with human herpesvirus 6 infection in liver transplant patients. *Am J Clin Pathol*. 2013 Sep;140(3):403-9. doi: 10.1309/AJCP0FWI2XAHECBI. PMID: 23955460.

- Caccuri, F., Ronca, R., Laimbacher, A. S., Berenzi, A., Steimberg, N., Campilongo, F., Mazzuca, P., Giacomini, A., Mazzoleni, G., Benetti, A., Caselli, E., Presta, M., Di Luca, D., Fraefel, C., & Caruso, A. (2017). U94 of human herpesvirus 6 down-modulates Src, promotes a partial mesenchymal-to-epithelial transition and inhibits tumor cell growth, invasion and metastasis. *Oncotarget*, 8(27), 44533–44549. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17817>
- Caldwell, R. G., Wilson, J. B., Anderson, S. J., & Longnecker, R. (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity*, 9(3), 405–411. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80623-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80623-8)
- Caselli, E., D’Accolti, M., Soffritti, I., Zatelli, M. C., Rossi, R., Degli Uberti, E., & Di Luca, D. (2017). HHV-6A in vitro infection of thyrocytes and T cells alters the expression of miRNA associated to autoimmune thyroiditis. *Virology Journal*, 14(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0672-6>
- CDC. (2018). *About Epstein-Barr Virus (EBV)*. CDC. <https://www.cdc.gov/epstein-barr/about-ebv.html>
- Cermelli, C., Concari, M., Carubbi, F., Fabio, G., Sabbatini, A. M. T., Pecorari, M., Pietrosemoli, P., Meacci, M., Guicciardi, E., Carulli, N., & Portolani, M. (1996). Growth of human herpesvirus 6 in HEPG2 cells. *Virus Research*, 45(2), 75–85. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(96\)01364-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(96)01364-0)
- Cesarman E, (2011). Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients, *Cancer Letters*, Volume 305, Issue 2, Pages 163-174, ISSN 0304-3835, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.03.003>.
- Chan, K. C. A., Woo, J. K. S., King, A., Zee, B. C. Y., Lam, W. K. J., Chan, S. L., Chu, S. W. I., Mak, C., Tse, I. O. L., Leung, S. Y. M., Chan, G., Hui, E. P., Ma, B. B. Y., Chiu, R. W. K., Leung, S. F., Van Hasselt, A. C., Chan, A. T. C., & Lo, Y. M. D. (2017). Analysis of plasma Epstein–Barr virus DNA to screen for nasopharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 377(6), 513–522. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1701717>
- Chantal Hulo, Edouard de Castro, Patrick Masson, Lydie Bougueleret, Amos Bairoch, Ioannis Xenarios, Philippe Le Mercier (2011). *ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity*. *Nucleic Acids Res.* Jan;39 (Database issue): D576-82. doi: 10.1093/nar/gkq901.Epub 2010 Oct 14.
- Charnot-Katsikas, A., Baewer, D., Cook, L., & David, M. Z. (2016). Fulminant hepatic failure attributed to infection with human herpesvirus 6 (HHV-6) in an immunocompetent woman: A case report and review of the literature. *Journal of Clinical Virology*, 75, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.12.002>

- Chen, J., Sathiyamoorthy, K., Zhang, X., Schaller, S., Perez White, B. E., Jardetzky, T. S., & Longnecker, R. (2018). Ephrin receptor A2 is a functional entry receptor for Epstein-Barr virus. *Nature Microbiology*, *3*(2), 172–180. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0081-7>
- Chene, A., Donati, D., Orem, J., Mbidde, E. R., Kironde, F., Wahlgren, M., & Bejarano, M. T. (2009). Endemic Burkitt's lymphoma as a polymicrobial disease. New insights on the interaction between Plasmodium falciparum and Epstein-Barr virus. *Seminars in Cancer Biology*, *19*(6), 411–420. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.10.002>
- Cheng, S., Li, Z., He, J., Fu, S., Duan, Y., Zhou, Q., Yan, Y., Liu, X., Liu, L., Feng, C., Zhang, L., He, J., Deng, Y., & Sun, L. Q. (2019). Epstein–Barr virus noncoding RNAs from the extracellular vesicles of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells promote angiogenesis via TLR3/RIG-I-mediated VCAM-1 expression. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1865*(6), 1201–1213. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.01.015>
- Cisneros-Herreros, J. M., & Herrero-Romero, M. (2006). Hepatitis por virus del grupo herpes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *24*(6), 392–398. <https://doi.org/10.1157/13089695>
- Coleman CB, Wohlford EM, Smith NA, King CA, Ritchie JA, Baresel PC, Kimura H, Rochford R. Epstein-Barr virus type 2 latently infects T cells, inducing an atypical activation characterized by expression of lymphotactic cytokines. *J Virol*. 2015 Feb;89(4):2301-12. doi: 10.1128/JVI.03001-14. Epub 2014 Dec 10.
- Cruz-Muñoz, M. E., & Fuentes-Pananá, E. M. (2018). Beta and gamma human herpesviruses: Agonistic and antagonistic interactions with the host immune system. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2521. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02521>
- Czaja, A. J. (1999). Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *Journal of Hepatology*, *30*(3), 394–401. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(99\)80096-8](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(99)80096-8)
- Davison, A. J. (2010). Herpesvirus systematics. *Veterinary Microbiology*, *143*(1), 52–69. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.014>
- De Bolle, L., Naesens, L., & De Clercq, E. (2005). Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clinical Microbiology Reviews*, *18*(1), 217–245. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.1.217-245.2005>
- De la Cruz D., Miriel E. (2019). Papel del virus de Epstein-Barr en la hepatitis autoinmune en pacientes pediátricos.

- De Paschale, M. & Clerici, P. (2012). Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World Journal of Virology*, 1(1), 31. <https://doi.org/10.5501/wjv.v1.i1.31>
- De Re V, Caggiari L, De Zorzi M, et al. Epstein-Barr virus BART microRNAs in EBV-associated Hodgkin lymphoma and gastric cancer. *Infect Agent Cancer*. 2020;15:42. Published 2020 Jun 23. doi:10.1186/s13027-020-00307-6
- Draborg, A. H., Duus, K., & Houen, G. (2013). Epstein-Barr virus in systemic autoimmune diseases. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/535738>
- Drago, F., Broccolo, F., Ciccarese, G., Rebora, A., & Parodi, A. (2015). Persistent pityriasis rosea: An unusual form of pityriasis rosea with persistent active HHV-6 and HHV-7 infection. *Dermatology*, 230(1), 23–26. <https://doi.org/10.1159/000368352>
- Drebber, U., Kasper, H. U., Krupacz, J., Haferkamp, K., Kern, M. A., Steffen, H. M., Quasdorff, M., zur Hausen, A., Odenthal, M., & Dienes, H. P. (2006). The role of Epstein-Barr virus in acute and chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*, 44(5), 879–885. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.02.006>
- Dupont, L., & Reeves, M. B. (2017). Cytomegalovirus latency and reactivation: Recent insights into an age old problem Introduction: the opportunistic pathogen. *Reviews in Medical Virology*, 26(2), 75–89. <https://doi.org/10.1002/rmv.1862>
- Eliassen, E., Lum, E., Pritchett, J., Ongradi, J., Krueger, G., Crawford, J. R., Phan, T. L., Ablashi, D., & Hudnall, S. D. (2018). Human herpesvirus 6 and malignancy: A review. *Frontiers in Oncology*, 8, 512. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00512>
- Ersing, I., Nobre, L., Wang, L. W., Soday, L., Ma, Y., Paulo, J. A., Narita, Y., Ashbaugh, C. W., Jiang, C., Grayson, N. E., Kieff, E., Gygi, S. P., Weekes, M. P., & Gewurz, B. E. (2017). A Temporal Proteomic Map of Epstein-Barr Virus Lytic Replication in B Cells. *Cell Reports*, 19(7), 1479–1493. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.062>
- Ewing, E. (1982). *lung pneumocyte infected by Human Cytomegalovirus*. CDC. <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=858>
- Fagin, U., Nerbas, L., Vogl, B., & Jabs, W. J. (2017). Analysis of BZLF1 mRNA detection in saliva as a marker for active replication of Epstein-Barr virus. *Journal of Virological Methods*, 244, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.02.016>
- Farina, A., Peruzzi, G., Lacconi, V., Lenna, S., Quarta, S., Rosato, E., Vestri, A. R., York, M., Dreyfus, D. H., Faggioni, A., Morrone, S., Trojanowska, M., & Farina, G. A. (2017). Epstein-Barr virus lytic infection promotes activation of Toll-like receptor 8 innate immune response in systemic sclerosis monocytes. *Arthritis Research and Therapy*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1237-9>

- Feld JJ & Heathcote EJ. Epidemiology of autoimmune liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1118–28.
- Fields, B., David, K., & Peter, H. (2013). *Virology* (W. K. H. W. & Wilkins (ed.); 6th Edition).
- Franceschini, E., Plessi, J., Zona, S., Santoro, A., Digaetano, M., Fontana, F., Alfano, G., Guaraldi, G., Comoli, P., Facchini, F., Potenza, L., Gennari, W., Codeluppi, M., Luppi, M., Cappelli, G., Gyssens, I. C., & Mussini, C. (2017). Clinical Utility of Epstein-Barr Virus Viral Load Monitoring and Risk Factors for Posttransplant Lymphoproliferative Disorders After Kidney Transplantation. *Transplantation Direct*, 3(7), e182. <https://doi.org/10.1097/txd.0000000000000703>
- Fujinami, R. S., Nelson, J. A., Walker, L., & Oldstone, M. B. (1988). Sequence homology and immunologic cross-reactivity of human cytomegalovirus with HLA-DR beta chain: a means for graft rejection and immunosuppression. *Journal of Virology*, 62(1), 100–105. <https://doi.org/10.1128/jvi.62.1.100-105.1988>
- García Martín Manuel & Zurita Molina Amado, Transaminasas: Valoración y significación clínica, Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNP-AEP, 2012, paginas 267-275. <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/transaminasas.pdf>
- George, M. (2014). Hemophagocytic lymphohistiocytosis: review of etiologies and management. *Journal of Blood Medicine*, 5:69-86. <https://doi.org/10.2147/jbm.s46255>
- Gregorio, G. V., Portmann, B., Reid, F., Donaldson, P. T., Doherty, D. G., McCartney, M., Mowat, A. P., Vergani, D., & Mieli-Vergani, G. (1997). Autoimmune hepatitis in childhood: A 20-year experience. *Hepatology*, 25(3), 541–547. <https://doi.org/10.1002/hep.510250308>
- Hammerschmidt, W. (2015). The Epigenetic Life Cycle of Epstein–Barr Virus Wolfgang. In *Epstein Barr Virus - Volume 2* (Vol. 391). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1>
- Hara, S., Hoshino, Y., Naitou, T., Nagano, K., Iwai, M., Suzuki, K., Yamamoto, K., Nagasaka, T., Morishima, T., & Kimura, H. (2006). Association of virus infected-T cell in severe hepatitis caused by primary Epstein-Barr virus infection. *Journal of Clinical Virology*, 35(3), 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.07.009>
- Harley, J. B., Chen, X., Pujato, M., Miller, D., Maddox, A., Forney, C., Magnusen, A. F., Lynch, A., Chetal, K., Yukawa, M., Barski, A., Salomonis, N., Kaufman, K. M., Kottyan, L. C., & Weirauch, M. T. (2018). Transcription factors operate across disease loci, with EBNA-2 implicated in autoimmunity. *Nature Genetics*, 50(5), 699–707. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0102-3>

- Hennes, E. M., Zeniya, M., Czaja, A. J., Parés, A., Dalekos, G. N., Krawitt, E. L., Bittencourt, P. L., Porta, G., Boberg, K. M., Hofer, H., Bianchi, F. B., Shibata, M., Schramm, C., De Torres, B. E., Galle, P. R., McFarlane, I., Dienes, H. P., & Lohse, A. W. (2008). Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology*, *48*(1), 169–176. <https://doi.org/10.1002/hep.22322>
- Domingo E., Parrish C.R. & Holland J.J. (2008). *Origin and Evolution of Viruses* (2nd ed.). Academic Press. Hardcover ISBN 978-0-12-374153-0. Ebook ISBN 9780080564968 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374153-0.X0001-X>
- ICTV. (n.d.). *ICTV Master Species List 2019 v1*. <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/9601>
- International Agency for Research on Cancer. (2002). International Agency for Research on Cancer IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks To Humans. *IARC Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans*, *96*, i-ix+1-390. <https://doi.org/10.1002/food.19940380335>
- Ishikawa K, Hasegawa K, Naritomi T, ~~et al.~~ (2002). Prevalence of herpesviridae and hepatitis virus sequences in the livers of patients with fulminant hepatitis of unknown etiology in Japan. *J Gastroenterol.* *37*:523 -530.
- Izawa, K., Martin, E., Soudais, C., Bruneau, J., Boutboul, D., Rodriguez, R., Lenoir, C., Hislop, A. D., Besson, C., Touzot, F., Picard, C., Callebaut, I., de Villartay, J. P., Moshous, D., Fischer, A., & Latour, S. (2017). Inherited CD70 deficiency in humans reveals a critical role for the CD70-CD27 pathway in immunity to Epstein-Barr virus infection. *Journal of Experimental Medicine*, *214*(1), 73–89. <https://doi.org/10.1084/jem.20160784>
- Jiang, S., Zhou, H., Liang, J., Gerdt, C., Wang, C., Ke, L., Schmidt, S. C. S., Narita, Y., Ma, Y., Wang, S., Colson, T., Gewurz, B., Li, G., Kieff, E., & Zhao, B. (2017). The Epstein-Barr Virus Regulome in Lymphoblastoid Cells. *Cell Host and Microbe*, *22*(4), 561-573.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.09.001>
- Johnson, D. C., & Baines, J. D. (2011). Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(5), 382–394. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2559>
- Kanakry, J. A., Hegde, A. M., Durand, C. M., Massie, A. B., Greer, A. E., Ambinder, R. F., & Valsamakis, A. (2016). The clinical significance of EBV DNA in the plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with or without EBV diseases. *Blood*, *127*(16), 2007–2017. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-672030>
- Keyes, L. R., Hargett, D., Soland, M., Bego, M. G., Rossetto, C. C., Almeida-Porada, G., & St. Jeor, S. (2012). HCMV Protein LUNA Is Required for Viral Reactivation from Latently Infected Primary CD14+ Cells. *PLoS ONE*, *7*(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052827>

- Kim, J. H., Kim, W. S., Hong, J. Y., Ryu, K. J., Kim, S. J., & Park, C. (2017). Epstein-Barr virus EBNA-2 directs doxorubicin resistance of B cell lymphoma through CCL3 and CCL4-mediated activation of NF- κ B and Btk. *Oncotarget*, 8(3), 5361–5370. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14243>
- Kimura H, Morita M, Yabuta Y, Kuzushima K, Kato K, Kojima S, Matsuyama T & Morishima T (1999). Quantitative analysis of Epstein-Barr Virus load by using a real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(1): 132-136. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.1.132-136.1999>
- Kimura, H., Nagasaka, T., Hoshino, Y., Hayashi, N., Tanaka, N., Lan Xu, J., Kuzushima, K., & Morishima, T. (2001). Severe hepatitis caused by Epstein-Barr virus without infection of hepatocytes. *Human Pathology*, 32(7), 757–762. <https://doi.org/10.1053/hupa.2001.25597>
- Kofteridis, D. P., Koulentaki, M., Valachis, A., Christofaki, M., Mazokopakis, E., Papazoglou, G., & Samonis, G. (2011). Epstein Barr Virus hepatitis. *European Journal of Internal Medicine*, 22(1), 73–76. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2010.07.016>
- Kutok, J. L., & Wang, F. (2006). Spectrum of Epstein-Barr Virus–Associated Diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1(1), 375–404. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100209>
- Latour, S., & Winter, S. (2018). Inherited immunodeficiencies with high predisposition to Epstein-Barr Virus-driven lymphoproliferative diseases. *Frontiers in Immunology*, 9, 1103. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01103>
- Lam, W., Jiang, P., Chan, K., Peng, W., Shang, H., Heung, M., Cheng, S. H., Zhang, H., Tse, O., Raghupathy, R., Ma, B., Hui, E. P., Chan, A., Woo, J., Chiu, R., & Lo, Y. (2019). Methylation analysis of plasma DNA informs etiologies of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Nature communications*, 10(1), 3256. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11226-5>
- Liberal, R., Grant, C. R., Holder, B. S., Cardone, J., Martinez-Llordella, M., Ma, Y., Heneghan, M. A., Mieli-Vergani, G., Vergani, D., & Longhi, M. S. (2015). In autoimmune hepatitis type 1 or the autoimmune hepatitis-sclerosing cholangitis variant defective regulatory T-cell responsiveness to IL-2 results in low IL-10 production and impaired suppression. *Hepatology*, 62(3), 863–875. <https://doi.org/10.1002/hep.27884>
- Lightfoote MM, Chirmule N, Homburger HA, Kavanaugh A, Nakamura RM, Papisch W, Tetin SY (2006): Quality Assurance of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens: (1) Indirect Fluorescence Assay for Microscopy and (2) Microtiter Enzyme Immunoassay Methods; Approved Guideline-Second Edition. CLSI, 26 (13):

- Liu, S., Li, H., Tang, M., & Cao, Y. (2018). (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibition of Epstein-Barr virus spontaneous lytic infection involves downregulation of latent membrane protein 1. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *15*(1), 1105–1112. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5495>
- Lossius, A., Johansen, J. N., Torkildsen, Ø., Vartdal, F., & Holmoy, T. (2012). Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis-association and causation. *Viruses*, *4*(12), 3701–3730. <https://doi.org/10.3390/v4123701>
- Lowe, D., & John, S. (2018). Autoimmune hepatitis: Appraisal of current treatment guidelines. *World Journal of Hepatology*, *10*(12), 911–923. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i12.911>
- Lunardi, C., Bason, C., Navone, R., Millo, E., Damonte, G., Corrocher, R., & Puccetti, A. (2000). Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nature Medicine*, *6*(10), 1183–1186. <https://doi.org/10.1038/80533>
- Ma, S.-D., Tsai, M.-H., Romero-Masters, J. C., Ranheim, E. A., Huebner, S. M., Bristol, J. A., Delecluse, H.-J., & Kenney, S. C. (2017). Latent Membrane Protein 1 (LMP1) and LMP2A Collaborate To Promote Epstein-Barr Virus-Induced B Cell Lymphomas in a Cord Blood-Humanized Mouse Model but Are Not Essential. *Journal of Virology*, *91*(7). <https://doi.org/10.1128/jvi.01928-16>
- Mack CL, Adams D, Assis DN, et al. Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis in Adults and Children: 2019 Practice Guidance and Guidelines From the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2020;*72*(2):671-722. doi:10.1002/hep.31065
- Manicklal, S., Emery, V. C., Lazzarotto, T., Boppana, S. B., & Gupta, R. K. (2013). The “Silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(1), 86–102. <https://doi.org/10.1128/CMR.00062-12>
- Marieb Elaine N. & Hoehn Katja N. *Human Anatomy & Physiology*, Boston, Pearson. 2016.
- Masson P, Hulo C, De Castro E, Bitter H, Gruenbaum L, Essieux L, Bougueleret L, Xenarios I, Le Mercier P (2013). *ViralZone: recent updates to the virus knowledge resource*. *Nucleic Acids Res*. Jan;*41* (Database issue): D579-83. doi: 10.1093/nar/gks1220. Epub 2012 Nov 28. PMID: 23193299
- Green, Michael & Joseph, S. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Fourth edi). old Spring Harbor Laboratory Press.

- Michielsen, P., Francque, Vonghia, & Ramon. (2012). Epidemiology and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatic Medicine: Evidence and Research*, 1. <https://doi.org/10.2147/hmer.s16321>
- Min, C. Y., Song, J. Y., & Jeong, S. J. (2017). Characteristics and prognosis of hepatic cytomegalovirus infection in children: 10 years of experience at a university hospital in Korea. *Korean Journal of Pediatrics*, 60(8), 261–265. <https://doi.org/10.3345/kjp.2017.60.8.261>
- Minamitani, T., Yasui, T., Ma, Y., Zhou, H., Okuzaki, D., Tsai, C. Y., Sakakibara, S., Gewurz, B. E., Kieff, E., & Kikutani, H. (2015). Evasion of affinity-based selection in germinal centers by Epstein-Barr virus LMP2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(37), 11612–11617. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514484112>
- Minhas, V., & Wood, C. (2014). Epidemiology and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Viruses*, 6(11), 4178–4194. <https://doi.org/10.3390/v6114178>
- Montaño, A., & Angulo, P. (2007). Anticuerpos En Las Enfermedades Hepáticas. *Revista Gastroenterología de Mexico*, 72(1), 62–68. <http://www.medigraphic.com/pdfs/gastro/ge-2007/ge071m.pdf>
- Morales-Sánchez, A., & Fuentes-Panana, E. M. (2018). The immunomodulatory capacity of an Epstein-Barr virus abortive lytic cycle: Potential contribution to viral tumorigenesis. *Cancers*, 10(4), 1–25. <https://doi.org/10.3390/cancers10040098>
- Mundo, L., Ambrosio, M. R., Picciolini, M., Bello, G. Lo, Gazaneo, S., Del Porro, L., Lazzi, S., Navari, M., Onyango, N., Granai, M., Bellan, C., Falco, G. De, Gibellini, D., Piccaluga, P. P., & Leoncini, L. (2017). Unveiling another missing piece in EBV-driven lymphomagenesis: EBV-encoded microRNAs expression in EBER-negative Burkitt lymphoma cases. *Frontiers in Microbiology*, 8, 229. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00229>
- Nagata K, Kumata K, Nakayama Y, Satoh Y, Sugihara H, Hara S, Matsushita M, Kuwamoto S, Kato M, Murakami I, Hayashi K. Epstein-Barr Virus Lytic Reactivation Activates B Cells Polyclonally and Induces Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression: A Mechanism Underlying Autoimmunity and Its Contribution to Graves' Disease. *Viral Immunol.* 2017 Apr;30(3):240-249. doi: 10.1089/vim.2016.0179. Epub 2017 Mar 23. PMID: 28333576; PMCID: PMC5393416.
- Nares-Cisneros, J., & Jaramillo-Rodríguez, Y. (2014). Hepatitis autoinmune en niños: Evolución de 20 casos del norte de México. *Revista de Gastroenterología de Mexico*, 79(4), 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2014.08.006>

- Nanbo, A., Noda, T., & Ohba, Y. (2018). Epstein-Barr Virus acquires its final envelope on intracellular compartments with Golgi markers. *Frontiers in Microbiology*, 9, 454. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00454>
- Negro, F. (2006). The paradox of Epstein-Barr virus-associated hepatitis. *Journal of Hepatology*, 44(5), 839–841. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.03.002>
- OpenStax College. (2013). Anatomy & physiology. OpenStax. <http://cnx.org/content/col11496/latest/>
- Ozaki Y, Tajiri H, Tanaka-Taya K, Mushiake S, Kimoto A, Yamanishi K, Okada S. Frequent detection of the human herpesvirus 6-specific genomes in the livers of children with various liver diseases. *J Clin Microbiol.* 2001 Jun;39(6):2173-7. doi: 10.1128/JCM.39.6.2173-2177.2001. PMID: 11376053; PMCID: PMC88107.
- Peña-Vélez, R., & Almanza-Miranda, E. (2017). Autoimmune hepatitis in the pediatric age. *Boletín Medico Del Hospital Infantil de Mexico*, 74(5), 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.bmhix.2017.05.004>
- Petrova, M., Muhtarova, M., Nikolova, M., Magaev, S., Taskov, H., Nikolovska, D., & Krastev, Z. (2006). Chronic Epstein-Barr virus-related hepatitis in immunocompetent patients. *World Journal of Gastroenterology*, 12(35), 5711–5716. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i35.5711>
- Phan TL, Lautenschlager I, Razonable RR, Munoz FM. HHV-6 in liver transplantation: A literature review. *Liver Int.* 2018 Feb;38(2):210-223. doi: 10.1111/liv.13506. Epub 2017 Jul 29. PMID: 28650593.
- Polizzotto, M. N., Uldrick, T. S., Wyvill, K. M., Aleman, K., Marshall, V., Wang, V., Whitby, D., Pittaluga, S., Jaffe, E. S., Millo, C., Tosato, G., Little, R. F., Steinberg, S. M., Sereti, I., & Yarchoan, R. (2015). Clinical Features and Outcomes of Patients with Symptomatic Kaposi Sarcoma Herpesvirus (KSHV)-associated Inflammation: Prospective Characterization of KSHV Inflammatory Cytokine Syndrome (KICS). *Clinical Infectious Diseases*, 62(6), 730–738. <https://doi.org/10.1093/cid/civ996>
- Poole, B. D., Scofield, R. H., Harley, J. B., & James, J. A. (2006). Epstein-Barr virus and molecular mimicry in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 39(1), 63–70. <https://doi.org/10.1080/08916930500484849>
- Purushothaman, P., Dabral, P., Gupta, N., Sarkar, R., & Verma, S. C. (2016). KSHV genome replication and maintenance. *Frontiers in Microbiology*, 7, 54. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00054>
- Ribeiro, J., Oliveira, C., Malta, M., & Sousa, H. (2017). Epstein-Barr virus gene expression and latency pattern in gastric carcinomas: A systematic review. *Future Oncology*, 13(6), 567–579. <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0475>

- Rigopoulou, E. I., Smyk, D. S., Matthews, C. E., Billinis, C., Burroughs, A. K., Lenzi, M., & Bogdanos, D. P. (2012). Epstein-barr virus as a trigger of autoimmune liver diseases. *Advances in Virology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/987471>
- Rizzo, R., Soffritti, I., D'Accolti, M., Bortolotti, D., Di Luca, D., & Caselli, E. (2017). HHV-6A/6B infection of NK cells modulates the expression of miRNAs and transcription factors potentially associated to impaired NK activity. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2143. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02143>
- Sánchez-Ponce, Y., Varela-Fascinetto, G., Romo-Vázquez, J. C., López-Martínez, B., Sánchez-Huerta, J. L., Parra-Ortega, I., Fuentes-Pananá, E. M., & Morales-Sánchez, A. (2018). Simultaneous detection of beta and gamma human herpesviruses by multiplex qPCR reveals simple infection and coinfection episodes increasing risk for graft rejection in solid organ transplantation. *Viruses*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/v10120730>
- Schechter, S., & Lamps, L. (2018). Epstein-Barr virus hepatitis: A review of clinicopathologic features and differential diagnosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 142(10), 1191–1195.
- Shkalim-Zemer, V., Shahar-Nissan, K., Ashkenazi-Hoffnung, L., Amir, J., & Bilavsky, E. (2015). Cholestatic hepatitis induced by Epstein-Barr virus in a pediatric population. *Clinical Pediatrics*, 54(12), 1153–1157. <https://doi.org/10.1177/0009922815570618>
- Smith, E. (2014). *50 years of Epstein-Barr virus*. Cancer Reserch UK. <https://scienceblog.cancerresearchuk.org/2014/03/26/50-years-of-epstein-barr-virus/>
- Soto, M. E., Hernández-Becerril, N., Perez-Chiney, A. C., Hernández-Rizo, A., Melendez, G., & Bojalil, R. (2015). Predictive value of antinuclear antibodies in autoimmune diseases classified by clinical criteria: Analytical study in a specialized health institute, one year follow-up. *Results in Immunology*, 5, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.rinim.2013.10.003>
- Stempel, M., Chan, B., & Brinkmann, M. M. (2019). Coevolution pays off: Herpesviruses have the license to escape the DNA sensing pathway. *Medical Microbiology and Immunology*, 208(3–4), 495–512. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00582-0>
- Tamburro, K. M., Yang, D., Poisson, J., Fedoriw, Y., Roy, D., Lucas, A., Sin, S. H., Malouf, N., Moylan, V., Damania, B., Moll, S., van der Horst, C., & Dittmer, D. P. (2012). Vironome of Kaposi sarcoma associated herpesvirus-inflammatory cytokine syndrome in an AIDS patient reveals co-infection of human herpesvirus 8 and human herpesvirus 6A. *Virology* 433(1), 220-225. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.08.014>
- Tan, K., Xie, X., Shi, W., Miao, L., Dong, X., Hou, F., & Hong, Y. (2020). Deficiency of canonical Wnt/ β -catenin signalling in hepatic dendritic cells triggers autoimmune hepatitis. *Liver International*, 40(1), 131–140. <https://doi.org/10.1111/liv.14246>

- Tan, Z. H., Phua, K. B., Ong, C., & Kader, A. (2015). Prolonged hepatitis and jaundice: A rare complication of paediatric Epstein-Barr virus infection. *Singapore Medical Journal*, 56(7), e112–e115. <https://doi.org/10.11622/smedj.2015113>
- Tanaka, T., Sugawara, Y., & Kokudo, N. (2015). Liver transplantation and autoimmune hepatitis. *Intractable and Rare Diseases Research*, 4(1), 33–38. <https://doi.org/10.5582/irdr.2014.01034>
- Teufel A, Weinmann A, Kahaly GJ, Centner C, Piendl A, Wörns M, Lohse AW, Galle PR, Kanzler S. Concurrent autoimmune diseases in patients with autoimmune hepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2010 Mar;44(3):208-13. doi: 10.1097/MCG.0b013e3181c74e0d. PMID: 20087196.
- Than, N. N., Jeffery, H. C., & Oo, Y. H. (2016). Autoimmune Hepatitis: Progress from Global Immunosuppression to Personalised Regulatory T Cell Therapy. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7181685>
- Tracy, S. I., Kakalacheva, K., Lunemann, J. D., Luzuriaga, K., Middeldorp, J., & Thorley-Lawson, D. A. (2012). Persistence of Epstein-Barr Virus in Self-Reactive Memory B Cells. *Journal of Virology*, 86(22), 12330–12340. <https://doi.org/10.1128/jvi.01699-12>
- Watanabe, T., Kawamura, T., Jacob, S. E., Aquilino, E. A., Orenstein, J. M., Black, J. B., & Blauvelt, A. (2002). Pityriasis rosea is associated with systemic active infection with both human herpesvirus-7 and human herpesvirus-6. *Journal of Investigative Dermatology*, 119(4), 793–797. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.00200.x>
- Winter, S., Martin, E., Boutboul, D., Lenoir, C., Boudjemaa, S., Petit, A., Picard, C., Fischer, A., Leverger, G., & Latour, S. (2018). Loss of RASGRP 1 in humans impairs T-cell expansion leading to Epstein-Barr virus susceptibility. *EMBO Molecular Medicine*, 10(2), 188–199. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708292>
- Yadav, P., Tran, H., Ebegbe, R., Gottlieb, P., Wei, H., Lewis, R. H., Mumbey-Wafula, A., Kaplan, A., Kholdarova, E., & Spatz, L. (2011). Antibodies elicited in response to EBNA-1 may cross-react with dsDNA. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014488>
- Yang, S. I., Geong, J. H., & Kim, J. Y. (2014). Clinical characteristics of primary Epstein Barr virus hepatitis with elevation of alkaline phosphatase and γ -glutamyltransferase in children. *Yonsei Medical Journal*, 55(1), 107–112. <https://doi.org/10.3349/ymj.2014.55.1.107>
- Zhang, Y., Zhao, Y., Jiang, Y., & Wang, H. (2020). Effects of Epstein–Barr virus infection on liver function in children. *Journal of Infection and Public Health*, 13(2), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.11.009>

Bibliografía:

Epstein, M. A., Achong, B. G., & Barr, Y. M. (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts from burkitt's lymphoma. *Lancet (London, England)*, *1*(7335), 702–703. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(64\)91524-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(64)91524-7)

Fingeroth, J. D., Weis, J. J., Tedder, T. F., Strominger, J. L., Biro, P. A., & Fearon, D. T. (1984). Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(14), 4510–4514. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.14.4510>

Kieff, E., Given, D., Powell, A. L., King, W., Dambaugh, T., & Raab-Traub, N. (1979). Epstein-Barr virus: structure of the viral DNA and analysis of viral RNA in infected cells. *Biochimica et biophysica acta*, *560*(3), 355–373. [https://doi.org/10.1016/0304-419x\(79\)90009-x](https://doi.org/10.1016/0304-419x(79)90009-x)

Thorley-Lawson, D. A., & Gross, A. (2004). Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *The New England journal of medicine*, *350*(13), 1328–1337. <https://doi.org/10.1056/NEJMra032015>

Young, L. S., & Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature reviews. Cancer*, *4*(10), 757–768. <https://doi.org/10.1038/nrc1452>

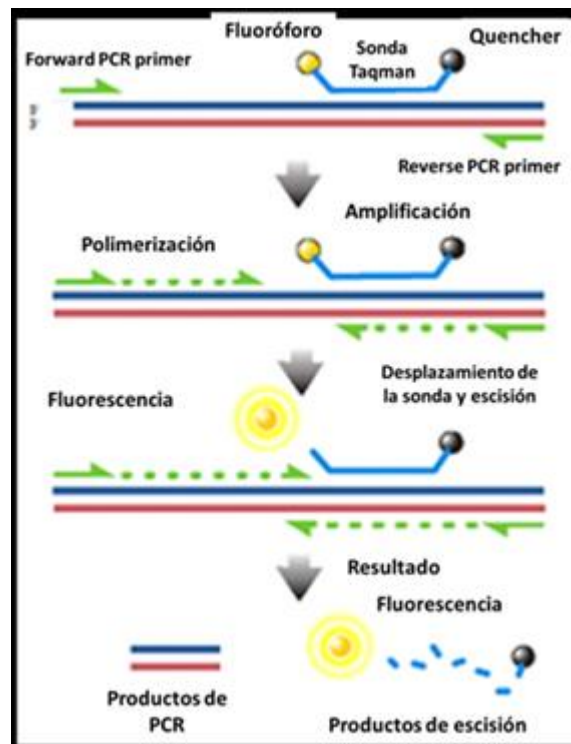
Apéndice:

PCR cuantitativa múltiplex

La técnica de PCR inventada en 1986, se basa en la amplificación de un fragmento de DNA seleccionado por un par de primers en conjunto con la actividad de una enzima DNA polimerasa. Al ser una técnica sencilla y versátil tiene cientos de aplicaciones en campos como la paleontología, investigación, medicina diagnóstica y ciencias forenses. Uno de estos usos es la detección de patógenos mediante la amplificación de un fragmento de su genoma, facilitando su detección. Una variedad de esta técnica es la PCR Cuantitativa Multiplex, caracterizada por el uso simultáneo de varias moléculas fluorescentes acopladas a distintas secuencias complementarias de las regiones amplificadas (Sondas) como método de detección, en conjunto con una curva estándar que permita interpolar el número original de genomas en una muestra (ver ilustración 24).

En el caso de este estudio el empleo de esta variedad de PCR permitió una lectura cuantitativa del número de copias de múltiples virus en una sola muestra, factor fundamental al tratar con pacientes pediátricos cuyas muestras son de un volumen menor a las de pacientes de edad adulta (Green, 2012).

Ilustración 24: Fundamento de la técnica de qPCR multiplex con sondas taqman



ALT y AST, como marcadores de daño hepático

Existen múltiples pruebas bioquímicas para evaluar la función hepática, estas son clasificadas en tres grupos; pruebas que evalúan el daño hepático a través de la muerte de hepatocitos, pruebas relacionadas con el metabolismo de la bilirrubina y pruebas que analizan la síntesis hepática. Generalmente suelen afectarse al mismo tiempo, sin embargo, diferentes resultados pueden asociarse con diferentes patologías, guiando el proceso diagnóstico. Entre las pruebas que evalúan el daño hepático destaca la detección de transaminasas, enzimas que catalizan la transferencia de grupos amino del ácido aspártico o la alanina. En el hígado únicamente dos son de relevancia clínica; ALT o alanino-aminotransferasa localizada casi exclusivamente en el citosol hepático y AST o aspartato-aminotransferasa que además del citosol hepático se encuentra en corazón, musculo esquelético, riñón, cerebro, páncreas, pulmón y células sanguíneas. Ambas enzimas están presentes normalmente en el suero con valores inferiores a 40 U/L, mientras que concentraciones superiores a 50 U/L se consideran patológicas particularmente cuando persisten o los valores son mayores de 500 u/L (García & Zurita, 2012).

Cartas de consentimiento informado, asentamiento informado y revocación.

Anexas a continuación.

Investigadores: **Alejandra Consuelo S, Isabel Tussié L, Ezequiel Fuentes P, Abigail Sánchez M, Raúl Sol Ortega.**
Departamento: **Unidad de Investigación en Virología y Cáncer, HIMFG.**

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Ciudad de México, _____ de 201 _____.

Yo _____
declaro libre y voluntariamente que fui invitado a participar con mi hijo(a) _____ en el estudio

"PAPEL DEL VIRUS DE EPSTEIN-BARR EN LA HEPATITIS AUTOINMUNE EN PACIENTES PEDIÁTRICOS" realizado en la Unidad de Investigación en Virología y Cáncer (UIVC) del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG). Se sabe que existe una correlación entre el virus del Epstein-Barr y la enfermedad hepática aguda fulminante, sin embargo no ha quedado claro su participación en el desarrollo de autoinmunidad en estos pacientes ni tampoco de qué manera participa en las enfermedades hepáticas de evolución crónica. Se ha sospechado recientemente tanto en la literatura médica de otros países como en la experiencia propia de nuestros pacientes en este hospital, que este virus tiene una participación importante ya sea como detonador de una enfermedad autoinmune del hígado, o bien como un exacerbante de una enfermedad hepática crónica y frecuentemente, en estos pacientes se ha observado la presencia de marcadores de autoinmunidad en sangre, sin que necesariamente se exprese una enfermedad autoinmune de primera instancia, sin embargo, se desconoce a largo plazo cual será la evolución de estos pacientes en relación al desarrollo de una enfermedad autoinmune del hígado. Teniendo en cuenta estas evidencias y después de la evaluación diagnóstica que se le ha realizado a mi hijo(a) se me ha explicado que él (ella) tiene una enfermedad hepática que pudiera estar asociada a la presencia del virus del Epstein-Barr, por lo que se pretende en este estudio tratar de definir (1) si este virus es un factor desencadenante o exacerbante de la enfermedad de mi hijo(a), (2) si este virus es un detonador de enfermedad autoinmune o bien, (3) si correlaciona con la enfermedad hepática y no tiene efecto alguno sobre ella, lo cual se conseguirá dando un seguimiento periódico de la búsqueda del virus del Epstein-Barr en sangre y cuando su médico tratante considere necesario realizar una biopsia hepática para ampliar su abordaje diagnóstico o tomar alguna otra decisión clínica independiente a la presencia o no del virus, se buscará directamente en un fragmento del tejido hepático obtenido por biopsia hepática.

La participación de su hijo(a) consistirá en la toma de una muestra de sangre de 2 a 4 veces al año, dependiendo de la evaluación clínica de su médico tratante y como parte del seguimiento de su hijo(a), es decir al inicio de la enfermedad y cuando exista evidencia de exacerbación de la misma, o bien cuando se desee correlacionar la mejoría de su padecimiento con la ausencia del virus. Este seguimiento se realizará durante todo el tiempo que sea vigilado el paciente en nuestro hospital siempre y cuando este proyecto de investigación esté activo. Así mismo, se buscará en las muestras sanguíneas algunas otras sustancias en sangre que se llaman



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AFILIADO A UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN VIROLOGÍA Y CÁNCER
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr. Márquez 162, Col. Doctores. Del. Cuauhtémoc, C.P. 06720 México D.F.
Consultador: 5228-9917 ext. 2129
www.himfg.edu.mx



citocinas que pueden aumentar o disminuir sus niveles durante un proceso infeccioso. Estas sustancias pueden ser las responsables de inducir la inflamación y la producción de los autoanticuerpos que causan el daño hepático. La muestra sanguínea se tomará en el Laboratorio Central o de Gastroenterología mediante la punción de una vena, de forma similar a como se realiza cuando le toman una muestra de sangre para los análisis convencionales de laboratorio. La cantidad de sangre que se tomará será más o menos la correspondiente a una cucharadita de sangre. En una sola ocasión, se le tomará lo equivalente a dos cucharaditas de sangre en tubo rojo para la obtención de suero. Por otro lado, cuando su médico solicite una toma de biopsia hepática para la confirmación del diagnóstico o seguimiento de su enfermedad se nos compartirá un pedacito de tejido de 2-3 mg y se utilizará para la búsqueda del virus Epstein-Barr. Es importante mencionar que este fragmento de biopsia se compartirá, siempre y cuando la cantidad del tejido hepático lo permita y no se ponga en riesgo el análisis primario, motivo de la biopsia.

Los riesgos que existen por la toma de la muestra sanguínea es el dolor al momento de la punción con la aguja y la formación de un moretón o "hematoma" en el lugar donde le tomen la muestra.

El riesgo que existe de la biopsia hepática será comentado ampliamente por su médico tratante, y como tal, éste no forma parte de los riesgos de participar en este estudio, ya que la biopsia se indicará con otros fines diagnósticos o pronósticos por parte del médico tratante, y solo se compartirá un pequeño fragmento como se ha mencionado previamente.

Los resultados de este estudio podrán servir para saber si existe una relación entre la infección por el virus de Epstein-Barr y el daño e inflamación hepática producida en la enfermedad hepática de su hijo(a) así como, la relación que existe con la presencia de enfermedad autoinmune o simplemente con los marcadores serológicos de autoinmunidad, por lo que en un futuro podría definirse si el virus de Epstein-Barr, es causante de la enfermedad, es inductor de una enfermedad autoinmune del hígado o bien es un exacerbante de la enfermedad hepática. Al conocer la participación y mecanismos de daño de este virus en el hígado eventualmente podría proponerse un tratamiento específico en estos pacientes.

Se me ha explicado que algunos resultados podrán ser publicados con el objetivo de que otros médicos puedan conocer el papel del virus de Epstein-Barr en otros niños con enfermedad hepática, pero que ningún dato personal de mi hijo(a) será publicado ni podrá ser identificado en esa publicación. Es decir, no se publicará su nombre y nadie sabrá que participó en ese estudio. También se me ha explicado que si deseo que mi hijo(a) deje de participar en cualquier momento, soy libre de hacerlo y no habrá ninguna repercusión en su seguimiento y atención dentro de este hospital.

Si usted lo autoriza, las muestras de su hijo(a) serán utilizadas dentro del marco del proyecto de investigación titulado **"PAPEL DEL VIRUS DE EPSTEIN-BARR EN LA HEPATITIS AUTOINMUNE EN PACIENTES PEDIÁTRICOS"** HIM-2016-080, que ya ha sido aprobado por los comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" (HIMFG) y por las Comisiones de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina, de la UNAM bajo los siguientes estatutos:



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AFILIADO A LA UNAM Hospital de México Federico Gómez

Dr. Márquez 162, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc, C.P. 06720 México D.F. 28 NOV. 2018
Consultador: 5228-9917 ext. 2129.
www.himfg.edu.mx



Por favor marque y firme su elección	Si	No
Autorizo que se usen las muestras de mi hijo(a) para este estudio de investigación básica.		
Autorizo que se usen las muestras de mi hijo(a) para este y otros estudios futuros de investigación básica, dentro de la misma institución.		
Autorizo que se usen las muestras de mi hijo(a) para este estudio y otros estudios futuros de investigación básica en otras instituciones de investigación.		

Si Usted lo autoriza, las muestras serán resguardadas **a perpetuidad** en el biorepositorio de la Unidad de Investigación de Virología y Cáncer del HIMFG, donde se les asignará un código de identificación para mantener la confidencialidad de su información y su privacidad. El nombre, los datos clínicos y personales de su hijo(a) serán resguardados en una base de datos en forma independiente a su muestra, por lo que ninguna persona que no esté relacionada al proyecto (investigador responsable o investigador suplente), podrá asociar los datos de la muestra con el nombre de su hijo(a).

Sin embargo, si usted *no* autoriza el uso de la muestra de su hijo(a) para futuros proyectos de investigación, la muestra será destruida al término de este estudio.

Los niños y adolescentes que alcancen la mayoría de edad durante o al terminar el proyecto de investigación tendrán la oportunidad de confirmar o de retirar el consentimiento informado para continuar con el almacenamiento y el uso continuo de su material y datos relacionados para futuras investigaciones.

Se me ha explicado que somos libres de participar o no en este estudio, así como de decidir no seguir participando en el momento en que yo así lo desee y que la atención a mi hijo(a) en esta Institución NO se verá afectada. Las muestras no serán utilizadas con fines de lucro ni de comercialización por lo que, NO recibiré ninguna remuneración económica por la participación de mi hijo(a). Podré solicitar en cualquier momento, información adicional acerca de los riesgos y beneficios de nuestra participación en el estudio así como, información del uso futuro de las muestras, dirigiéndome a la doctora Alejandra Consuelo Sánchez, teléfono 5228 9917 ext. 2139, a la doctora Isabel Tussié al teléfono 5228 9917 ext. 2129 o con el M en C Raúl Sol Ortega al teléfono 044 55 4566 0807.

He leído o escuchado la información, he hecho todas las preguntas necesarias, y todas han sido respondidas satisfactoriamente, por lo que yo _____ con nombre de mi hijo(a) _____ con número de registro hospitalario _____ acepto participar en el estudio **PAPEL DEL**



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AFILIADO A LA UNAM

Dr. Márquez 162, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc, C.P. 06720 México D.F.
Commutador: 5228-9917 ext. 2129.
www.himfg.edu.mx





VIRUS DE EPSTEIN-BARR EN LA HEPATITIS AUTOINMUNE EN PACIENTES PEDIÁTRICOS registrado ante este hospital con el número HIM-2016-080.

Nombre de la madre, padre o tutor:

Parentesco: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Testigo 1

Nombre con letra de molde: _____

Parentesco: _____ Domicilio _____

Firma: _____ Fecha: _____

Testigo 2

Nombre con letra de molde: _____

Parentesco: _____ Domicilio _____

Firma: _____ Fecha: _____

Nombre del investigador que obtiene el consentimiento: _____

Firma: _____ Fecha: _____

(Se deberá elaborar por duplicado quedando una copia en poder del paciente).



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AFILIADO A LA UNAM

Dr. Márquez 162, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc, C.P. 06720 México D.F.
Conmutador: 5228-9917 ext. 2129.
www.himfa.edu.mx

Departamento: Unidad de Investigación en Virología y Cáncer y Departamento de Gastroenterología y Nutrición HIMFG.

CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO
Para participar en un estudio de investigación

"PAPEL DEL VIRUS DE EPSTEIN-BARR EN LA HEPATITIS AUTOINMUNE EN PACIENTES PEDIÁTRICOS"

En este hospital estamos realizando un estudio de investigación en niños y adolescentes con diagnóstico de hepatitis. Los estudios de investigación nos permiten aprender más acerca de ciertos problemas de salud, como las hepatitis que presentan algunos niños y adolescentes como tú. Te estamos invitando a participar en este estudio, en el cual investigaremos si existe alguna relación entre el virus de Epstein-Barr o su estado de infección y el daño e inflamación que presenta tu hígado.

Hasta ahora no se sabe con exactitud como participa el virus de Epstein-Barr en tu enfermedad, se cree que pudiera ser el origen de la misma, que pudiera ocasionar que tu organismo desarrolle defensas que se llaman autoanticuerpos contra tu propio hígado, o bien, que aumente el daño que ya presenta tu hígado. Para conocer como actúa este virus en tu organismo y en tu enfermedad necesitamos compartir las muestras que tu médico toma durante el transcurso de todo el tiempo que te estamos vigilando en este hospital con la finalidad de buscar directamente al virus así como, identificar otras sustancias que se llaman citocinas que participan en el daño que se produce en tu hígado. También buscaremos al virus de Epstein-Barr directamente en el tejido hepático, pero solo en caso de que se obtenga un pedacito de tu hígado porque tu médico decida que es necesario obtenerlo para poder conocer más de tu enfermedad y de ser posible, darte un tratamiento más específico. Es importante que sepas que la obtención de este fragmento de tu hígado nunca se hará solo con el objetivo de buscar el virus de Epstein-Barr, siempre será por otra indicación médica y en forma secundaria se nos compartirá un pedacito de la muestra obtenida.

El único riesgo que tienes por participar en este estudio es que te puede doler la punción al momento de la toma de muestra de sangre y te puede quedar un moretón, similar a lo que puede ocurrir cuando te toman las muestras de sangre para los análisis de laboratorio. Los riesgos de la obtención de la muestra del pedacito de hígado, que se llama biopsia hepática, te los explicará tu médico tratante y no forman parte de este estudio de investigación, ya que como se ha explicado antes, la intención de este procedimiento forma parte del estudio y seguimiento en general de tu enfermedad. El pequeño fragmento de tejido que se nos compartirá para la búsqueda del virus, se obtendrá una vez obtenida la biopsia y solo se nos compartirá si es suficiente el pedacito de hígado que obtuvieron para poder hacer todos los análisis que tu médico ha solicitado.

Este estudio nos dará más conocimientos acerca de las enfermedades del hígado, como la que



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AFILIADO A LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN VIROLOGÍA Y CÁNCER del Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr. Márquez 162, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc, C.P. 06720 México D.F.
Conmutador: 5228-9917 ext. 2129.
www.himfg.edu.mx

28 NOV. 2018

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN



presentas y de la participación del virus de Epstein-Barr en éstas. Los conocimientos los compartiremos con otros médicos y cuando hayamos terminado el estudio escribiremos un reporte sobre los resultados. En este reporte no aparecerá tu nombre y nadie sabrá que participaste en el estudio. Puedes preguntar todas las dudas que tengas en cualquier momento y eres libre de participar o no, según sea tu deseo. Nosotros seguiremos dándote la atención médica que te mereces.

Si decides participar en el estudio escribe tu nombre y firma y te daremos una copia de este papel.

Señala con una cruz:

Estoy de acuerdo en participar Sí _____ No _____

Escribe tu nombre con letra de molde: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Testigo 1

Nombre con letra de molde: _____ con _____ letra de

Parentesco: _____

Domicilio: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Testigo 2

Nombre con letra de molde: _____

Parentesco: _____ Domicilio: _____

Firma: _____ Fecha: _____

Nombre del investigador que obtuvo el consentimiento: _____

Firma: _____ Fecha: _____

(Se deberá elaborar por duplicado quedando una copia en poder del paciente).



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AFILIADO A LA UNAM

Dr. Márquez 162, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc, C.P. 06720 México D.F.
Conmatdor: 5228-9917 ext. 2129.
www.himf.edu.mx

Departamento: **Unidad de Investigación en Virología y Cáncer y Departamento de Gastroenterología y Nutrición HIMFG.**

Investigadores: **Alejandra Consuelo S, Isabel Tussié L, Ezequiel Fuentes P, Abigail Sánchez M, Raúl Sol Ortega.**

Departamento: **Unidad de Investigación en Virología y Cáncer, HIMFG.**

CARTA DE REVOCACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
De participación en un estudio de investigación

“PAPEL DEL VIRUS DE EPSTEIN-BARR EN LA HEPATITIS AUTOINMUNE EN PACIENTES PEDIÁTRICOS”

Por este conducto deseamos informar nuestra decisión de retirar a nuestro hijo(a) _____ de este estudio por las siguientes razones: (Este apartado es opcional y puede dejarse en blanco si así lo desea).

Entiendo que la atención a mi hijo(a) en esta Institución, NO se verá afectada como tampoco se verá afectada su relación con este hospital o su derecho a obtener los servicios de salud que recibe de este hospital.

Si los padres o tutores del paciente así lo desean, pueden solicitar que les sea entregada toda la información que haya sido recabada sobre su hijo(a), con motivo de su participación en este estudio.

Papá o Tutor:

Nombre _____

Firma _____

Fecha _____



Mamá o Tutora:

Nombre _____

Firma _____

Fecha _____



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AFILIADO A LA UNAM

Dr. Márquez 162, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc, C.P. 06720 México D.F.
Comutador: 5228-9917 ext. 2129.
www.himfg.edu.mx