



Revista MINERVA

Plataforma digital de la revista: <https://minerva.sic.ues.edu.sv>

Artículo Científico | Scientific Article

Infeción por virus Epstein–Barr en Linfoma de Hodgkin pediátrico: análisis de EBER mediante hibridación in situ

Epstein–Barr Virus Infection in Pediatric Hodgkin Lymphoma: EBER Analysis by In Situ Hybridization

Carlos Alexander Ortega Pérez^{1,4}, Mario Alejandro Lorenzetti^{2,5}, María Victoria Preciado^{2,6}, Ana Catalina Blazquez^{2,7}, Iris Arminda Rivera^{3,8}

Correspondencia: carlos.ortega@ues.edu.sv

1 Laboratorio de Virología y Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador. El Salvador

2 Instituto Multidisciplinario de Investigaciones en Patologías Pediátricas (IMIPP), CONICET-GCBA, Laboratorio de Biología Molecular, División Patología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina

3 Unidad de Hematología, Hospital de Oncología, Instituto Salvadoreño del Seguro social. El Salvador

4  <https://orcid.org/0000-0003-1612-8386>

5  <https://orcid.org/0000-0002-9434-399X>

6  <https://orcid.org/0000-0003-4082-0698>

7  <https://orcid.org/0000-0001-8799-6821>

8  <https://orcid.org/0009-0003-8623-6726>

RESUMEN

Introducción: el virus de Epstein-Barr (VEB) se ha asociado con diversas neoplasias, incluido el Linfoma de Hodgkin (LH) pediátrico. Esta relación es más evidente en los países en desarrollo, donde la infección primaria ocurre a edades tempranas debido a la alta carga viral en la población. En Centroamérica, sin embargo, los estudios que exploran su presencia en estos tumores son limitados, lo que dificulta comprender su papel en la etiopatogenia del LH pediátrico y limita la posibilidad de diseñar estrategias diagnósticas y terapéuticas adaptadas al contexto regional. **Objetivo:** investigar la presencia de VEB en biopsias parafinadas de casos de LH en pacientes pediátricos tratados en el Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom. **Material y métodos:** para demostrar la infección en las células tumorales, se empleó hibridación in situ (ISH) dirigida a los ARN pequeños codificados por VEB (EBERs), considerada el estándar de

DOI: <https://doi.org/10.66778/RM.v09n01.07>

Enviado: 10 de diciembre de 2025

Aceptado: 21 de mayo de 20266

Palabras claves: Virus Epstein Barr (VEB), Linfoma de Hodgkin (LH), pequeños RNAs codificados por VEB (EBERs), Hibridación in situ (ISH).

Keywords: Epstein–Barr virus (EBV), Hodgkin Lymphoma (HL), EBV encoded small RNAs(EBERs), in situ hybridization (ISH).



Este contenido está protegido bajo la licencia CC BY (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

oro para la detección de infección latente. **Resultados:** los hallazgos mostraron que el 71.42% de las muestras fueron positivas para EBERs, lo que confirma la presencia del virus y su posible fuerte asociación con el Linfoma de Hodgkin clásico (LHC) en esta población pediátrica. **Conclusión:** en conjunto, estos resultados refuerzan el papel relevante que podría desempeñar el VEB en la patogénesis del LHC pediátrico en regiones con alta endemicidad viral, como Centroamérica. La ISH se consolida como una herramienta diagnóstica indispensable para detectar infección latente, proporcionando información valiosa con potenciales implicaciones clínicas. Estos hallazgos adquieren especial importancia en el contexto de las inmunoterapias emergentes dirigidas contra antígenos virales, que podrían abrir paso a tratamientos más personalizados para pacientes con tumores positivos para VEB. Asimismo, subrayan la necesidad de ampliar la investigación regional e incorporar tamaños de muestra mayores, junto con variables clínicas e inmunológicas, para lograr una comprensión más integral de la interacción entre la infección por VEB, el huésped y la neoplasia.

ABSTRACT

Introduction: Epstein-Barr virus (EBV) has been associated with various neoplasms, including pediatric Hodgkin lymphoma (HL). This relationship is more evident in developing countries, where primary infection occurs at an early age due to the high viral burden in the population. In Central America, however, studies exploring its presence in these tumors are limited, hindering a full understanding of its role in the etiopathogenesis of pediatric HL and restricting the development of diagnostic and therapeutic strategies tailored to the regional context. **Objective:** To investigate the presence of EBV in paraffin-embedded biopsy samples from pediatric HL cases treated at the National Children's Hospital Benjamín Bloom. **Materials and Methods:** EBV infection in tumor cells was assessed using in situ hybridization (ISH) targeting EBV-encoded small RNAs (EBERs), considered the gold standard for detecting latent infection. **Results:** The findings showed that 71.42% of samples were positive for EBERs, confirming the presence of the virus and its potentially strong association with classical Hodgkin lymphoma (cHL) in this pediatric population. **Conclusion:** Overall, these results reinforce the important role EBV may play in the pathogenesis of pediatric cHL in regions with high viral endemicity, such as Central America. ISH remains an indispensable diagnostic tool for identifying latent infection, providing valuable information with potential clinical implications. These findings are particularly relevant in the context of emerging immunotherapies directed against viral antigens, which may pave the way for more personalized treatments for patients with EBV-positive tumors. Furthermore, they highlight the need to expand regional research by incorporating larger sample sizes and integrating clinical and immunological

variables to achieve a more comprehensive understanding of the interaction among EBV infection, the host, and the neoplasm.

INTRODUCCIÓN

El Linfoma de Hodgkin (LH) es una enfermedad maligna del sistema linfático con una incidencia de 2 a 3 casos por 100 000 personas por año. Es la neoplasia más común en adultos jóvenes y tiene dos grupos de edad con alta incidencia, uno en la tercera década de la vida y otro después de los 55 años (Bröckelmann et al., 2018). Además de estos grupos de edad, el LH infantil representa el 6% del total de cánceres, con una tasa anual de 12 casos por cada millón de personas en la franja etaria de 0 a 14 años. Este tipo de cáncer es más frecuente en hombres y su comportamiento biológico es parecido en adultos y niños; sin embargo, tiene una incidencia relativa diferente en lo que concierne a los subtipos histológicos específicos y a la respuesta inmunológica ante las células Reed Sternberg-Hodgkin dentro del microambiente tumoral (Nagpal et al., 2016). En general, en el caso de la LH, este microambiente está formado por células Reed-Sternberg y células Hodgkin que constituyen alrededor del 1% de la masa tumoral. El resto del microambiente está compuesto por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos B y T no neoplásicos y células plasmáticas, también el LH clásico está relacionado con la fibrosis e infiltrado inflamatorio (Aggarwal & Limaem, 2025).

Estos tumores se distinguen, en términos generales, por una proliferación celular descontrolada, en la cual las células cancerosas expresan genes anómalos que intervienen directamente en la regulación del ciclo celular. Estas alteraciones en este ciclo permiten que las células adquieran rasgos de crecimiento sin control, especialmente la hiperproliferación y una tasa reducida de apoptosis, lo que finalmente desencadena la oncogénesis. La infección con el virus de Epstein-Barr (VEB) se relaciona con el Linfoma de Hodgkin (LH) en cerca del 40% de los casos en EE. UU. y Europa Occidental, pero en países en desarrollo esta cifra asciende hasta un 80% (Beltramino et al., 2005).

Luego de infectar la célula, el VEB tiene la posibilidad de inducir un ciclo lítico, que es una serie de replicaciones líticas, o puede provocar la expresión diferencial de genes latentes, lo que se conoce como ciclo latente. Bajo ciertas circunstancias, la infección por el VEB puede resultar en cáncer, y este proceso está íntimamente vinculado con el ciclo vital del virus, tanto lítico como latente. Aun con lo anterior, es relevante destacar que el VEB se encuentra en un alto

porcentaje de poblaciones sanas; en la mayoría de los casos, la infección es asintomática y permanece latente (ciclo latente) por largos períodos de tiempo. El virus continúa presente como episomas en las células B infectadas sin provocar enfermedad hasta en un 90% de los adultos. En cambio, los portadores de VEB que sufren una infección lítica (ciclo lítico) por VEB suelen contraer la enfermedad asociada a la infección, entre las cuales se encuentran cánceres como el LH. Cuando los factores de transcripción temprana (TF) son inducidos, el ciclo de replicación lítica da inicio. Los promotores virales que son activados por estos TF hacen posible la creación del complejo de iniciación, compuesto por seis productos génicos virales: BBLF4, BBLF2/3, BALF5 y BALF2, BMRF1 y BSLF1. Cuando las células infectadas con VEB ingresan al ciclo lítico, los antígenos líticos se manifiestan en gran cantidad y provocan la multiplicación de las células B (Song et al., 2019).

Es conocido que los cánceres vinculados al VEB presentan un perfil de mutaciones diferente a los cánceres negativos para este virus, y que el efecto clínico de la infección por VEB en el cáncer varía según el tipo de tumor. En cuanto al Linfoma Hodgkin positivo para VEB, se observa un pronóstico desfavorable en pacientes mayores, pero no en aquellos más jóvenes (Ko, 2015).

En el Linfoma de Hodgkin VEB positivo, el antígeno nuclear de VEB 1 (EBNA1) es fundamental para que las células en división repliquen su genoma episomal, lo que sugiere que EBNA1 tiene potenciales funciones oncogénicas. En las células Hodgkin Reed Sternberg, que son propias del Linfoma de Hodgkin, así como EBNA1, se manifiestan otras dos proteínas, las proteínas latentes de la membrana 1 y 2a (LMP1 y LMP2a) del VEB siguiendo un patrón conocido como latencia II. Esta LMP1 funciona como un oncogén clásico y simula el receptor CD40 activo; en cambio, la LMP2a simula el receptor de células B (BCR) activo. Estas dos formas de expresión se establecen como dos señales relevantes para la supervivencia de las células B, brindadas por el VEB. Además, este virus tiene la capacidad de salvar a las células B con escasez de BCR de la apoptosis, lo que evidencia su papel crucial en la transformación de los linfocitos B. En concordancia con esta conducta en la expresión génica, se observó que la mayoría de los casos del Linfoma Hodgkin clásico VEB positivo presentaban mutaciones en las células Reed Sternberg Hodgkin que impedían el desarrollo génico del BCR (Seifert et al., 2019).

Por lo anterior, también es fundamental realizar una evaluación adicional de marcadores

inmunohistoquímicos en las células de Reed Sternberg, Hodgkin y en el microambiente tumoral. Estos marcadores pueden ofrecer pautas para el tratamiento y valor pronóstico. Por ejemplo, la expresión baja de CD15, que se manifiesta con mayor moderación en las células neoplásicas de Reed-Sternberg y Hodgkin; o TARC (Thymus and activation-regulated chemokine), que solo se expresa en las células Reed Sternberg y Hodgkin, no en el microambiente tumoral. Se han vinculado ambos marcadores con la falla del tratamiento. Además, se ha observado que la expresión de PD-L1 (ligando de la proteína de muerte celular programada 1 o PD-1) en el microambiente tumoral al momento del diagnóstico se asocia la posibilidad de evolución a remisión completa (Diepstra et al., 2023; Han et al., 2020; Zijtregtop et al., 2022).

Los ARN no codificantes EBER, expresados de forma abundante en células con infección latente por el VEB, comprenden los transcritos EBER1 y EBER2, generados por la ARN polimerasa III. EBER1, localizado principalmente en el nucleoplasma, se ha identificado incluso en células B de memoria de portadores sanos. Aunque su expresión es elevada, la eliminación de EBER1 en la cepa B95-8 no altera la capacidad transformante del virus ni su persistencia en modelos murinos humanizados, lo que inicialmente dificultó determinar su función biológica. Investigaciones posteriores han evidenciado que EBER1 puede sustituir al ARN TMER4 del herpesvirus murino 68, facilitando la migración de células B infectadas en modelos inmunocompetentes, un efecto no observable en cultivo. Además, EBER1 interactúa con proteínas celulares como La y RPL22, influyendo en vías de control traduccional relacionadas con procesos hematopoyéticos y con el desarrollo de linfocitos T. También se ha demostrado su liberación a través de exosomas desde células B infectadas, donde puede activar TLR3 en células vecinas, sugiriendo una posible función extracelular en la modulación de la respuesta inmunitaria y en la evasión inmune del VEB (Farrell & Farrell, 2025; Iwakiri, 2014).

Por su parte, EBER2, igualmente expresado en todas las fases de latencia, es el segundo ARN viral más abundante. Estudios iniciales generaron resultados contradictorios sobre su contribución a la proliferación celular, discrepancias que posteriormente se atribuyeron a la señalización intensamente activadora de LMP1 en la cepa B95-8. Evidencia epidemiológica en carcinoma nasofaríngeo (NPC) señaló que variantes de EBER2 podrían aportar ventajas proliferativas in vivo (Farrell

& Farrell). En la actualidad se reconoce que EBER2 forma parte de un complejo ribonucleoproteico que regula la expresión génica mediante su interacción con factores de transcripción como PU.1. Además, de modular la transcripción de LMP2, se ha demostrado que potencia la expresión del gen celular UCHL1 al favorecer la liberación de la pausa transcripcional de la polimerasa. UCHL1 incrementa proteínas reguladoras del ciclo celular, como ciclina B1 y Aurora B. Variantes como M81, frecuentes en cepas asociadas al NPC, elevan significativamente la producción de Aurora B, fortaleciendo la progresión del ciclo celular y promoviendo la proliferación de las células infectadas por VEB (Farrell & Farrell, 2025; Fok et al., 2006; Iwakiri, 2014).

Estos micro ARN no codificantes contribuyen al escape inmunológico del tumor creando microambientes propicios para la aparición y avance de la neoplasia. En particular EBERs1 regula a la baja p53, EGR1 y STAT1, lo que suprime la transcripción de p21 cip1/waf1 y les confiere resistencia a la apoptosis provocada por fármacos en líneas celulares HL. Este fenómeno contribuye a la inmortalidad celular y se ha visto que en líneas celulares de Linfoma Hodgkin que son positivas para EBERs1; estas eran más resistentes a la muerte celular inducida por inhibidores de proteasoma o inhibidores de histona desacetilasa. Esta acción anti-apoptótica puede ser relevante para la preservación de células de Reed-Sternberg y para mantener la fase latente desde un punto de vista biológico (H. Li et al., 2025; Samanta & Takada, 2010; Shannon-Lowe et al., 2017; Liu et al., 2010).

Por otro lado, la presencia de antígenos virales y transcriptos como EBER1 en las células RS es el estándar principal para determinar la conexión entre el LH y el VEB (Alejandro, 2012). Es relevante indicar que los transcriptos EBERs, que se manifiestan a niveles tan elevados (aproximadamente un millón de copias por célula infectada latentemente), son reconocidos como el marcador natural más confiable de infección latente. La hibridación in situ (ISH) orientada a uno o a los dos EBER constituye el ensayo estándar de oro para establecer si la biopsia de un tumor está vinculada con el VEB. Los sistemas comerciales para EBER por hibridación in situ hacen más fácil que se implemente en los laboratorios clínicos. La positividad a VEB es del 40% en el Linfoma de Hodgkin, todos los subtipos. Sin embargo, en el Linfoma de Hodgkin con celularidad mixta es del 70%, el de esclerosis nodular tiene un 20%, el de depleción de linfocitos un 50% y el relacionado con SIDA supera el 95% (Gulley & Tang, 2008).

MATERIAL Y MÉTODOS

La población estudiada fueron biopsias parafinadas de casos de linfomas Hodgkin pediátrico, se investigó un total de 7 casos de LH, sin embargo, se procesaron un total 9 de biopsias parafinadas, ya que en 2 de los 7 casos estudiados de LH se logró obtener biopsias parafinadas por duplicado.

Los trabajos se realizaron en el Laboratorio de Virología y Cáncer del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, de la ciudad de Buenos Aires, Argentina y en el Laboratorio de Virología y Microbiología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador, El Salvador.

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

Desparafinado de biopsias: Previo a la ISH, las biopsias parafinadas de linfomas Hodgkin fueron sometidas a un proceso de desparafinación, por método manual basado en el método reportado por Pate y colaboradores (Patel et al., 2016) y otros métodos similares en el que se desparafina con xilol, se hidrata con etanol y se somete el tejido a digestión enzimática. La secuencia de desparafinado manual utilizado con tiempo y números de procesos fue la siguiente: Xilol (2 veces por 5 minutos), Etanol 100% (2 veces por 3 minutos), Etanol 96% (1 vez por 3 minutos), Agua destilada (3 veces por 3 minutos).

Detección de VEB por Hibridación in situ: Se emplearon sondas de RNA complementarias a EBERs conjugadas a una molécula antigénica fluoresceína o FITC (Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato), que hibrida a la secuencia blanco de interés. Para amplificar la señal de detección, fue necesario emplear un anticuerpo secundario contra el antígeno acoplado a la sonda, conjugado a fosfatasa alcalina (FA) y un sustrato que produce una reacción colorimétrica, por lo que se observara un precipitado de color café oscuro a nivel del núcleo. Al poner en contacto con el tejido, la sonda marcada junto con el anticuerpo secundario acoplado a FA y el sustrato de la FA, se pudo visualizar las células positivas a la secuencia de interés. Para este proceso se utilizó el Dako PNA ISH Detection Kit (Code K5201) con sondas de oligonucleótidos específicas para EBERs, marcadas con FITC y detectadas mediante anticuerpo anti-FITC conjugado con fosfatasa alcalina, además se utilizaron secciones de 2 micras de tejido parafinado fijado en láminas portaobjeto.

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

RESULTADOS

De las 7 muestras de ganglio con diagnóstico histopatológico de Linfoma de Hodgkin, dos se

estudiaron por duplicado. Debido a que no se tenía acceso a más datos clínicos patológicos de los pacientes, o si su estado era inmunosuprimido o inmunocompetente no se determinó el estadio clínico los linfomas, solamente se verificó el tipo histológico y el diagnóstico histopatológico de LH así como su localización, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

Histología y localización de todas las muestras de LH

Número de muestra de LH(LHM)	Tipo histológico	Localización
LHM 1-A	Celularidad mixta	Ganglionar
LHM 1-B	Celularidad mixta	Ganglionar
LHM 2	Celularidad mixta	Ganglionar
LHM 3	Esclerosis nodular	Ganglionar
LHM 4	Celularidad mixta	Ganglionar
LHM 5	Celularidad mixta	Ganglionar
LHM 6	Celularidad mixta	Ganglionar
LHM 7-A	Celularidad mixta	Ganglionar
LHM 7-B	Celularidad mixta	Ganglionar

Nota. Resultado de estudio histológicos de la biopsia posterior al ISH, se observó 6 muestras con celularidad mixta, 1 con esclerosis nodular.

Tabla 2

Hibridación in situ para pequeños AN virales -EBERs

Numero de muestra de LH	Resultado EBERs, presencia de VEB	Linfoma Hodgkin
LHM 1-A	Negativo	Positivo
LHM 1-B	Negativo	Positivo
LHM 2	Negativo	Positivo
LHM 3	Positivo	Positivo
LHM 4	Positivo	Positivo
LHM 5	Positivo	Positivo
LHM 6	Positivo	Positivo
LHM 7-A	Positivo	Positivo
LHM 7-B	Positivo	Positivo

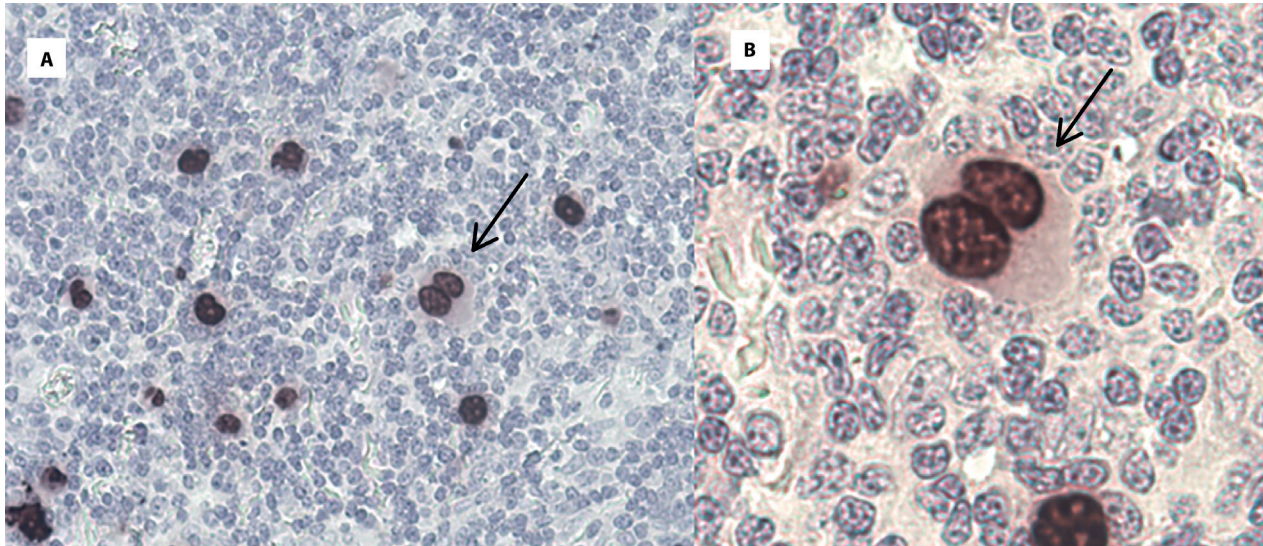
Nota. Hibridación in situ para pequeños ARN virales EBERs. Todas las muestras positivas a LH, 5 muestras positivas a ISH para VEB. * LHM (Muestra de Linfoma Hodgkin estudiada).

La expresión de EBERs en los Linfomas Hodgkin fue evidenciada por la marcación específica restringida al núcleo de las células tumorales y ausencia de la misma en los linfocitos normales del microambiente tumoral, se pudieron observar células Reed Stenberg característica de LH y en una de las muestras se

logró visualizar Popcorn cell o células en palomita de maíz positiva a EBERs que son células tumorales que también pueden observarse en LH (Ver figuras 1-2). Los LH negativos a EBERs se evidenciaron por el contrario por ausencia de marcación específica tanto en células tumorales, así como normales del microambiente tumoral (Ver figura-3).

Figura 1

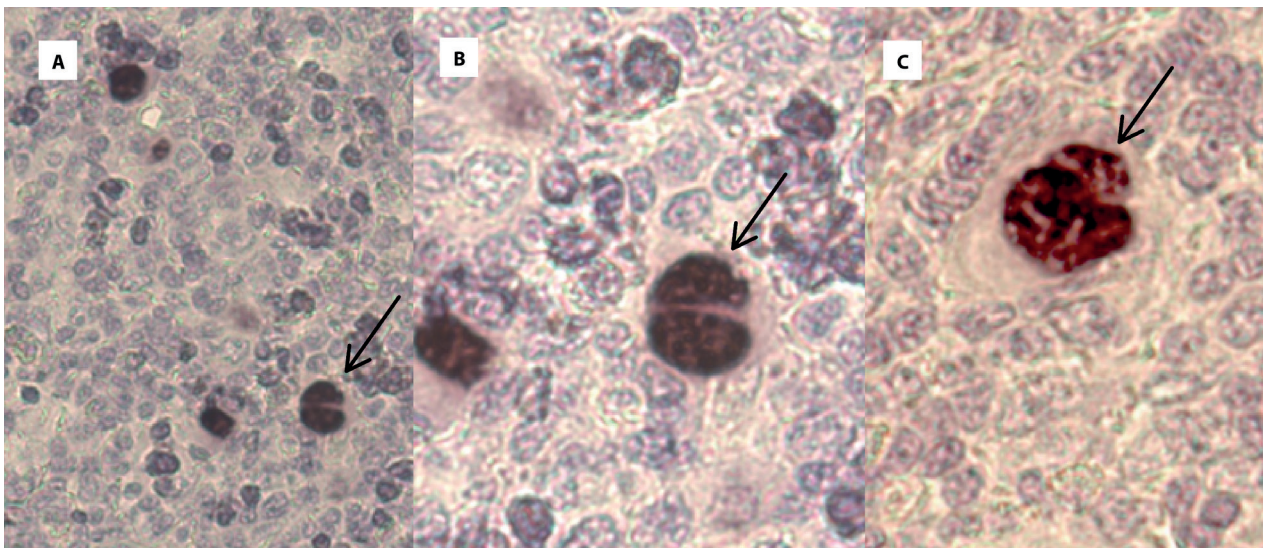
LHM 5 (EBERs positivo, HODGKIN positivo)



Nota. Figura 1: A) 40X. Linfoma Hodgkin con expresión de EBERs demostrada por la marcación específica restringida al núcleo de las células tumorales y ausencia de la misma en los linfocitos, al centro célula Reed Sternberg característica demostrando la presencia de pequeños RNAs codificados por VEB. B) 100X al centro célula Reed Sternberg característica demostrando la presencia de pequeños RNAs codificados por VEB. * LHM (Muestra de Linfoma Hodgkin estudiada).

Figura 2

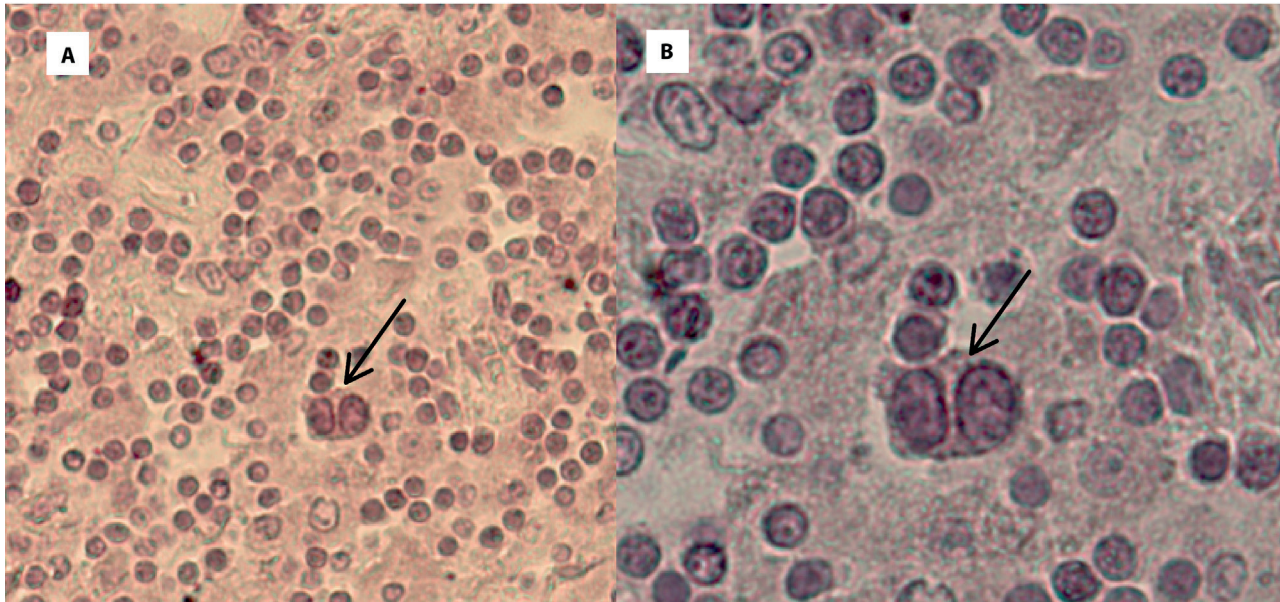
LHM6 (EBERs positivo, HODGKIN positivo)



Nota. Figura 2: A) 40X. Linfoma Hodgkin con expresión de EBERs demostrada por la marcación específica restringida al núcleo de las células tumorales y ausencia de la misma en los linfocitos, al centro célula Reed Sternberg característica demostrando la presencia de pequeños RNAs codificados por VEB. B) 100X célula Reed Sternberg demostrando la presencia de pequeños RNAs codificados por VEB. C) 100X. Popcorn cell positiva a EBERs (celulas tumorales tambien celulas en palomita de maiz caraceristica de un linfoma LH). * LHM (Muestra de Linfoma Hodgkin estudiada).

Figura 3

LHM 1-B (EBERs negativo, HODGKIN positivo)



Nota. Figura 3: A) 40X. Linfoma Hodgkin sin expresión de EBERs demostrada por la ausencia de marcación específica restringida al núcleo de células tumorales y linfocitos adyacentes. B) 100X. En la segunda imagen se puede observar se observa con mayor claridad célula de Reed-Sternberg característica de linfoma Hodgkin EBERs negativa. * LHM (Muestra de Linfoma Hodgkin estudiada).

DISCUSIÓN

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

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

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

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

En el caso del Linfoma Hodgkin VEB positivo se caracteriza por un perfil de expresión de latencia II, observándose proteínas EBNA-1, EBNA-LP, proteína de membrana latente (LMP) -1, -2A y -2B, EBER y BART

(Hui et al., 2019). A pesar que en el presente estudio no se evaluaron todos los marcadores característicos de latencia II en LH, el criterio fundamental para establecer la asociación del VEB con el LH es la presencia de transcriptos como EBER1 y antígenos virales en las células RS (Alejandro, 2012).

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

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

Adicionalmente en diversos estudios además del aporte que EBERs realiza en la oncogénesis, también los LH VEB positivos tenían una expresión más débil de p21 cip1 / waf1 y clínicamente, la supresión de p21 cip1 / waf1 en Linfoma Hodgkin VEB positivo predice un peor pronóstico, y la posibilidad de una mayor resistencia a la apoptosis inducida por fármacos, contexto que podría tener implicaciones terapéuticas y en los comportamientos clínicos de los HL. (H. Li et al., 2025; Samanta & Takada, 2010; Shannon-

Lowe et al., 2017 ; Liu et al., 2010). Clínicamente, el comportamiento descrito para la supresión de p21cip1/waf1 en EBV+ HL se asoció con una peor tasa de supervivencia libre de enfermedad a 2 años (45 % para EBV+ HL versus 77 % para EBV- HL, $p = 0,002$) (Liu et al., 2010).

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

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

CONCLUSIONES

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

Limitaciones del estudio

La cantidad limitada de muestras analizadas puede restringir la extrapolación de los resultados a toda la población pediátrica afectada por LH en la región. La carencia de información clínica detallada sobre la condición inmunológica y evolución de los pacientes dificulta la evaluación de la relación entre la infección por VEB y el pronóstico. El diseño transversal del

estudio impide establecer una relación causal definitiva entre la infección viral y el desarrollo del linfoma. No se llevaron a cabo análisis adicionales de proteínas virales, como LMP1 o EBNA1, que podrían aportar información valiosa sobre el comportamiento del virus en las células malignas.

Perspectivas en próximos trabajos

En futuros estudios sería importante ampliar el número de casos y abarcar distintas localidades centroamericanas para obtener datos más representativos y sólidos sobre la epidemiología del VEB. Además, será muy importante incorporar variables clínicas e inmunológicas en futuros estudios para profundizar en la comprensión del impacto de VEB en la evolución de la enfermedad, de igual forma se deben incluir técnicas moleculares complementarias que permitan evaluar la expresión de proteínas virales y otros marcadores que contribuyan a entender mejor la oncogénesis viral.

Declaración de ética

La investigación con las biopsias parafinadas de LH infantil fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom, El Salvador. De igual forma, el proyecto de investigación fue aprobado para su ejecución por la Universidad de El Salvador.

Expresiones de gratitud

A la unidad de cáncer y unidad de patología del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom, El Salvador. Al Laboratorio Virología y Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador, El Salvador, al Laboratorio de Virología y Cáncer del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, de la ciudad de Buenos Aires, Argentina por el apoyo en el entrenamiento, procesamiento y análisis de resultados. Especial agradecimiento a la Red Iberoamericana de Linfomas-RIALCYTED por la gestión para el entrenamiento en diagnóstico molecular de VEB en Linfomas.

REFERENCIAS

Aggarwal, P., & Limaem, F. (2025). *Células de Reed-Sternberg Introducción*. 6–13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542333/>

Alejandro, M. (2012). *Caracterización de variantes del virus de Epstein Barr en la infección aguda en pacientes pediátricos y su comparación con linfomas pediátricos EBV +*.

Begić, V., Korać, P., Gašparov, S., Rozman, M., Simicic, P., & Zidovec-Lepej, S. (2022). Molecular Characterisation

of Epstein-Barr Virus in Classical Hodgkin Lymphoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24). <https://doi.org/10.3390/ijms232415635>

Beltramino, M., Calmet, R., & Gatica Valdes, M. (2005). Virus de Epstein-Barr y su relación con el desarrollo de enfermedades linfoproliferativas. *Hematología* (B. Aires), 8, 39–54.

Bröckelmann, P. J., Eichenauer, D. A., Jakob, T., Follmann, M., Engert, A., & Skoetz, N. (2018). Clinical practice guideline: Hodgkin lymphoma in adults—diagnosis, treatment, and follow-up. *Deutsches Arzteblatt International*, 115(31–32), 535–540. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0535>

Diepstra, A., Nolte, I. M., van den Berg, A., Magpantay, L. I., Martínez-Maza, O., & Levin, L. I. (2023). Elevated serum TARC levels precede classic Hodgkin lymphoma diagnosis by several years. *Blood*, 142(22), 1928–1931. <https://doi.org/10.1182/blood.2023020959>

Farrell, P. J., & Farrell, P. J. (2025). Epstein – Barr virus functional RNAs as part of its immune evasion strategy: a role for EBER1? December. <https://doi.org/10.1098/rsob.250088/2811425/rsob.250088.pdf>

Fok, V., Friend, K., & Steitz, J. A. (2006). Epstein-Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *Journal of Cell Biology*, 173(3), 319–325. <https://doi.org/10.1083/jcb.200601026>

Gulley, M. L., & Tang, W. (2008). Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *Journal of Molecular Diagnostics*, 10(4), 279–292. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.080023>

Haleem Abusalah, et al. (2024). Recent Advances in Diagnostic Approaches for Epstein-Barr Virus. *Journal Pathogens*, 10(10), 1–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/pathogens9030226>

Han, Y., Liu, D., & Li, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American Journal of Cancer Research*, 10(3), 727–742. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32266087>

Hui, K. F., Yiu, S. P. T., Tam, K. P., & Chiang, A. K. S. (2019). Viral-targeted strategies against EBV-associated lymphoproliferative diseases. *Frontiers in Oncology*, 9(FEB), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00081>

Iwakiri, D. (2014). Epstein-Barr virus-encoded RNAs: Key molecules in viral pathogenesis. *Cancers*, 6(3), 1615–1630. <https://doi.org/10.3390/cancers6031615>

Ko, Y. H. (2015). Editorial: EBV and human cancer. *Experimental and Molecular Medicine*, 47(1), e130–3. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.109>

- Li, H., Lee, C. Y., & Delecluse, H. J. (2025). Epstein-Barr virus lytic replication and cancer. *Current Opinion in Virology*, 70, 101438. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2024.101438>
- Liu, T. Y., Wu, S. J., Huang, M. H., Lo, F. Y., Tsai, M. H., Tsai, C. H., Hsu, S. M., & Lin, C. W. (2010). EBV-positive Hodgkin lymphoma is associated with suppression of p21cip1/waf1 and a worse prognosis. *Molecular Cancer*, 9, 1-12. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-32>
- Mautner, J. (2018). Clinical implications of Epstein-Barr virus strain diversity. *Journal of Immunological Sciences*, 2(3), 51-55. <https://doi.org/10.29245/2578-3009/2018/3.1145>
- Murata, T., Sugimoto, A., Inagaki, T., Yanagi, Y., Watanabe, T., Sato, Y., & Kimura, H. (2021). Molecular basis of Epstein-Barr virus latency establishment and lytic reactivation. *Viruses*, 13(12), 1-20. <https://doi.org/10.3390/v13122344>
- Nagpal, P., Akl, M. R., Ayoub, N. M., Tomiyama, T., Cousins, T., Tai, B., Carroll, N., Nyrenda, T., Bhattacharyya, P., Harris, M. B., Goy, A., Pecora, A., & Suh, S. S. (2016). Pediatric Hodgkin lymphoma- biomarkers, drugs, and clinical trials for translational science and medicine. *Oncotarget*, 7(41), 67551-67573. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11509>
- Patel, P. G., Selvarajah, S., Boursalieu, S., How, N. E., Ejdelman, J., Guerard, K. P., Bartlett, J. M., Lapointe, J., Park, P. C., Okello, J. B. A., & Berman, D. M. (2016). Preparation of formalin-fixed paraffin-embedded tissue cores for both RNA and DNA extraction. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(114), 1-10. <https://doi.org/10.3791/54299>
- Samanta, M., & Takada, K. (2010). Modulation of innate immunity system by Epstein-Barr virus-encoded non-coding RNA and oncogenesis. *Cancer Science*, 101(1), 29-35. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01377.x>
- Seifert, M., Scholtysik, R., & Küppers, R. (2019). Origin and pathogenesis of B cell lymphomas. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1956). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9151-8_1
- Shannon-Lowe, C., & Rickinson, A. (2019). The Global Landscape of EBV-Associated Tumors. *Frontiers in Oncology*, 9(August), 1-23. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00713>
- Shannon-Lowe, C., Rickinson, A. B., & Bell, A. I. (2017). Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1732). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0271>
- Smatti, M. K., Al-Sadeq, D. W., Ali, N. H., Pintus, G., Abou-Saleh, H., & Nasrallah, G. K. (2018). Epstein-Barr virus epidemiology, serology, and genetic variability of LMP-1 oncogene among healthy population: An update. *Frontiers in Oncology*, 8(JUN). <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00211>
- Song, H., Lim, Y., Im, H., Bae, J. M., Kang, G. H., Ahn, J., Baek, D., Kim, T. Y., Yoon, S. S., & Koh, Y. (2019). Interpretation of EBV infection in pan-cancer genome considering viral life cycle: LiEB (Life cycle of Epstein-Barr virus). *Scientific Reports*, 9(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39706-0>
- Yu, H., & Robertson, E. S. (2023). Epstein-Barr Virus History and Pathogenesis. *Viruses*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/v15030714>
- Zhang, Y., Lyu, H., Guo, R., Cao, X., Feng, J., Jin, X., Lu, W., & Zhao, M. (2023). Epstein-Barr virus-associated cellular immunotherapy. *Cytotherapy*, 25(9), 903-912. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2023.04.003>
- Zijtregtop, E. A. M., Tromp, I., Dandis, R., Zwaan, C. M., Lam, K. H., Meyer-Wentrup, F. A. G., & Beishuizen, A. (2022). The Prognostic Value of Eight Immunohistochemical Markers Expressed in the Tumor Microenvironment and on Hodgkin Reed-Sternberg Cells in Pediatric Patients With Classical Hodgkin Lymphoma. *Pathology and Oncology Research*, 28(August), 1-8. <https://doi.org/10.3389/pore.2022.1610482>