

CIRCULACION DEL VIRUS HERPES 6 HUMANO EN ADULTOS NORMALES Y EN PACIENTES ONCOLOGICOS

**SILVIA E. CARRICART¹, DOLORES A. BUSTOS^{2*}, SERGIO L. GRUTADAURIA¹, SILVIA V. NATES¹, JUAN J. GARCIA³,
MARIA R. YACCI⁴, HECTOR GENDELMAN⁵, JORGE V. PAVAN²**

¹ Instituto de Virología Dr. J Vanella y ² Cátedra de Bacteriología y Virología Médicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba; ³ Servicio de Oncohematología, Hospital Privado de Córdoba; ⁴ Instituto de Demografía y Estadística, Facultad de Ciencias Económicas; ⁵ Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba

Resumen El objetivo del trabajo fue conocer la prevalencia de anticuerpos para el virus herpes 6 humano en la población general y estudiar su circulación en individuos con neoplasias a fin de analizar su participación en procesos linfoproliferativos. Se estudiaron 200 muestras de sueros de una población general y 67 muestras de sueros de pacientes con enfermedad neoplásica, los que fueron divididos en: linfomas/mielomas, leucemias y cánceres sólidos de origen no inmune. La determinación de anticuerpos de tipo IgG e IgM fue realizada por inmunofluorescencia indirecta y la detección de ácidos nucleicos mediante una PCR en suero. La prevalencia de la infección por HHV-6 en la población de adultos sanos fue 63.5% con una MGT de anticuerpos de 48.67 ± 1.23 . De esta muestra se obtuvo un grupo control por muestreo sistemático. En la muestra de pacientes con enfermedad neoplásica la prevalencia fue 95.5%. La MGT de anticuerpos en el grupo linfomas/mielomas fue 268.73 ± 1.62 ; en el grupo leucemias 151.17 ± 1.88 y el grupo cánceres sólidos de origen no inmune 95.67 ± 1.57 . Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$) entre el grupo control y los grupos linfomas/mielomas y leucemias. En ninguna de las muestras se detectó la presencia de anticuerpos específicos de tipo IgM ni ácidos nucleicos virales libres en el suero. La prevalencia encontrada en la población general señala la importante circulación de un virus linfotrópico, que podría contribuir de un modo indirecto a la patogénesis de la enfermedad linfoproliferativa.

Palabras clave: HHV-6, Ig G, seroprevalencia, cancer, linfomas, mielomas, leucemias

Abstract *Human herpesvirus-6 circulation in healthy adults and oncologic patients.* The aim of this paper was to assess the prevalence of antibodies to HHV-6 in the general population and study the virus circulation among individuals with cancer, in order to analyze HHV-6 involvement in lymphoproliferative disorders. A total of 200 sera from the general population and 67 from patients with neoplasia were studied. The latter were divided in 3 groups: lymphoma/myeloma, leukemia and non-immune solid tumors. HHV-6 antibodies (IgG and IgM) were assayed by IFA and viral genomes were detected using nested PCR. The prevalence of the infection in the healthy population was 63.5% with a titer geometric mean (TGM) of 48.67 ± 1.23 . A control group was obtained by systematic sampling of the healthy population. Among the patients with neoplasia, the prevalence was 95.5%. In the lymphoma/myeloma group, TGM was 268.73 ± 1.62 ; in the leukemia group it was 151.1 ± 1.88 and in the non-immunogenic solid tumors group it was 95.67 ± 1.57 . Statistically significant differences were observed ($p < 0.01$) between the control group and the lymphoma/myeloma and leukemia groups. Serum IgM or free viral genomes were not detected in any serum sample. The antibody prevalence found in the general population documents the high circulation of this lymphotropic virus which could indirectly contribute to the pathogenesis of the lymphoproliferative disorder.

Key words: HHV-6, serologic prevalence, cancer, lymphoma, myeloma, leukemia

El virus herpes 6 humano (HHV-6) es un virus emergente, aislado por primera vez en 1986 a partir de un

cultivo de linfocitos de sangre periférica de pacientes con enfermedades linfoproliferativas¹. Pertenece a la familia Herpesviridae, cuyos miembros son estructuralmente similares y la mayoría son capaces de producir infecciones persistentes. Se han identificado dos variantes: HHV-6 A y HHV-6 B que parecieran ocupar nichos ecológicos diferentes². El virus tiene un particular tropismo hacia las poblaciones linfocitarias, aun cuando su receptor celular, la molécula CD 46, le permitiría acceder a una am-

Recibido: 26-IX-2001

Aceptado: 31-X-2001

* Becaria de la Agencia Córdoba Ciencia Sociedad del Estado

Dirección postal: Dr. Jorge Victorio Pavan, Cátedra de Bacteriología y Virología Médicas, UNC, Santa Rosa 1095. Alberdi, 5000 Córdoba, Argentina
Fax: (54-0351) 4332023 e mail: jpavan@mater.fcm.unc.edu.ar

plia variedad de células³. En la historia natural de la infección por HHV-6 pueden reconocerse tres momentos. El primero de ellos es la infección primaria caracterizada por un modelo agudo de replicación viral. El virus transmitido a través de la saliva, comienza a replicarse en las glándulas salivales del nuevo huésped. Desde este sitio se produce una fase virémica que lo disemina a numerosos órganos como el sistema nervioso central, la piel, los riñones, los pulmones, los nódulos linfáticos, la médula ósea y los clones celulares del sistema inmune: linfocitos T, monocitos y células *natural killer*. En la Provincia de Córdoba, Argentina, los anticuerpos maternos protegen al niño de la infección durante el primer año de vida. La primoinfección ocurre entre los 12 y los 15 meses de edad, con una prevalencia de anticuerpos en la población infantil del 63.46% y una media geométrica del título de anticuerpos (MGT) de 34.53⁴.

Se inicia luego el segundo momento, en donde el huésped no presenta sintomatología alguna y el HHV-6 permanece infectando crónicamente con un bajo nivel de replicación, limitado a las glándulas salivales, y de un modo latente sin replicación activa en las poblaciones linfocitarias⁵. El tercer momento se caracteriza por la reactivación del virus desde los sitios de persistencia. En este momento se ubica también su posible papel etiológico en enfermedades linfoproliferativas. La capacidad de transformación celular del ADN de HHV-6 ha sido demostrada *in vitro*, en experimentos de transfección del ácido nucleico viral en células NIH3T3 y en queratinocitos humanos⁶. Altos títulos de anticuerpos para HHV-6 han sido detectados en linfomas Hodgkin y no Hodgkin así como en leucemias^{7,8}. La expresión de antígenos virales ha sido demostrada en tejido linfoide de enfermedades linfoproliferativas y en las células de Reed-Sternberg⁹.

En nuestro medio no existen datos que caractericen el segundo y tercer momento de la infección por HHV-6,

es decir, la infección latente con un bajo nivel de actividad replicativa en población general y su posible papel en enfermedades linfoproliferativas.

Se estudió una muestra de la población adulta sana para conocer la prevalencia de la infección por HHV-6 y un grupo de pacientes con enfermedades neoplásicas, a fin de caracterizar en éstos, la actividad viral a través de la presencia de anticuerpos específicos y del ADN viral en suero.

Materiales y métodos

Se incluyeron un total de 200 muestras de sueros pertenecientes a una población de adultos sanos que concurren al Banco de Sangre del Hospital de Clínicas de la Ciudad de Córdoba. A partir de esta muestra se obtuvo un grupo control por un muestreo sistemático (n:21) de la población positiva para anticuerpos-anti HHV-6. El rango de edades fue de 18 a 55 años.

De la población con enfermedad neoplásica se recolectaron 67 muestras de sueros de pacientes que fueron divididos en 3 grupos: 1) Grupo linfomas/mielomas, n: 21; 2) Grupo leucemias, n: 23; 3) Grupo cánceres sólidos de origen no inmune, n: 23 (Tabla 1). Estas muestras fueron recolectadas durante el período 1998-1999 en el Servicio de Oncohematología del Hospital Privado de Córdoba.

La determinación de anticuerpos de tipo IgG se realizó por inmunofluorescencia indirecta (IFI) en todas las muestras. Los anticuerpos de tipo IgM y la amplificación de ácidos nucleicos virales fueron realizadas en las muestras que requerían caracterizar actividad replicativa, es decir en la muestra de pacientes con enfermedad neoplásica. Se realizaron improntas a partir de cultivos de una línea celular linfoblastoide Molt-3, infectada con el HHV-6 variante B, cepa Z29, las que fueron cedidas por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (CDC) USA. Se realizaron diluciones geométricas de cada suero problema a partir de la dilución 1:10. Se incluyeron controles positivo y negativo provistos por el CDC, Atlanta.

Para la detección de IgM específica anti HHV-6 se trataron las muestras con precipitador de IgG/Factor reumatoideo (The Binding Site) y sembrando una dilución 1:20.

El ADN viral libre en suero fue purificado según la técnica descrita por R.Boom y col.¹⁰ y amplificado en una PCR de tipo

TABLA 1.- Características de los pacientes con enfermedades oncológicas

Linfomas/mielomas	n:21	Leucemias	n:23	Cánceres sólidos no inmunes	n:23
L. Hodgkin	8	L. linfoblástica aguda	12	Cáncer de mama	5
L. no Hodgkin	6	L. mieloblástica aguda	5	Seminoma testicular	2
Mieloma múltiple	7	L. mielóide crónica	6	Tumor neuroectodérmico	1
				Osteopetrosis	1
				Osteosarcoma	3
				Cáncer de colon	4
				Adenocarcinoma de pulmón	2
				Sarcoma de Ewing	1
				Neuroblastoma	2
				T. cél. germinales SNC	1
				Retinoblastoma	1

“Nested”. La región amplificada correspondió a una zona altamente conservada del gen de la proteína mayor de la cápside. Un par de primers externos (Ex1 y Ex2) amplificó una secuencia de 520 pb. Un segundo par de primers internos (In3 e In4) correspondió a un fragmento de 258 pb¹¹. Los primers fueron provistos liofilizados, desalados y purificados (Genemed Synthesis, Inc.). La sensibilidad de la técnica fue de al menos 10 copias, determinada utilizando varias diluciones del plásmido pIS6 con el inserto de HHV-6, provisto por P. Secchiero y col¹¹.

Se realizó un análisis de varianza considerando como variable dependiente los títulos de anticuerpos IgG anti HHV-6, y como variable independiente los diferentes grupos analizados. Para dicho análisis los datos de la variable dependiente, fueron transformados a logaritmo en base dos. Se calculó la MGT de anticuerpos y los resultados se expresan como el antilogaritmo. Para identificar los grupos que presentaban diferencias significativas se realizó el test de comparación de medias de Student-Newman (S-NK test).

Resultados

La prevalencia de la infección por HHV-6 en la población de adultos sanos fue 63.5% (127/200) con una MGT de anticuerpos de 48.67 ± 1.23 . El grupo control (n: 21) tuvo una MGT de 50.39. En la muestra de pacientes con enfermedad neoplásica, el valor para la prevalencia fue 95.5% (94/97). La MGT de anticuerpos en el grupo linfomas/mielomas fue 268.73 ± 1.62 ; en el grupo leucemias 151.17 ± 1.88 y el grupo cánceres sólidos de origen no inmune 95.67 ± 1.57 . Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$) entre el grupo control y los grupos linfomas/mielomas y leucemias con un rango ≥ 1.14 (S-NK test). Mientras que el grupo cánceres sólidos de origen no inmune arrojó valores similares al grupo control (Gráfico 1).

En ninguna de las muestras se detectó la presencia de anticuerpos específicos de tipo IgM ni ácidos nucleicos virales libres en el suero.

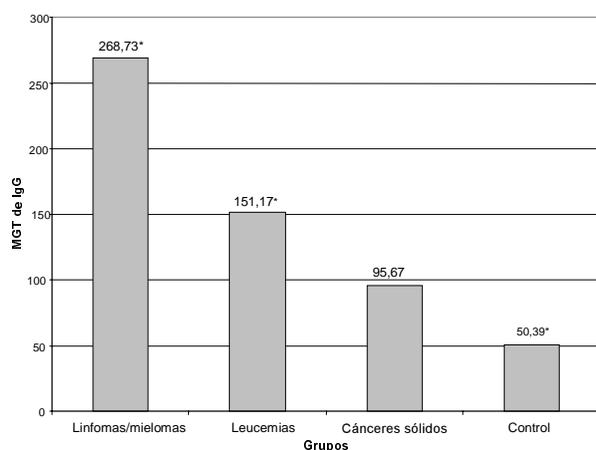


Fig.1.– MGT de IgG de los grupos de pacientes oncológicos y del grupo control. * Diferencias significativas ($p \leq 0.01$) entre el grupo control, el grupo linfomas/mielomas y el grupo leucemias; con un rango >1.14 (S-NK test).

Discusión

La infección por HHV-6 está ampliamente distribuida en el mundo. A los 13 meses de edad entre el 64 y el 83% de los niños poseen anticuerpos contra el virus, mientras que en países como Japón y China la cifra se eleva al 100%⁸. En nuestro medio la prevalencia encontrada es el 63.5%, similar tanto en adultos normales como en niños a la edad de la primoinfección, la que se ubicaría entre los 13 y 15 meses de edad⁴. Para mantener esta prevalencia desde la niñez hasta la edad adulta es probable que el virus persista en algunas poblaciones celulares ubicadas en sitios estratégicos, como las glándulas salivales, lo que además posibilitaría la circulación y transmisión entre adultos infectados y niños susceptibles.

En el modelo de persistencia de un virus ampliamente diseminado en la población es difícil atribuirle un papel patogénico en las enfermedades neoplásicas. Los niveles de anticuerpos específicos para HHV-6 podrían considerarse indicativos de un gradiente de la actividad biológica viral y que permitirían definir algunos criterios serológicos de causalidad¹². Las diferencias encontradas entre las MGT del grupo mielomas/linfomas y del grupo leucemias respecto al grupo control, señalan que en individuos con patologías linfoideas hay una elevada actividad replicativa viral. Esta importante actividad replicativa no parece relacionarse a la inmunodepresión o con la enfermedad neoplásica en general, pues los valores alcanzados por el grupo cánceres sólidos de origen no inmune son similares a los de la población normal. La actividad replicativa también podría caracterizarse por el acceso a sangre de partículas virales libres. Sin embargo, no se detectaron ácidos nucleicos virales en suero aun cuando la sensibilidad de la técnica de PCR utilizada permitió amplificar hasta 10 copias del genoma viral. Esto podría explicarse al considerar que la actividad viral responsable de los altos títulos de IgG en la reactivación estaría limitada a glándulas salivales o con viremias muy fugaces neutralizadas rápidamente por los anticuerpos circulantes. La respuesta de tipo IgM es un aspecto controvertido en las reactivaciones de los virus integrantes de la familia Herpesviridae^{13,14}. La ausencia de anticuerpos de tipo IgM en los pacientes estudiados coincide con lo descrito por Pellet y col¹⁵.

Estos resultados son los primeros aportes de la circulación del virus herpes 6 humano en adultos normales y en pacientes oncológicos en nuestro medio. El análisis en este último grupo, parece sugerir que el HHV-6 podría contribuir a la patogénesis de la enfermedad linfoproliferativa, quizás de un modo indirecto, ya sea expandiendo clones linfocitarios transformados, interactuando con otros factores oncogénicos o bien estimulando la proliferación celular. Esta estimulación de las células linfoideas les permitirían acumular múltiples cambios y situarse en la primera etapa de una transformación maligna.

Agradecimientos: Agradecemos al Dr. Giuseppe Barbanti-Brodano y a la Dra Paola Secchiero por el envío de los plásmidos con el inserto de HHV-6. Agradecemos al Dr. Philip E Pellet y a Kathleen Kite-Powell del Atlanta Center for Disease Control, por el envío de células y virus HHV-6. Este trabajo se llevó a cabo con subsidios de CONICOR y SeCyt Universidad Nacional de Córdoba.

Bibliografía

1. Salahudin SZ, Ablashi DV, Markham PD, et al. Isolation of a new virus HBLV, en patients with lymphoproliferative disorders. *Science*, 1986; 234: 596-601.
2. Campadelli-Fiume G, Mirandola P, Menotti L. Human herpesvirus 6: An emerging pathogen. *Emerg Infect Dis*, 1999; 5: 353-66.
3. Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 1999; 99: 817-27.
4. Alessio Lax A, Carricart SE, Bustos D, et al. Loss of maternally derived human herpesvirus 6 immunity and natural infection in Argentinian infants. *Int J Infect Dis* 2001; 5: 1-3.
5. Aberle SW, Mandl CW, Kunz C, Popow-Kraupp T. Presence of HHV-6 variant A y B in saliva and peripheral blood mononuclear cells of healthy adults. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3223-5.
6. Kashanchi F, Araujo J, Doniger J, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) ORF-1 transactivating gene exhibits malignant transforming activity and its protein binds to p53. *Oncogene* 1997; 14: 359-67.
7. Levine PH, Ebbesen P, Dharam V, et al. Antibodies to human herpes virus-6 and clinical course in patients with Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1992; 51: 53-57.
8. Braun DK, Domínguez G, Pellett PE. Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 521-67.
9. Luppi M, Barozzi P, Garber R, et al Expression of human herpesvirus-6 antigens in benign and malignant lymphoproliferative diseases. *Am J Pathol* 1998; 153: 815-23.
10. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 495-503.
11. Secchiero P, Carrigan DR, Asano Y, et al. Detection of human herpesvirus-6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1995; 171: 273-80.
12. Evans AS, Kaslow RA. *Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control.* New York: Plenum Medical Book Company, 1997.
13. Wiedbrauk DL, Johnston SLG. *Manual of Clinical Virology.* New York: Raven Press, 1993.
14. Carrigan DR, Knox KK. Human herpesvirus 6: diagnosis of active infection. *Am Clin Lab* 2000; 19: 12.
15. Pellett PE, Black JB. Human Herpesvirus 6. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al (eds) *Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996; 2587-602.

Toda obra grande es el fruto de la paciencia y de la perseverancia, combinadas con una atención orientada tenazmente, durante meses y aun años, hacia un objeto particular. Así lo han confesado sabios ilustres al ser interrogados tocante al secreto de sus creaciones. Newton declaraba que sólo pensando siempre en la misma cosa había llegado a la soberana ley de la atracción universal; de Darwin refiere uno de sus hijos que llegó a tal concentración en el estudio de los hechos biológicos relacionados con el gran principio de la evolución, que se privó durante muchos años y de modo sistemático de toda lectura y meditación extrañas al blanco de sus pensamientos; en fin, Buffon no vacilaba en decir que "el genio no es sino la paciencia extremada". Suya es también esta respuesta a los que le preguntaban cómo había conquistado la gloria: "Pasando cuarenta años de mi vida inclinado sobre mi escritorio". En fin, nadie ignora que Mayer, el genial descubridor del principio de la conservación y transformación de la energía, consagró a esta concepción toda su vida.

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)

Reglas y Consejos sobre Investigación Científica.
Los tónicos de la voluntad. 7º edición, Madrid, 1935, p 71