

Virus de Epstein-Barr y su relación con el desarrollo del cáncer

Ángela Patricia Medina-Ortega^{1,4}, David López-Valencia^{1,4}, Sara Lucía Mosquera-Monje^{1,4},
Diana Lorena Mora-Obando^{2,4}, Rosa Amalia Dueñas-Cuéllar^{3,4}

RESUMEN

El virus de Epstein-Barr (VEB) es un agente infeccioso que tiene tropismo por células linfoides y ocasionalmente por células epiteliales. La Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (IARC, por su sigla en inglés) lo clasificó hace 20 años como carcinógeno de tipo I, porque durante la infección latente expresa diferentes proteínas o micro-ARN con capacidad oncogénica, por lo que las células infectadas tendrían el potencial de desarrollar cáncer. Esto se ha demostrado en algunos tipos de cáncer como linfomas, carcinoma nasofaríngeo y cáncer gástrico, mientras que la asociación no es completamente clara en los cánceres de mama y pulmón. La presente revisión describe, profundiza y analiza la relación del VEB con dichos tipos de cáncer, así como los métodos diagnósticos empleados para su detección. Finalmente, se plantean preguntas cuyas respuestas podrían contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la relación VEB-cáncer.

PALABRAS CLAVE

Cáncer; Epstein-Barr; Herpes; Virus

¹ Estudiante de Medicina, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.

² Magíster en Ciencias Biomédicas con énfasis en Bioquímica y Fisiología celular, Departamento de Patología, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.

³ Doctora en Ciencias Biológicas con énfasis en Biología molecular, Departamento de Patología, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.

⁴ Grupo de Investigación en Inmunología y Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.

Correspondencia: Rosa Amalia Dueñas Cuéllar; raduenasc@unicauca.edu.co

Recibido: febrero 17 de 2016

Aceptado: agosto 12 de 2016

Cómo citar: Medina-Ortega AP, López-Valencia D, Mosquera-Monje SL, Mora-Obando DL, Dueñas-Cuéllar RA. Virus de Epstein-Barr y su relación con el desarrollo del cáncer. *Iatreia*. 2017 Abr-Jun;30(2):131-145. DOI 10.17533/udea.iatreia.v30n2a03.

SUMMARY

Relationship between Epstein-Barr virus and cancer development

Epstein-Barr virus (EBV) is an infectious agent with tropism for lymphoid cells and occasionally for epithelial cells. Twenty years ago it was classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as type I carcinogen, because during latent infection it expresses different proteins or micro-RNAs with oncogenic ability, so that infected cells could potentially develop cancer. This association has been shown in some cancers such as lymphoma, nasopharyngeal carcinoma and gastric cancer, while the association has not been completely clear in breast and lung cancer. This review describes, deepens and analyzes the relationship between EBV and the aforementioned types of cancer, as well as diagnostic methods for its detection. Finally, this paper poses different questions whose answers could contribute to understand the molecular mechanisms involved in the EBV-cancer relationship.

KEY WORDS

Cancer; Epstein-Barr; Herpes; Virus

RESUMO

O Vírus de Epstein-Barr e sua relação com o desenvolvimento do câncer

O vírus de Epstein-Barr (VEB) é um agente infeccioso que tem tropismo pelas células linfóides e, ocasionalmente, por células epiteliais. A Agência Internacional de Investigação do Câncer (IARC, por sua sigla do Inglês) classificou-o há 20 anos como substância cancerígena tipo I, devido a que durante a infecção latente expressa diferentes proteínas ou micro-ARN com capacidade oncogênica, de modo que as células infectadas têm o potencial de desenvolver câncer. Isto tem sido demonstrado em alguns tipos de câncer tais como linfomas, carcinoma da nasofaringe e câncer gástrico, enquanto que a associação não é inteiramente claro nos câncer da mama e do pulmão. Esta revisão descreve, analisa e aprofunda a relação do VEB com os mencionados tipos de câncer, bem como os métodos de diagnóstico para a sua detecção.

Finalmente, planteiam se questões cujas respostas poderiam contribuir na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na relação VEB-câncer.

PALAVRAS CHAVE

Câncer; Epstein-Barr; Herpes; Vírus

INTRODUCCIÓN

Existen más de 100 agentes infecciosos pertenecientes a la familia Herpesviridae, que se divide en tres subfamilias: Alfa-, Beta- y gamma-herpesviridae, esta última incluye el herpesvirus humano tipo 4 o virus de Epstein-Barr (VEB) que tiene un acentuado tropismo por linfocitos B, aunque también puede infectar células T, NK y epiteliales (1-3).

Según la estadística mundial, en países en vías de desarrollo 90 % de los niños se infectan con VEB desde edades tempranas (menos de 3 a 16 años); mientras que en países desarrollados, la infección primaria se presenta en más del 50 % de los casos a edades más tardías (adolescencia y adultez) (4-7). En Colombia, y concretamente en el departamento del Cauca, no existen cifras sobre la epidemiología del VEB. Lo que refleja un vacío de conocimiento en este asunto de salud pública y la importancia de abordar este problema en nuestra región.

El VEB se transmite de persona a persona por contacto con la saliva durante el beso, por la sangre, el contacto sexual, los trasplantes o la vía perinatal (7). La mayoría de las personas toleran la infección durante toda la vida, sin consecuencias adversas para la salud, porque el sistema inmune controla la producción de viriones (8); sin embargo, el virus se puede reactivar periódicamente, como resultado de la alteración en la inmunidad celular (9). Durante la infección crónica activa se detectan títulos elevados de anticuerpos contra antígenos de la cápside viral y antígenos tempranos del VEB, así como una gran cantidad de ADN y ARN del virus; además, histológicamente son evidentes la linfadenitis, hemofagocitosis, meningoencefalitis o hepatitis persistente (10). El cuadro clínico varía según el estado inmunitario del hospedero; la infección primaria en niños inmunocompetentes suele ser asintomática, y en adolescentes y adultos jóvenes las manifestaciones clínicas corresponden

principalmente a mononucleosis infecciosa (MI) (4,11,12).

Desde 1970 se han publicado investigaciones sobre la relación entre VEB y cáncer (13); la recopilación de estos resultados llevó a la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por su sigla en inglés) y a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a clasificarlo como agente carcinógeno de tipo I (14). Esta revisión recopila, expone y analiza los antecedentes que relacionan la presencia del VEB con el desarrollo de linfomas, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de mama, cáncer gástrico y cáncer de pulmón; además, informa sobre las técnicas moleculares ideales para identificar el virus en pacientes con cáncer. Se espera despertar en el lector el interés por profundizar en este campo, teniendo en cuenta que las investigaciones son escasas en Colombia y principalmente en el departamento del Cauca. Por otra parte, debido a que la relación VEB-cáncer es un punto crítico de discusión, el reconocimiento temprano de esta interacción podría mejorar el tratamiento y el pronóstico del paciente con cáncer.

ASOCIACIÓN DEL VIRUS DE EPSTEIN-BARR CON CÁNCER

En las últimas décadas se ha logrado demostrar la causalidad y los mecanismos por los cuales algunos virus pueden llevar al desarrollo de cáncer; el VEB no ha sido la excepción, y como resultado, se han propuesto nuevas estrategias preventivas y terapéuticas para abordar esta asociación. El VEB puede infectar células epiteliales y de la línea linfocítica, con especial tropismo por células B (3,4,9,15). Una vez en el interior celular, el virus es regulado por mecanismos epigenéticos y ha evolucionado para aprovechar la maquinaria epigenética de la célula huésped, establecer una infección latente y posteriormente avanzar a la fase productiva del ciclo lítico (16). Durante este proceso, el virus inmortaliza a la célula, estimula la proliferación, induce la expresión de BCL-2 y favorece la evasión de la apoptosis y la respuesta inmune (4,15). La infección latente se caracteriza por la persistencia viral con expresión restringida, ya que el sistema inmune del hospedero inmunocompetente reduce la replicación viral después de la infección y el VEB

permanece en el individuo por el resto de la vida, sin causar síntomas agudos de la infección ni dar lugar a antígenos detectables, aunque con el potencial de reactivación y replicación lítica (3,4,9,17,18). Los linfocitos B con infección latente dejan de proliferar, forman centros germinales, se diferencian a linfocitos B de memoria que contienen el genoma del VEB en forma de episomas, y expresan determinadas proteínas latentes de membrana (LMP), proteínas de localización nuclear o antígenos nucleares (EBNA) y dos micro-ARN (EBER-1 y -2), dependiendo del programa de latencia en que se encuentren (I, II, III). Estas moléculas están implicadas en la alteración de las vías de señalización celular y pueden promover el desarrollo de diferentes tipos de tumores de origen epitelial, linfocítico o mesenquimal (tabla 1) (9,19-21). Por ejemplo, durante la latencia de tipo I el patrón de expresión de EBNA-1 y EBER se asocia con el cáncer gástrico y el linfoma de Burkitt (LB); la latencia de tipo II se encuentra estrechamente relacionada con el linfoma de Hodgkin y el carcinoma nasofaríngeo; y la latencia tipo III está ligada a enfermedades linfoproliferativas postrasplante y a linfomas asociados con el VIH/ SIDA (tabla 1) (4,6).

VEB Y LINFOMAS

El patrón de reconocimiento del VEB en enfermedades linfoproliferativas está definido por los genes que se expresan o permanecen latentes; así, en la latencia tipo I se expresan predominantemente EBNA-1, EBER y BART, como en el LB; la latencia tipo II se presenta cuando el VEB infecta linfocitos B primarios y se expresan principalmente EBNA-1, LMP-1, -2A y 2B, por ejemplo en el linfoma de Hodgkin y el linfoma de células T/NK; y la latencia tipo III se presenta cuando se expresan todos los genes latentes (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP; LMP-1, -2A, -2B; EBER-1, -2, y BART), este patrón se encuentra típicamente en enfermedades linfoproliferativas postrasplante asociadas a VEB, linfomas asociados con el SIDA y líneas celulares linfoblastoides (tabla 1) (22,23).

EL VEB fue el primer virus asociado a tumores humanos al ser detectado en linfoblastos cultivados de LB (24). Posteriormente, las observaciones de cultivos celulares de LB, mediante microscopía electrónica, permitieron determinar la morfología y biología del

Tabla 1. Tipos de latencia, moléculas del VEB y malignidades asociadas

Tipo de latencia	Moléculas expresadas	Tipos de cáncer asociados
I	EBNA-1	Carcinoma gástrico
	EBER	Linfoma de Burkitt Linfoma de células B grande difuso
II	EBNA-1	Linfoma de Hodgkin
	EBER	Linfoma de células T/NK
	LMP-1,2, 3	Carcinoma nasofaríngeo
III	EBNA, EBER	Enfermedades linfoproliferativas postrasplante
	LMP	Linfomas asociados con el VIH/SIDA

EBER: ARN pequeños codificados por VEB

EBNA: antígenos nucleares del VEB

LMP: proteínas latentes de membrana

virus (25). Más adelante, Zur Hausen y colaboradores (13) corroboraron la presencia del VEB en biopsias de LB y, además, demostraron su presencia en carcinoma nasofaríngeo; y Weiss y colaboradores (26) demostraron por primera vez la presencia de VEB en linfoma de Hodgkin, específicamente en células de Reed Sternberg que expresan EBER, EBNA-1, LMP-1 y 2 (27).

En 1997, Glaser y colaboradores (28) hicieron un estudio epidemiológico internacional para hallar la relación entre el VEB y el linfoma de Hodgkin; el estudio contó con 1546 pacientes clasificados por sexo, edad, etnia, subtipo histológico, país de residencia y grado de infección por VEB (determinado por los niveles de expresión de EBER y LMP-1). Los resultados mostraron que 50 % de los pacientes eran positivos para VEB y que este se relacionó mayormente con hispanos, con el subtipo celular mixto, con niños de recursos económicos bajos y provenientes de regiones menos desarrolladas y con hombres jóvenes. Estos resultados mostraron la complejidad de la asociación entre el VEB y el cáncer, y la importancia de nuevos estudios para establecer variables epidemiológicas de mayor asociación.

Se ha demostrado que el VEB es un cofactor importante en el linfoma de Burkitt endémico (africano) y que está presente en 65 % de los linfomas de Hodgkin (9,29); además, está implicado en 50 % de los linfomas sistémicos de linfocitos B, no Hodgkin, de células NK/T y en el total de los linfomas primarios del sistema nervioso central (23,30,31). El linfoma de Burkitt

se clasifica en tres variantes clínicas, de las cuales la endémica y la esporádica se han asociado predominantemente a la infección por VEB, mientras que la tercera es la asociada al virus de la inmunodeficiencia humana (32). Estudios posteriores demostraron que el VEB actúa como un factor de crecimiento transformante en células B primarias; todos los casos de LB están relacionados con translocaciones cromosómicas que resultan en la activación constitutiva del oncogén c-MYC (33).

En general, los linfocitos B y las células epiteliales infectados por el VEB mantienen una infección latente por la unión del virus al receptor CD21 y por la activación de CD23, lo que se relaciona con la inmortalización de las células B (34). Para evadir el sistema inmune, el virus expresa oncogenes como LMP-1 (receptor de CD40), que activa las vías de señalización NF- κ B, JAK/STAT y BCL-2 relacionadas con la producción de citocinas (IL-10) y que influyen en la proliferación celular, la angiogénesis y la respuesta inflamatoria (22,35). Por otra parte, el gen EBNA induce la expresión de genes celulares para la producción de ciclina D y de genes virales como vIL-10 (viroquina), que inhiben la activación de monocitos a través de células T (36), acción fundamental para la transformación maligna de los linfocitos B. Por último, EBER-1 y -2, presentes en el núcleo de las células infectadas, se unen al ADN para proporcionar estabilidad y mantener la integridad del genoma viral en la división celular (37).

VEB Y CARCINOMA NASOFARÍNGEO (CNF)

El CNF se diferencia en tres variantes histológicas o tipos, a saber: I, carcinoma queratinizante de células escamosas; II carcinoma no queratinizado mal diferenciado; III, carcinoma nasofaríngeo indiferenciado (60 % de los casos). De estos, los de tipos II y III muestran una fuerte asociación con VEB, mientras que el tipo I se relaciona con el tabaquismo y el alcohol (38). El CNF es endémico en el Norte de África, el Suroeste de Asia y otras regiones orientales, y son raros los casos reportados en Europa Occidental, América del Norte y América del Sur (39).

Zur Hausen y colaboradores (13) describieron en 1970 la primera evidencia de la asociación entre VEB y CNF. En el mismo año, Henle y colaboradores (40) hicieron un estudio para cuantificar anticuerpos anti-VEB en pacientes de África Oriental, Hong Kong, India y Francia que padecían tumores de cabeza y cuello. Los resultados mostraron que 84 % de los pacientes con CNF tenían títulos altos para VEB, a diferencia de los que padecían otros tipos de tumores; además, demostraron que al agrupar los pacientes con CNF por estadios de la enfermedad, los títulos anti-VEB aumentaban con la gravedad del carcinoma. Se encontraron diferentes patrones de expresión molecular asociados al VEB en muestras de CNF; la detección de EBER mostró que el virus infectaba prácticamente todas las células tumorales, por lo que se catalogó este micro-ARN temprano del virus como marcador de infección latente tipo II, acompañado de la transcripción de EBNA-1, LMP-1 y -2. La expresión de LMP-1 fue variada dentro de células del mismo tumor, lo que podría interpretarse como un patrón mixto de latencia tipos I y II (41).

La detección del VEB en células de CNF se hace comúnmente al identificar el antígeno nuclear EBNA-1, presente en más de 80 % de las muestras (42); mientras que no se han detectado los genes que codifican para EBNA-2, -3 y -LMP, por lo que se presume que son silenciados en las células tumorales (43,44). Otro indicador específico de la presencia del VEB en el CNF es la expresión de EBER, debido a que no se detecta en epitelios respiratorio y nasofaríngeo normales, ni en tejido adyacente al tumor (45). Matalka y colaboradores (46) detectaron EBER en 92,3 % de las biopsias de CNF; los resultados indicaron que no existe diferencia

en la tasa de detección entre hombres y mujeres o adultos y niños; además, observaron que el VEB se localizaba de preferencia en el espacio nasal posterior, mientras que biopsias obtenidas de nódulos linfáticos cervicales fueron negativas

Las LMP-1 y -2 también se han identificado en CNF, aunque existe controversia con respecto a su expresión por la marcada variabilidad entre los resultados de diversos estudios (47,48). La expresión de LMP-1 es más uniforme en etapas tempranas del CNF y en carcinoma *in situ*, lo que sugiere que esta proteína puede facilitar la progresión de la enfermedad (49), debido a que concentraciones bajas de la proteína son suficientes para inducir cambios morfológicos y fenotipos invasivos en células de CNF *in vitro* (50,51). LMP-1 contribuye a la inmortalización de células B y a la transformación y proliferación de fibroblastos (*in vivo*) y de ciertas líneas de células epiteliales (*in vitro*) (52), promueve la motilidad, la invasión, las metástasis (53,54), la transición epitelio-mesenquimal (55) y la angiogénesis (56,57).

Una característica adicional de la expresión génica de VEB en CNF es la intensa producción de transcritos BARF1 con sentido positivo mediante la endonucleasa de restricción BamH. Se ha encontrado BARF1 en más de 85 % de las biopsias de CNF en humanos y se ha demostrado que actúa como oncogén, con la capacidad de inducir proliferación y transformación celulares y de conferirle mayor agresividad al tumor infectado (58).

La figura 1 esquematiza la manera cómo el VEB, después de infectar las células del epitelio nasofaríngeo, podría dar lugar al desarrollo del cáncer.

VEB Y CÁNCER DE MAMA (CM)

En 1995, Labreque y colaboradores (59) publicaron el primer informe de la asociación VEB-CM y demostraron que 21 % de los 91 tumores evaluados fueron positivos para el virus. Bonnet y colaboradores (60) sugirieron en 1999 el posible rol del virus en la patogénesis del CM, ya que más de 50 % de las biopsias con CM invasivo primario presentaron amplificación de tres regiones del genoma del VEB: EBNA-2, BZLF1 (*BamHI* *Leftward Frame 1*) y BNLF1 (*BamHI* *N Leftward Frame*), mientras que solamente se detectó el

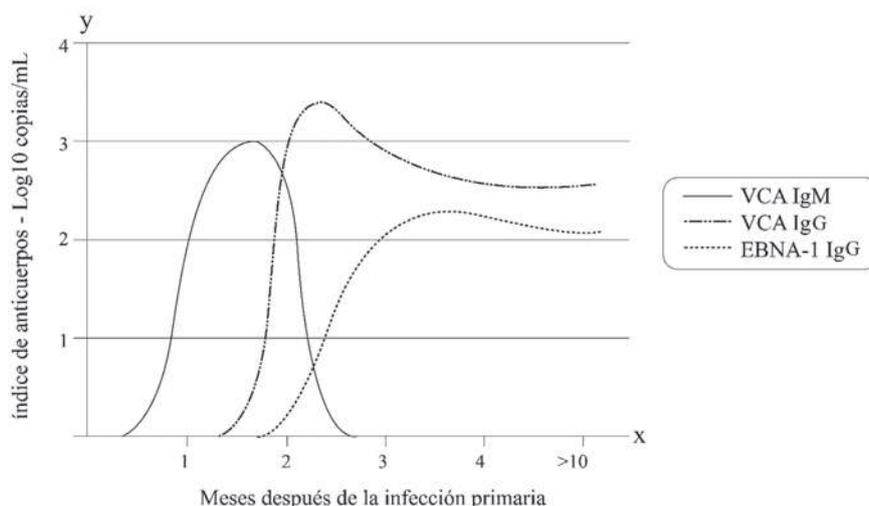


Figura 1. Evolución característica de la respuesta humoral tras primoinfección por VEB

virus en el tejido sano peritumoral en 10 % de los casos. En 2012, Glenn y colaboradores (61) detectaron el VEB en 68 % de las muestras de CM evaluadas y analizaron 32 estudios publicados sobre la asociación VEB-CM, 25 de los cuales se basaron en análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional; de estos, 84 % fueron positivos para VEB en tejido canceroso. En ese mismo año, Zekri y colaboradores (62) detectaron EBNA-1 y EBER en 45 % de mujeres egipcias y en 28 % de mujeres iraquíes con CM invasivo; lo anterior indica que la presencia del ADN viral en pacientes con CM puede diferir entre grupos con distribución y características demográficas distintas, lo que podría explicarse por las variaciones del HLA en la población.

Diferentes estudios publicados en las últimas décadas han sustentado el potencial oncogénico de este virus en tejidos mamarios humanos (63-65); sin embargo, aún existe controversia, porque algunos informes no demuestran la asociación (66,67); por ejemplo, Khan y colaboradores (68) detectaron el VEB en 50 % de los casos de CM, pero el análisis histológico mostró que el virus estaba presente en linfocitos infiltrantes del tumor y no en células malignas. Algunos autores explican las discrepancias respecto a la asociación VEB-CM, por el uso de diferentes técnicas de detección, los genes virales evaluados, los tipos histológicos tumorales, la variación epidemiológica de la infección y el origen geográfico de los casos (8,62,63,68,69).

Pese a la disparidad de los antecedentes, no se debe descartar que la infección por VEB tenga un papel en el CM porque existe evidencia de características virales que podrían conferirle potencial oncogénico. El VEB codifica para la proteína BARF0, que promueve la actividad oncogénica de las células tumorales cultivadas mediante la activación de señales HER-2 y HER-3; a su vez, estas señales favorecen la activación de las cascadas ERK/Akt y el crecimiento celular independiente de anclaje (70). También se ha demostrado *in vitro* que la oncoproteína LMP-1 interactúa con el virus del papiloma humano, disminuye la apoptosis y favorece la proliferación de las células cancerígenas, por lo que la coexistencia de los dos virus podría contribuir al desarrollo de algunos tipos de CM (62).

VEB Y CÁNCER GÁSTRICO (CG)

Helicobacter pylori es el principal factor de riesgo para el desarrollo de CG (71); no obstante, se ha demostrado que polimorfismos genéticos y la infección por VEB también tienen un papel importante en esta enfermedad (72). En 1990, Burke y colaboradores (73) describieron la asociación VEB-CG: detectaron el virus mediante PCR en pacientes con CG linfopitelial indiferenciado. Posteriormente, en 1998, Hsieh y colaboradores (74) detectaron el virus en 20,7 % de

las muestras de adenocarcinoma de tipo difuso, y en 5,9 % de muestras no tumorales, lo que sugiere que la infección pudo haber ocurrido en la etapa temprana del desarrollo del CG. Truong y colaboradores (75) detectaron VEB en 83 % de pacientes con CG y observaron ausencia de la proteína LMP-1, lo que sugiere que no es necesaria en el sostenimiento del estado maligno del tumor, pero podría participar en la fase temprana y posteriormente ser regulada a la baja.

Recientemente, dados los soportes de la asociación VEB-CG, la nueva clasificación molecular del CG incluye un subtipo denominado CaGVEB (76), del cual se conocen dos tipos histológicos: el carcinoma gástrico similar al linfopitelioma o carcinoma gástrico con estroma linfoide (85 % a 95 % de los casos) y el adenocarcinoma (5 % a 15 % de los casos) (77-79). Se sabe que el CaGVEB se presenta en 2 % a 20 % de la población mundial. Anualmente se diagnostican de 200 000 a 876 000 casos nuevos de CaGVEB, que causan 69 081 a 90 000 muertes cada año (77,80-83). En Colombia, la tasa más alta de mortalidad por CaGVEB se reporta en regiones montañosas y la más baja, en regiones planas; es más frecuente en hombres jóvenes y el subtipo histológico predominante es el adenocarcinoma de tipo difuso (84).

Se han propuesto dos mecanismos por los que el virus podría desencadenar el CG: 1) por acción independiente; 2) por sinergia con *H. pylori*. En cuanto al primer mecanismo, se ha encontrado que EBNA-1 es esencial para mantener el estado de latencia del VEB en el CG y es el único antígeno del virus expresado en todas las neoplasias asociadas al mismo (85,86). Los EBER están sobreexpresados en el CG de tipo intestinal cuando se compara con el de tipo difuso; se ha demostrado que estos micro-ARN están involucrados en los siguientes fenómenos: oncogénesis, adhesión celular, señales de transducción, regulación de la apoptosis, expresión y secreción del factor de crecimiento similar a la insulina y del factor de crecimiento autocrino de las células gástricas cancerígenas (75,85,87).

Respecto a la sinergia con *H. pylori*, se han planteado algunas hipótesis sobre cómo la interacción entre los dos patógenos podría favorecer el desarrollo del CG: a) un efecto aditivo de la inflamación (gastritis grave) producida por los dos agentes infecciosos incrementaría el daño tisular, con mayor riesgo de desarrollar

lesiones precancerosas; b) interacción entre moléculas del VEB (Zta, factor de transcripción involucrado en el ciclo lítico) y de *H. pylori* (CagA, oncoproteína que induce pérdida de la polaridad de las células epiteliales) mediada por la proteína cinasa C (72,88-90); c) producción de monocloroamina oxidante por parte de *H. pylori*, compuesto que favorece la replicación del VEB latente en el epitelio gástrico; induce cambios morfológicos y la expresión del antígeno temprano (EA) del virus en células cancerígenas (91); sin embargo, se desconocen las implicaciones directas que tendría este último mecanismo en el desarrollo del CG.

VEB Y CARCINOMA PULMONAR (CP)

No se considera al VEB como un factor de riesgo principal en el desarrollo de CP; sin embargo, algunas investigaciones evidencian la asociación VE-CP. En 1978 se informó (92) el caso de un hombre de 40 años con una neoplasia primaria en el lóbulo superior del pulmón izquierdo; diferentes características indicaron que podría estar relacionada con el VEB: morfológicamente el tumor recordaba una variante no queratinizada del CNF y el perfil serológico mostró un drástico incremento en los títulos de anticuerpos contra el antígeno de cápside viral (VCA, por su sigla en inglés), EA y EBNA durante la evolución de la enfermedad. Chen y colaboradores analizaron diferentes tipos de CP en busca de VEB, por medio de PCR e hibridación *in situ* (ISH) para EBER-1 y encontraron que todos los carcinomas similares a linfopitelioma (LE) eran positivos para el virus y para la oncoproteína *bcl-2* (93); esto sugiere que el virus podría tener un rol importante en la carcinogénesis (94). Aunque el LE es el subtipo de CP más asociado a la infección por VEB (95), dicha asociación ha sido controversial. En 2001 se analizaron seis pacientes con LE primario de pulmón y no se detectó el genoma viral en ninguno de ellos; los autores, basados en el análisis de información previa, sugirieron que la asociación entre VEB y LE de pulmón podría estar influenciada por factores raciales y geográficos, pues se ha detectado el virus en pacientes asiáticos y no en occidentales diagnosticados con este tipo de cáncer (96). De igual manera, Chu y colaboradores (97) evaluaron en 2004 la infección por VEB en 23 casos de pacientes americanos con carcinoma de células pequeñas, usando

diferentes metodologías; solamente nueve de ellos fueron positivos con una sola técnica. Dada la falta de concordancia entre los ensayos, estos resultados se interpretaron como falsos positivos y se concluye que la evidencia de la infección no es convincente.

La discrepancia en la asociación aún se mantiene. En 2011, Koshiol y colaboradores (98) utilizaron tecnología de última generación (microarreglos y PCR en tiempo real) para la detección del VEB en CP; sin embargo, los resultados no fueron consistentes entre las dos técnicas, lo que se explicaría probablemente por la falta de correlación entre los niveles de pre-micro-ARN (cuantificados por microarreglos) y micro-ARN maduros (cuantificados por PCR) en el CP. En 2013, Jafarian y colaboradores (99) encontraron el genoma del VEB solo en 5 de 48 muestras de CP y en 2 de los 42 controles, por lo que concluyeron que el virus no tiene un papel importante en el cáncer no similar a LE, pero podría participar en el desarrollo de otros tipos de CP como el carcinoma de células escamosas. Controles con infiltrados linfopolimorfonucleares crónicos podrían haber influido en los resultados y reflejar diferencias no significativas entre los grupos.

Pese a lo anterior, recientemente se ha encontrado que la activación y sobreexpresión de EB13 es determinante en la progresión del CP; esta proteína se asocia a un mal pronóstico y podría ser un biomarcador incluso en etapas tempranas de CP, o como un blanco terapéutico molecular para este tipo de cáncer (100).

TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE VEB EN TUMORES

Hay varias técnicas para la detección de VEB en tumores. Desde los años 90 se han usado metodologías moleculares como Southern blot, PCR, inmunohistoquímica, ISH para la detección de los antígenos virales y amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (9, 11). Para detectar anticuerpos específicos (IgG, IgM o IgA) dirigidos contra los antígenos VCA, EA y EBNA, se han empleado inmunofluorescencia indirecta, aglutinación, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunocromatografía y Western blot. Los primeros que se detectan son los anticuerpos IgM frente a los VCA y, posteriormente, aparecen los IgG anti-EA e IgG anti-VCA (figura 2) (9, 15).

En algunos tipos de cáncer (por ejemplo, CM) la detección del virus es laboriosa debido a la baja carga viral (61); para superar este inconveniente se han utilizado técnicas como PCR *in situ* con el fin de lograr mayores sensibilidad y especificidad (60), pues la PCR convencional no puede probar la presencia del virus en células tumorales (8,66). De igual manera, la ISH para la detección de EBER (conocida como EBERISH) es una de las técnicas recomendadas para estas investigaciones y se ha convertido en el estándar de oro para la detección del virus, dada la mayor especificidad en cuanto a localización celular, y la alta sensibilidad, como resultado de la abundante expresión de estas moléculas en el lugar de la infección (14). Recientemente se ha estado utilizando la captura por microdissección láser, posterior a la amplificación por PCR, con el fin de hacer un análisis molecular preciso de las poblaciones celulares purificadas, confirmar la localización del virus en el tejido tumoral (64) y sacar conclusiones contundentes respecto a la asociación de la infección viral con el desarrollo de cáncer.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta revisión abre muchas preguntas que podrían abordarse en el futuro, tales como: ¿realmente es el VEB el agente causal de todos los tipos de cáncer con los que se ha asociado? ¿El cuadro clínico del paciente con cáncer VEB positivo empeora respecto a un VEB negativo? ¿Dada la prevalencia del VEB en la población habría mayor riesgo de desarrollar CNF dentro de algunos años, tal como sucede en países asiáticos? ¿*H. pylori* actúa en sinergia con VEB en el desarrollo del CG y, si es así, de qué forma? ¿El tratamiento de la infección viral en los pacientes con cáncer podría mejorar su pronóstico y calidad de vida? ¿Existe un mecanismo molecular común que explique el papel del VEB en las diferentes malignidades? ¿Puede el virus interactuar con biomarcadores expresados en los diferentes tipos de cáncer?

Los avances tecnológicos recientes posibilitan abordar estas preguntas y asumir los retos de la detección del VEB en tejidos tumorales. Como resultado de esta revisión, nuestro grupo de investigación en Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Universidad del Cauca iniciará un proyecto para detectar este herpesvirus en biopsias de pacientes con

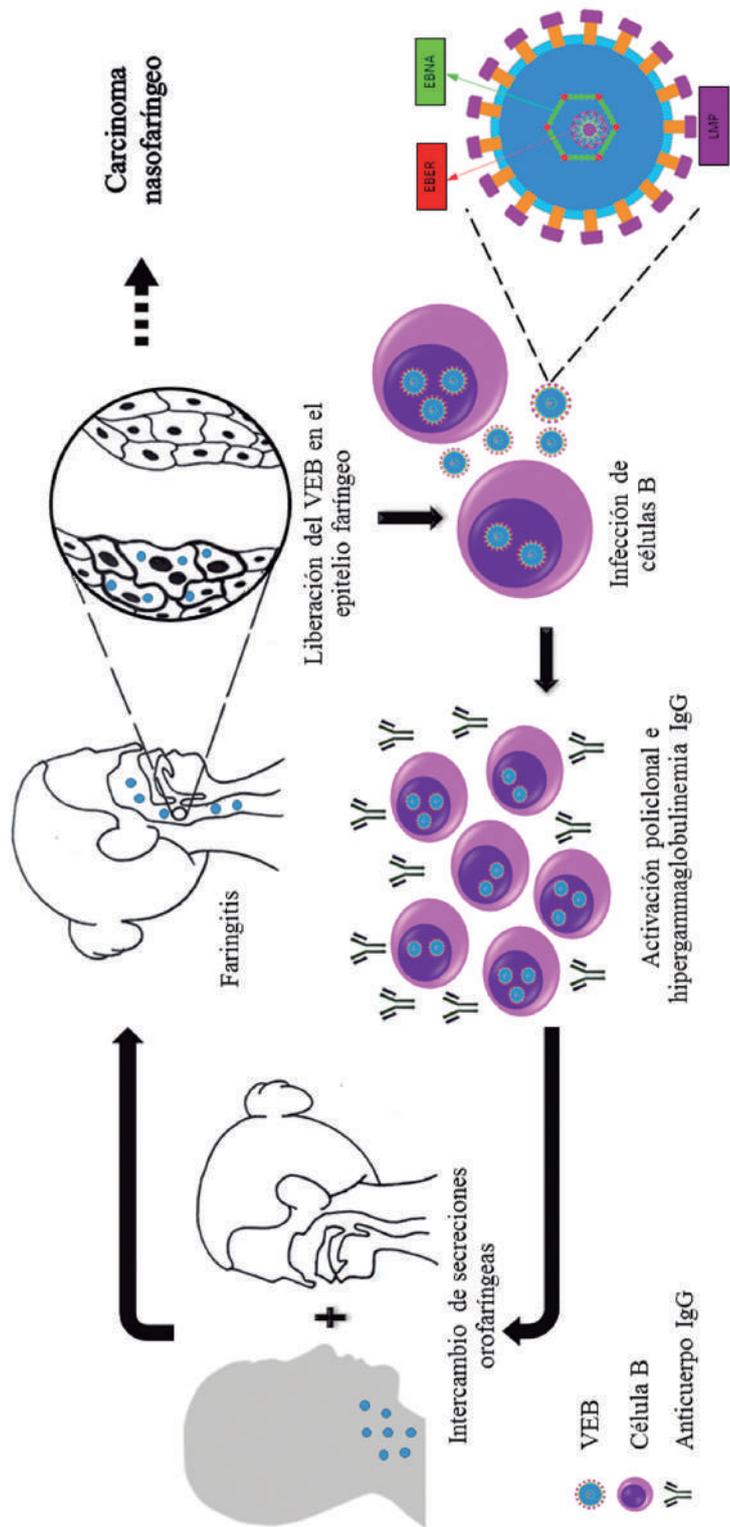


Figura 2. Rol del VEB en el carcinoma nasofaríngeo. Una vez el VEB invade las glándulas salivales o el epitelio faríngeo, se multiplica en ellos para luego liberarse en la saliva y secreciones respiratorias. En ocasiones, el virus transforma las células del epitelio faríngeo para dar origen al carcinoma nasofaríngeo. El VEB infecta linfocitos B, que posteriormente sufren activación policlonal y semanas después producen anticuerpos IgG. Estas células estimulan la producción de linfocitos atípicos, que eliminan e inhiben las células B infectadas por el virus y suprimen la producción de inmunoglobulinas

adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal, una enfermedad prevalente en el Suroccidente colombiano. De resultar positiva la asociación, investigaciones posteriores se deberán enfocar en el análisis exhaustivo de genes y proteínas virales que alteran las vías de señalización célula - matriz extracelular - célula, favoreciendo la transformación maligna y la perpetuación del microambiente tumoral. La investigación sobre estas asociaciones es de gran significancia ya que podría ser un indicador de utilidad pronóstica y diagnóstica; además, podría ser un blanco molecular para lograr mejores terapias y justificar campañas de prevención de la transmisión de virus con potencial oncogénico (8,101).

Dado que el rol del VEB en el desarrollo de cáncer ha sido bien documentado mundialmente, es necesario incrementar los esfuerzos en la investigación de este problema en nuestro país y a nivel regional, debido al gran impacto social que tendría sobre los comportamientos culturales inadecuados que en la actualidad favorecen la transmisión del virus. Esperamos que la presente revisión sea de utilidad para ampliar el conocimiento de los lectores, actualizar la información sobre algunos conceptos específicos, métodos diagnósticos y aspectos patogénicos del VEB en la carcinogénesis. Todo lo anterior con el fin de establecer estrategias de prevención, diagnósticos acertados, desarrollar terapias más eficaces y ofrecer mejores pronósticos en pacientes oncológicos VEB positivos.

CONFLICTOS DE INTERESES

Ninguno que declarar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Song CG, Huang JJ, Li YJ, Xia Y, Wang Y, Bi XW, et al. Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma in the Elderly: A Matched Case-Control Analysis. *PLoS One*. 2015 Jul;10(7):e0133973. DOI 10.1371/journal.pone.0133973.
2. Karaarslan S, Hekimgil M, Soydan S, Ertan Y, Doğanavşargil B. Evaluation of the role of Epstein-Barr virus in cases of nodal or extranodal T- and NK-cell lymphoma using eber in situ hybridization. *Pol J Pathol*. 2015 Jun;66(2):161-9.
3. King AM. Family – Herpesviridae. In: King AM, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. *Virus taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier; 2011. p.111-22.
4. Rubin SD, Rubin E. Neoplasias. En: Rubin E, Rubin R, Strayer DS, editors. *Patología de Rubin: Fundamentos Clinicopatológicos en Medicina*. 6ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2012. p. 200.
5. Grywalska E, Markowicz J, Grabarczyk P, Pasiarski M, Roliński J. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2013 May;67:481-90.
6. Levine H, Balicer RD, Rozhavski V, Halperin T, Shreberk M, Davidovitch N, et al. Seroepidemiology of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus among Israeli male young adults. *Ann Epidemiol*. 2012 Nov;22(11):783-8. DOI 10.1016/j.annepidem.2012.06.099.
7. Kasper DL, Fauci AS, Hauser S, Longo D, Jameson L, Loscalzo J. Infections due to DNA viruses. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19th ed. New York City: McGraw Hill Professional; 2015. p. 1186-7.
8. Glaser SL, Hsu JL, Gulley ML. Epstein-Barr virus and breast cancer: state of the evidence for viral carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 May;13(5):688-97.
9. Jaramillo JM. Herpesvirus humanos. En: Díaz FJ, Estrada S, Franco L, Jaramillo JM, Maestre A, Ospina S, et al, editores. *Microbiología de las infecciones humanas*. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2007. p. 444-58.
10. Katano H, Ali MA, Patera AC, Catalfamo M, Jaffe ES, Kimura H, et al. Chronic active Epstein-Barr virus infection associated with mutations in perforin that impair its maturation. *Blood*. 2004 Feb;103(4):1244-52.
11. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Herpesvirus. En: *Microbiología médica*. 25ª ed. Nueva York: Mc Graw Hill; 2011. p. 450-2.
12. Cui Y, Wang Y, Liu X, Chao Y, Xing X, Zhao C, et al. Genotypic analysis of Epstein-Barr virus isolates associated with nasopharyngeal carcinoma in Northern China. *Intervirology*. 2011;54(3):131-8. DOI 10.1159/000319632.
13. Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle G, Henle W, Clifford P, et al. Epstein-Barr virus in

- Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. [ii] EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature*. 1970;228:1056-8. DOI 10.1038/2281056a0.
14. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. The monographs, Epstein-Barr virus. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma herpesvirus/human herpesvirus 8. Vol. 70. Lyon: WHO; 1997. p. 47-373.
 15. Murray PR, Pfaüer M. Virus herpes humanos. En: Murray RP. *Microbiología médica*. 7ª ed. Philadelphia: Elsevier; 2014. p. 461-77.
 16. Woellmer A, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus and host cell methylation: regulation of latency, replication and virus reactivation. *Curr Opin Virol*. 2013 Jun;3(3):260-5. DOI 10.1016/j.coviro.2013.03.005.
 17. Ferrajoli A, Ivan C, Ciccone M, Shimizu M, Kita Y, Ohtsuka M, et al. Epstein-Barr Virus MicroRNAs are Expressed in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia and Correlate with Overall Survival. *EBioMedicine*. 2015 Apr;2(6):572-82. DOI 10.1016/j.ebiom.2015.04.018.
 18. Lin SJ, Wu SW, Chou YC, Lin JH, Huang YC, Chen MR, et al. Novel expression and regulation of TIMP-1 in Epstein Barr virus-infected cells and its impact on cell survival. *Virology*. 2015 Jul;481:24-33. DOI 10.1016/j.virol.2015.02.015.
 19. Kondo S, Wakisaka N, Muramatsu M, Zen Y, Endo K, Murono S, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cancer stem/progenitor-like cells in nasopharyngeal epithelial cell lines. *J Virol*. 2011 Nov;85(21):11255-64. DOI 10.1128/JVI.00188-11.
 20. Kong QL, Hu LJ, Cao JY, Huang YJ, Xu LH, Liang Y, et al. Epstein-Barr virus-encoded LMP2A induces an epithelial-mesenchymal transition and increases the number of side population stem-like cancer cells in nasopharyngeal carcinoma. *PLoS Pathog*. 2010 Jun;6(6):e1000940. DOI 10.1371/journal.ppat.1000940.
 21. Deb Pal A, Banerjee S. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mediated activation of Sonic Hedgehog pathway induces HLA class Ia downregulation in gastric cancer cells. *Virology*. 2015 Oct;484:22-32. DOI 10.1016/j.virol.2015.05.007.
 22. Middeldorp JM, Brink AA, van den Brule AJ, Meijer CJ. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003 Jan;45(1):1-36.
 23. Saha A, Robertson ES. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas: pathogenesis and clinical outcomes. *Clin Cancer Res*. 2011 May;17(10):3056-63. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-10-2578.
 24. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from burkitt's lymphoma. *Lancet*. 1964 Mar;1(7335):702-3.
 25. Epstein MA, Henle G, Achong BG, Barr YM. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med*. 1965 May;121:761-70.
 26. Weiss LM, Strickler JG, Warnke RA, Purtilo DT, Sklar J. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *Am J Pathol*. 1987 Oct;129(1):86-91.
 27. Levine PH, Pallesen G, Ebbesen P, Harris N, Evans AS, Müller N. Evaluation of Epstein-Barr virus antibody patterns and detection of viral markers in the biopsies of patients with Hodgkin's disease. *Int J Cancer*. 1994 Oct;59(1):48-50.
 28. Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, Ambinder RF, Jarrett RF, Brousset P, et al. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer*. 1997 Feb;70(4):375-82.
 29. Nie Y, Sun Y, Wang Y, Liu C, Zhao C, Luo B. Epstein-Barr virus gene polymorphism in different parts of the same nasopharyngeal carcinoma patient. *Arch Virol*. 2013 May;158(5):1031-7. DOI 10.1007/s00705-012-1578-2.
 30. Longo DL. Neoplasias malignas de las células linfoides. En: Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J, Harrison. *Principios de Medicina Interna*. 18a ed. New York City: McGraw Hill Professional; 2013. p. 919- 21.
 31. Levy JA. El VIH y el desarrollo del cáncer. En: *El VIH y la patogénesis del SIDA*. México: Fondo De Cultura Económica; 2008. p. 365.
 32. Lenze D, Leoncini L, Hummel M, Volinia S, Liu CG, Amato T, et al. The diferente epidemiologic subtypes of Burkitt lymphoma share a homogenous micro RNA profile distinct from diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2011 Dec;25(12):1869-76. DOI 10.1038/leu.2011.156.

33. Rowe M, Fitzsimmons L, Bell AI. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *Chin J Cancer*. 2014 Dec;33(12):609-19. DOI 10.5732/cjc.014.10190.
34. Cordier M, Calender A, Billaud M, Zimmer U, Rousset G, Pavlish O, et al. Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J Virol*. 1990 Mar;64(3):1002-13.
35. Thompson MP, Aggarwal BB, Shishodia S, Estrov Z, Kurzrock R. Autocrine lymphotoxin production in Epstein-Barr virus-immortalized B cells: induction via NF-kappaB activation mediated by EBV-derived latent membrane protein 1. *Leukemia*. 2003 Nov;17(11):2196-201.
36. Grywalska E, Rolinski J. Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Semin Oncol*. 2015 Apr;42(2):291-303. DOI 10.1053/j.seminoncol.2014.12.030.
37. Schwemmler M, Clemens MJ, Hilse K, Pfeifer K, Tröster H, Müller WE, et al. Localization of Epstein-Barr virus-encoded RNAs EBER-1 and EBER-2 in interphase and mitotic Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov;89(21):10292-6.
38. Spano JP, Busson P, Atlan D, Bourhis J, Pignon JP, Esteban C, et al. Nasopharyngeal carcinomas: an update. *Eur J Cancer*. 2003 Oct;39(15):2121-35.
39. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar;136(5):E359-86. DOI 10.1002/ijc.29210.
40. Henle W, Henle G, Ho HC, Burtin P, Cachin Y, Clifford P, et al. Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms, and control groups. *J Natl Cancer Inst*. 1970 Jan;44(1):225-31.
41. Chiang AK, Tao Q, Srivastava G, Ho FC. Nasal NK- and T-cell lymphomas share the same type of Epstein-Barr virus latency as nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin's disease. *Int J Cancer*. 1996 Nov 4;68(3):285-90.
42. Brooks L, Yao QY, Rickinson AB, Young LS. Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J Virol*. 1992 May;66(5):2689-97.
43. Fåhræus R, Fu HL, Ernberg I, Finke J, Rowe M, Klein G, et al. Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*. 1988 Sep;42(3):329-38.
44. Young LS, Dawson CW, Clark D, Rupani H, Busson P, Tursz T, et al. Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol*. 1988 May;69 (Pt 5):1051-65.
45. Wu TC, Mann RB, Epstein JI, MacMahon E, Lee WA, Charache P, et al. Abundant expression of EBER1 small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma. A morphologically distinctive target for detection of Epstein-Barr virus in formalin-fixed paraffin-embedded carcinoma specimens. *Am J Pathol*. 1991 Jun;138(6):1461-9.
46. Matalka I, Al Hamad M, Al-Hussaini M, Alzoubi FQ. The incidence of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma of Jordanian patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012 Jan;269(1):229-34. DOI 10.1007/s00405-011-1562-6.
47. Lin SY, Tsang NM, Kao SC, Hsieh YL, Chen YP, Tsai CS, et al. Presence of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene in the nasopharyngeal swabs from patients with nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck*. 2001 Mar;23(3):194-200.
48. Sarac S, Akyol MU, Kanbur B, Poyraz A, Akyol G, Yilmaz T, et al. Bcl-2 and LMP1 expression in nasopharyngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol*. 2001 Nov-Dec;22(6):377-82.
49. Pathmanathan R, Prasad U, Sadler R, Flynn K, Raab-Traub N. Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med*. 1995 Sep;333(11):693-8.
50. Tsao SW, Tramoutanis G, Dawson CW, Lo AK, Huang DP. The significance of LMP1 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*. 2002 Dec;12(6):473-87.
51. Tsao SW, Wang X, Liu Y, Cheung YC, Feng H, Zheng Z, et al. Establishment of two immortalized nasopharyngeal epithelial cell lines using SV40 large T and HPV16E6/E7 viral oncogenes. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Jun;1590(1-3):150-8.
52. Wang D, Liebowitz D, Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*. 1985 Dec;43(3 Pt 2):831-40.

53. Horikawa T, Yoshizaki T, Sheen TS, Lee SY, Furukawa M. Association of latent membrane protein 1 and matrix metalloproteinase 9 with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*. 2000 Aug;89(4):715-23.
54. Endo K, Kondo S, Shackelford J, Horikawa T, Kitagawa N, Yoshizaki T, et al. Phosphorylated ezrin is associated with EBV latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma and induces cell migration. *Oncogene*. 2009 Apr;28(14):1725-35. DOI 10.1038/onc.2009.20.
55. Zheng Z, Pan J, Chu B, Wong YC, Cheung AL, Tsao SW. Downregulation and abnormal expression of E-cadherin and beta-catenin in nasopharyngeal carcinoma: close association with advanced disease stage and lymph node metastasis. *Hum Pathol*. 1999 Apr;30(4):458-66.
56. Hui EP, Chan AT, Pezzella F, Turley H, To KF, Poon TC, et al. Coexpression of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. *Clin Cancer Res*. 2002 Aug;8(8):2595-604.
57. Kitagawa N, Kondo S, Wakisaka N, Zen Y, Nakanishi Y, Tsuji A, et al. Expression of seven-in-absentia homologue 1 and hypoxia-inducible factor 1 alpha: novel prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett*. 2013 Apr;331(1):52-7. DOI 10.1016/j.canlet.2012.12.002.
58. Decaussin G, Sbih-Lammali F, de Turenne-Tessier M, Bouguermouh A, Ooka T. Expression of BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma biopsies. *Cancer Res*. 2000 Oct;60(19):5584-8.
59. Labrecque LG, Barnes DM, Fentiman IS, Griffin BE. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. *Cancer Res*. 1995 Jan;55(1):39-45.
60. Bonnet M, Guinebretiere JM, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, et al. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Aug;91(16):1376-81.
61. Glenn WK, Heng B, Delprado W, Iacopetta B, Whitaker NJ, Lawson JS. Epstein-Barr virus, human papillomavirus and mouse mammary tumour virus as multiple viruses in breast cancer. *PLoS One*. 2012;7(11):e48788. DOI 10.1371/journal.pone.0048788.
62. Zekri AR, Bahnassy AA, Mohamed WS, El-Kassem FA, El-Khalidi SJ, Hafez MM, et al. Epstein-Barr virus and breast cancer: epidemiological and molecular study on Egyptian and Iraqi women. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2012 Sep;24(3):123-31. DOI 10.1016/j.jnci.2012.06.001.
63. Mazouni C, Fina F, Romain S, Ouafik L, Bonnier P, Martin PM. Outcome of Epstein-Barr virus-associated primary breast cancer. *Mol Clin Oncol*. 2015 Mar;3(2):295-8.
64. Fina F, Romain S, Ouafik L, Palmari J, Ben Ayed F, Benharkat S, et al. Frequency and genome load of Epstein-Barr virus in 509 breast cancers from different geographical areas. *Br J Cancer*. 2001 Mar;84(6):783-90.
65. Khabaz MN. Association of Epstein-Barr virus infection and breast carcinoma. *Arch Med Sci*. 2013 Aug;9(4):745-51. DOI 10.5114/aoms.2013.37274.
66. Herrmann K, Niedobitek G. Lack of evidence for an association of Epstein-Barr virus infection with breast carcinoma. *Breast Cancer Res*. 2003;5(1):R13-7.
67. Murray PG, Lissauer D, Junying J, Davies G, Moore S, Bell A, et al. Reactivity with A monoclonal antibody to Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 defines a subset of aggressive breast cancers in the absence of the EBV genome. *Cancer Res*. 2003 May;63(9):2338-43.
68. Khan G, Philip PS, Al Ashari M. Is Epstein-Barr virus associated with aggressive forms of breast cancer? *Br J Cancer*. 2011 Apr;104(8):1362-3; author reply 1364. DOI 10.1038/bjc.2011.99.
69. Magrath I, Bhatia K. Breast cancer: a new Epstein-Barr virus-associated disease? *J Natl Cancer Inst*. 1999 Aug;91(16):1349-50.
70. Lin JH, Tsai CH, Chu JS, Chen JY, Takada K, Shew JY. Dysregulation of HER2/HER3 signaling axis in Epstein-Barr virus-infected breast carcinoma cells. *J Virol*. 2007 Jun;81(11):5705-13.
71. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2012;100(Pt B):1-441.
72. Cárdenas-Mondragón MG, Carreón-Talavera R, Camorlinga-Ponce M, Gomez-Delgado A, Torres J, Fuentes-Pananá EM. Epstein Barr virus and Helicobacter pylori co-infection are positively associated with severe gastritis in pediatric patients. *PLoS One*. 2013 Apr;8(4):e62850. DOI 10.1371/journal.pone.0062850.

73. Burke AP, Yen TS, Shekitka KM, Sobin LH. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod Pathol*. 1990 May;3(3):377-80.
74. Hsieh LL, Lin PJ, Chen TC, Ou JT. Frequency of Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma in Taiwan. *Cancer Lett*. 1998 Jul;129(2):125-9.
75. Truong CD, Feng W, Li W, Khoury T, Li Q, Alrawi S, et al. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: a study of 235 cases at a comprehensive cancer center in U.S.A. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009 Feb;28:14. DOI 10.1186/1756-9966-28-14.
76. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014 Sep;513(7517):202-9. DOI 10.1038/nature13480.
77. Abe H, Kaneda A, Fukayama M. Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma: Use of Host Cell Machinery and Somatic Gene Mutations. *Pathobiology*. 2015;82(5):212-23. DOI 10.1159/000434683.
78. Torlakovic G, Snover DC, Torlakovic E. Simultaneous EBV-positive lymphoepithelioma-like carcinoma and EBV-negative intestinal-type adenocarcinoma in a patient with *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis. *Am J Clin Pathol*. 2004 Feb;121(2):237-45.
79. Uozaki H, Fukayama M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma—viral carcinogenesis through epigenetic mechanisms. *Int J Clin Exp Pathol*. 2008 Jan;1(3):198-216.
80. Camargo MC, Murphy G, Koriyama C, Pfeiffer RM, Kim WH, Herrera-Goepfert R, et al. Determinants of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis. *Br J Cancer*. 2011 Jun;105(1):38-43. DOI 10.1038/bjc.2011.215.
81. Akiba S, Koriyama C, Herrera-Goepfert R, Eizuru Y. Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: epidemiological and clinicopathological features. *Cancer Sci*. 2008 Feb;99(2):195-201. DOI 10.1111/j.1349-7006.2007.00674.x.
82. Lee JH, Kim SH, Han SH, An JS, Lee ES, Kim YS. Clinicopathological and molecular characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Mar;24(3):354-65. DOI 10.1111/j.1440-1746.2009.05775.x.
83. Fukayama M, Hino R, Uozaki H. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: virus-host interactions leading to carcinoma. *Cancer Sci*. 2008 Sep;99(9):1726-33. DOI 10.1111/j.1349-7006.2008.00888.x.
84. Carrascal E, Tokunaga M, Akiba S, Eizuru Y, Fujiyama C, Shinkura R, et al. Adenocarcinoma gástrico asociado con el virus de Epstein-Barr en Cali. *Colomb Méd*. 2014;30(3):127-31.
85. Liu X, Liu J, Qiu H, Kong P, Chen S, Li W, et al. Prognostic significance of Epstein-Barr virus infection in gastric cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2015 Oct;15:782. DOI 10.1186/s12885-015-1813-9.
86. Chen JN, Jiang Y, Li HG, Ding YG, Fan XJ, Xiao L, et al. Epstein-Barr virus genome polymorphisms of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in gastric remnant carcinoma in Guangzhou, southern China, an endemic area of nasopharyngeal carcinoma. *Virus Res*. 2011 Sep;160(1-2):191-9. DOI 10.1016/j.virusres.2011.06.011.
87. Gulley ML. Genomic assays for Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma. *Exp Mol Med*. 2015 Jan;47:e134. DOI 10.1038/emm.2014.93.
88. Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, et al. *elicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*. 2007 May;447(7142):330-3.
89. Lee HH, Chang SS, Lin SJ, Chua HH, Tsai TJ, Tsai K, et al. Essential role of PKCdelta in histone deacetylase inhibitor-induced Epstein-Barr virus reactivation in nasopharyngeal carcinoma cells. *J Gen Virol*. 2008 Apr;89(Pt 4):878-83. DOI 10.1099/vir.0.83533-0.
90. Shukla SK, Prasad KN, Tripathi A, Singh A, Saxena A, Ghoshal UC, et al. Epstein-Barr virus DNA load and its association with *Helicobacter pylori* infection in gastroduodenal diseases. *Braz J Infect Dis*. 2011 Nov-Dec;15(6):583-90.
91. Minoura-Etoh J, Gotoh K, Sato R, Ogata M, Kaku N, Fujioka T, et al. *Helicobacter pylori*-associated oxidant monochloramine induces reactivation of Epstein-Barr virus (EBV) in gastric epithelial cells latently infected with EBV. *J Med Microbiol*. 2006 Jul;55(Pt 7):905-11.
92. Bégin LR, Eskandari J, Joncas J, Panasci L. Epstein-Barr virus related lymphoepithelioma-like carcinoma of lung. *J Surg Oncol*. 1987 Dec;36(4):280-3.

93. Tsujimoto Y. Overexpression of the human BCL-2 gene product results in growth enhancement of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Mar;86(6):1958-62.
94. Chen FF, Yan JJ, Lai WW, Jin YT, Su JJ. Epstein-Barr virus-associated nonsmall cell lung carcinoma: undifferentiated "lymphoepithelioma-like" carcinoma as a distinct entity with better prognosis. *Cancer*. 1998 Jun;82(12):2334-42.
95. Iezzoni JC, Gaffey MJ, Weiss LM. The role of Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 1995 Mar;103(3):308-15.
96. Castro CY, Ostrowski ML, Barrios R, Green LK, Popper HH, Powell S, et al. Relationship between Epstein-Barr virus and lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung: a clinicopathologic study of 6 cases and review of the literature. *Hum Pathol*. 2001 Aug;32(8):863-72.
97. Chu PG, Cerilli L, Chen YY, Mills SE, Weiss LM. Epstein-Barr virus plays no role in the tumorigenesis of small-cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol*. 2004 Feb;17(2):158-64.
98. Koshiol J, Gulley ML, Zhao Y, Rubagotti M, Marincola FM, Rotunno M, et al. Epstein-Barr virus microRNAs and lung cancer. *Br J Cancer*. 2011 Jul;105(2):320-6. DOI 10.1038/bjc.2011.221.
99. Jafarian AH, Omidi-Ashrafi A, Mohamadian-Roshan N, Karimi-Shahri M, Ghazvini K, Boroumand-Noughabi S. Association of Epstein Barr virus deoxyribonucleic acid with lung carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol*. 2013 Oct-Dec;56(4):359-64. DOI 10.4103/0377-4929.125290.
100. Nishino R, Takano A, Oshita H, Ishikawa N, Akiyama H, Ito H, et al. Identification of Epstein-Barr virus-induced gene 3 as a novel serum and tissue biomarker and a therapeutic target for lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Oct;17(19):6272-86. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-11-0060.
101. Gutiérrez MI, Judde JG, Magrath IT, Bhatia KG. Switching viral latency to viral lysis: a novel therapeutic approach for Epstein-Barr virus-associated neoplasia. *Cancer Res*. 1996 Mar;56(5):969-72.

