



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Inducción del ciclo lítico del virus de Epstein-Barr  
en linfocitos B por la bacteria *Helicobacter pylori*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ITZEL SELENE HERRERA MORALES

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MA. ISABEL TUSSIÉ LUNA



CIUDAD DE MÉXICO 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno  
Herrera  
Morales  
Itzel Selene  
55 20 09 89 81  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
309220233
2. Datos del tutor  
Dra  
María Isabel  
Tussié  
Luna
3. Datos del sinodal 1  
Dr  
Ezequiel Moisés  
Fuentes  
Pananá
4. Datos del sinodal 2  
Dr  
Benito  
Estrada  
Mena
5. Datos del sinodal 3  
Dra  
María de los Ángeles  
Aguilar  
Santamaría
6. Datos del sinodal 4  
Dr  
Luis  
Padilla  
Noriega
7. Datos del trabajo escrito  
Inducción del ciclo lítico del virus  
de Epstein-Barr en linfocitos B por  
la bacteria *Helicobacter pylori*.  
96pp  
2018

Un agradecimiento particular al Dr. Ezequiel M. Fuentes Pananá, jefe de la Unidad de Investigación en Virología y Cáncer, laboratorio en el que se realizó esta tesis, por ser el co-tutor del presente trabajo financiado por CONACyT-CB-2012-CO1-176880 y por Fondos Federales de Apoyo a la Investigación, Hospital Infantil de México Federico Gómez (proyectos HIM-2013-051 SSA-1245 y HIM-2017-074 SSA-1403).

Yo recibí una beca de Licenciatura como parte del proyecto CONACyT-CB-2012-CO1-176880.

## **Agradecimientos personales**

A mis padres: Mi mami Marina y mi padre Arturo, no hay nadie en el mundo que haya confiado en mí más que ellos, gracias por el apoyo, los valores y la paciencia, porque sin ellos nada de lo que soy ahora sería posible, los amo infinitamente. También a mi hermano David que siempre estuvo orgulloso que su hermana fuera “científica”.

A la Dra Ma. Isabel Tussié Luna por ser mi tutora en este trabajo y no solo por apoyarme académicamente, si no por escuchar mis problemas y siempre brindarme su apoyo sincero. La admiro y aprecio muchísimo.

A mi comité tutor conformado por: Dr. Ezequiel M. Fuentes Pananá, Dr. Benito Estrada Mena, Dra. Ma. de los Ángeles Aguilar Santamaría y el Dr. Luis Padilla Noriega, por leer y comentar mi trabajo, gracias por su tiempo y sus observaciones y consejos para mejorar el mismo.

Otra vez al Dr. Ezequiel por confiar en mí para ayudar en parte de su investigación sobre el cáncer gástrico, tiene y merece a los mejores estudiantes. Nunca dejé de aprender de usted. Lo quiero, nunca dejaré de decirlo y nunca será mentira.

A mis compañeros de la UIVC que me apoyaron de alguna manera: Viri, el Sr. Miguel, Analí, Kari, Abi, Nancy, Yessi, Ceci, Angélica, Ulises, Karlita, Moni y en especial a Karen y Raul (Team Gástrico/Hepatitis) que siempre procuraron apoyarme tanto académicamente como personalmente.

Les agradezco mucho a mis compañeros de la carrera por compartir conmigo momentos increíbles dentro de Ciudad Universitaria o de práctica de campo, son lo máximo y los extraño: Mari Carmen, Edithe, Alejandra, Chabela, Isaura y muy especialmente a Daniel (Domeki) y Blanca (Blankishi) a quienes amo con todo mi corazón, mi vida cambió cuando los conocí y comprendí lo que significa “Amistad verdadera”.

A mis amigos de biomédicas: Damián, Karen, Betsy, Rosa, Toño, Nancy, Luis y a la Dra. Regina Montero quién fue la primera investigadora que confió en mi como alumna, admiro y respeto mucho su trabajo.

A mi amiga la Dra. Rocío López, quien me apoyó en cualquier aspecto en que la necesité. Te quiero mucho, gracias por todo y también a Issac, ambos me cuidan como si de verdad fuera de su familia.

Por último y no menos importante a Jeovany, gracias por tu apoyo incondicional, por quedarte a mi lado, creer en mí y siempre impulsarme a ser mejor. “Quien no lucha por lo que quiere, no merece lo que desea”. Nunca olvides que *あなたは私の世界です*.

## Abreviaturas

	<b>Español</b>	<b>Inglés</b>
<b>APC</b>	Supresor de tumores APC (Poliposis adenomatosa Coli)	Adenomatous Polyposis Coli tumor supresor
<b>BALF2</b>	Marco de lectura 2 hacia la izquierda del sitio BamHI A (proteína principal de unión al DNA)	BamHI A Leftward Frame 2
<b>BALF5</b>	Marco de lectura 5 hacia la izquierda del sitio BamHI A (DNAPol viral)	BamHI A Leftward Frame 5
<b>BART</b>	Transcritos hacia la derecha del sitio BamHI A	BamHI A rightward transcripts
<b>BARF1</b>	Marco de lectura 1 hacia la derecha del sitio BamHI A	BamHI A rightward frame 1
<b>BCR</b>	Receptor de antígeno de células B	B cell antigen receptor
<b>BHRF1</b>	Marco de lectura abierto 1 hacia la derecha del fragmento H de BamHI	BamHI fragment H rightward open reading frame 1
<b>BcLF1</b>	Marco de lectura 1 hacia la izquierda del fragmento C de BamHI (gen lítico tardío)	BamHI C Leftward reading Frame 1
<b>BRLF1</b>	Marco de lectura 1 hacia la izquierda del fragmento R de BamHI (gen lítico temprano)	BamHI R Leftward reading Frame 1
<b>BZLF1</b>	Marco de lectura 1 hacia la izquierda del fragmento Z de BamHI (gen lítico temprano)	BamHI Z Leftward reading Frame 1
<b>CagA</b>	Gen A asociado a citotoxina	Cytotoxin-associated gene A
<b>cagPAI</b>	Isla de patogenicidad de genes asociados a citotoxinas	Citotoxin associated gene pathogenicity island
<b>CD21</b>	Proteína del grupo de diferenciación 21	Cluster of Differentiation 21 Protein
<b>CDH1</b>	Gen que codifica para E-cadherina, una proteína de adhesión intercelular	Cadherin-1
<b>cDNA</b>	DNA complementario	Complementary DNA
<b>CG</b>	Cáncer gástrico	Gastric cancer (GC)

<b>CGaEBV</b>	Cáncer gástrico asociado al virus de Epstein-Barr	Gastric cancer associated to EBV (GCaEBV)
<b>CNF</b>	Carcinoma nasofaríngeo	Nasopharyngeal carcinoma (NPC)
<b>DE</b>	Desviación estándar	Standard deviation (SD)
<b>EBER</b>	RNAs pequeños codificados por EBV	Epstein-Barr virus-encoded small RNAs
<b>EBNA</b>	Antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr	Epstein-Barr virus nuclear antigen
<b>EBV</b>	Virus de Epstein-Barr	Epstein-Barr Virus
<b>GFP-CagA Full</b>	pEGFP-C3-cagA-1-1216	
<b>HDAC1-3</b>	Histona deacetilasa tipo 1	Histone deacetylase 1
<b>HTLV-1</b>	Virus linfotrópico de células T Humanas	Human T-cell lymphotropic virus type 1
<b><i>H. pylori</i></b>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>IARC</b>	Agencia Internacional de Investigación en Cáncer	International Agency for Research in Cancer
<b>IRF7</b>	Factor regulador del interferón 7	Interferon regulatory factor 7
<b>KSV</b>	Virus del sarcoma de Kaposi	Kaposi sarcoma virus
<b>LB</b>	Linfoma de Burkitt	Burkitt Lymphoma (BL)
<b>LCL</b>	Línea celular linfoblastoide	Lymphoblastoid cell line
<b>LH</b>	Linfoma de Hodgkin	Hodgkin Lymphoma (HL)
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido	Lipopolysaccharide
<b>LMP</b>	Proteína latente de membrana	Latent membrane protein
<b>MALT</b>	Linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas	Mucosa-associated lymphoid tissue
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógeno	Mitogen activated protein kinase
<b>MCC</b>	Gen mutado en cáncer colorrectal	Mutated gene in Colorectal Cancers
<b>MCP</b>	Proteína principal de cápside	Major Capsid Protein
<b>MCPyV</b>	Poliomavirus de células de Merkel	Merkel Cell Polyomavirus
<b>MELT</b>	Curva de fusión (Temperatura de desnaturalización)	Melting curve
<b>MI</b>	Mononucleosis Infecciosa	Infectious mononucleosis (IM)
<b>MN</b>	Mononucleares	

<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección	Multiplicity of Infection
<b>NaB</b>	Butirato de sodio	Sodium butyrate
<b>PAF</b>	Poliposis Adenomatosa Familiar	Familial adenomatous polyposis (FAM)
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos	Patogen associated molecular patterns
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-cinasa	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C	Protein kinase C
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	Fosfolipasa C gamma	Phospholipase C gamma
<b>PMA</b>	Forbol-12-miristato-13-acetato	Phorbol 12-myristate, 13-acetate
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares	
<b>RT-PCR</b>	Transcripción reversa y reacción en cadena de polimerasa	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
<b>RT-qPCR</b>	Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real	Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>SHP2</b>	Fosfatasa de tirosina 2	Src homology tyrosine-protein phosphatase-2. (SHP2) = tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 (PTPN11)
<b>sncRNAs</b>	RNAs cortos no codificantes (ej. EBER1 y EBER2)	Small non-coding RNAs
<b>STAT</b>	Transductor y activador de transcripción	Signal transducer and activator of transcripton
<b>T4SS</b>	Sistema de secreción tipo IV	Type IV secretion system
<b>VCA</b>	Antígeno de cápside viral	Viral capsid antigen
<b>VHB</b>	Virus de Hepatitis B	Hepatitis B virus (HBV)
<b>VHC</b>	Virus de Hepatitis C	Hepatitis C virus (HCV)
<b>VPH</b>	Virus del Papiloma Humano	Human papillomavirus (HPV)



## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>2</b>
2.1	Generalidades del cáncer.....	2
2.2	Carcinogénesis .....	3
2.2.1	Oncogenes y genes supresores de tumores. ....	4
2.2.2	Agentes cancerígenos. ....	5
2.3	Cáncer Gástrico.....	6
2.3.1	Clasificación .....	7
2.3.2	Factores de riesgo.....	9
2.4	<i>Helicobacter pilory</i> .....	11
2.4.1	Carcinogénesis mediada por <i>H. pilory</i> .....	13
2.4.1.1	Citotoxina asociada al gen A (CagA).....	13
2.5	Virus de Epstein-Barr .....	16
2.5.1	CG asociado a EBV .....	19
<b>3</b>	<b>Antecedentes.....</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>Propuesta de trabajo.....</b>	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>Justificación del estudio.....</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Hipótesis .....</b>	<b>27</b>
<b>7</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>28</b>
7.1	Objetivo general.....	28
7.2	Objetivos particulares.....	28
<b>8</b>	<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>29</b>
8.1	Líneas celulares.....	29
8.2	PCR tiempo real.....	30
8.3	Análisis de los RT-PCR.....	32
8.3.1	Normalización.....	33
8.3.2	Expresión transcripcional de genes de EBV por el método de cuantificación relativa.....	34
8.4	Inducción química de la reactivación de EBV en líneas celulares de linfocitos B EBVpos. ....	35

8.5	Transfección del gen <i>cagA</i> en linfocitos B .....	36
8.5.1	Plásmidos .....	37
8.6	Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i> .....	38
8.7	Infección directa de linfocitos B con <i>Helicobacter pylori</i> .....	39
8.8	Copias virales en sobrenadante.....	42
8.9	Análisis estadístico.....	42
<b>9</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>43</b>
9.1	Caracterización del patrón de expresión génica de 6 genes virales en 5 líneas de linfocitos B EBVpos. ....	43
9.2	Inducción química de la reactivación de EBV en linfocitos B. ....	48
9.3	Transfección del gen <i>cagA</i> en linfocitos B HS445. ....	49
9.4	Infección directa de linfocitos B con <i>H. pylori</i> . ....	53
<b>10</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>63</b>
<b>11</b>	<b>Conclusión .....</b>	<b>69</b>
<b>12</b>	<b>Perspectivas .....</b>	<b>69</b>
<b>13</b>	<b>Figuras suplementarias .....</b>	<b>70</b>
<b>14</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>75</b>

# 1 Resumen

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) y el virus de Epstein-Barr (EBV) son dos factores conocidos que contribuyen al cáncer gástrico. La bacteria *H. pylori* se considera el principal factor de riesgo por acción de su oncoproteína CagA. PKC es una cinasa que está involucrada en la reactivación de EBV y CagA también es un conocido activador de PKC. En este escenario es posible que la señalización de CagA pueda funcionar como desencadenante del ciclo lítico de EBV.

Como objetivo principal se planeó determinar si EBV en linfocitos B EBVpos HS445 puede ser reactivado por CagA de *H. pylori* mediante un sistema de transfección *in vitro* y/o mediante un modelo de infección directa de linfocitos B con distintas cepas de *H. pylori*. Para ello, se transfectaron linfocitos B EBVpos HS445 mediante la tecnología de MATra con dos plásmidos: uno con el gen *cagA* y otro sin él. Además, se infectaron directamente los linfocitos B con dos cepas de *H. pylori* (CagApos y CagAneg) a MOI 10 y 100; monitoreadas en 3 tiempos (12, 24 y 48 horas). Mediante RT-PCR se cuantificaron los niveles de expresión de BZLF1 y BCLF1 (gen temprano y gen tardío del ciclo lítico de EBV respectivamente) y las copias virales generadas en el sobrenadante de la infección y la transfección.

Nuestros resultados concuerdan en que los linfocitos B son un tipo celular difícil de transfectar, incluso con tecnologías modernas como MATra. La observación más interesante se obtuvo con la infección directa de los linfocitos B EBVpos con *H. pylori*, en donde encontramos que se induce la reactivación de EBV (medidos por los niveles de expresión de BZLF1 y BCLF1) y la producción de copias virales en el sobrenadante de la infección. La reactivación de EBV en una coinfección con *H. pylori* podría explicar la presencia de ambos en las lesiones gástricas, lo cual aumentaría el riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

## 2 Introducción

### 2.1 Generalidades del cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular descontrolado o inadecuado. Las células y los tejidos son sistemas complejos con etapas críticas y puntos de control que garantizan la normalidad del crecimiento, desarrollo y función (Miles, 2005). Hanahan y Weinberg en el 2000 describieron seis características adquiridas durante la carcinogénesis y el desarrollo tumoral: mantenimiento de la señalización proliferativa, silenciamiento de los supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, angiogénesis y activación de la invasión y la metástasis. Recientemente, los desarrollos tecnológicos han llevado a avances significativos en la comprensión del cáncer, por lo tanto, Hanahan y Weinberg extendieron sus seis características originales considerando también inflamación, inestabilidad genómica, desregulación del metabolismo celular y evasión de la respuesta inmune (Fig. 1). Además, destacaron la gran heterogeneidad celular de los tumores (Hanahan & Weinberg, 2011).



**Figura 1. Factores adquiridos durante la carcinogénesis.** (Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011).

Entre 2005 y 2015, la incidencia de cáncer aumentó en un 33%, de los cuales el 12,6% se debieron al crecimiento de la población, el 16,4% debido al envejecimiento de la población y el 4,1% al aumento de la tasa de incidencia específica por edad. En hombres, el cáncer más común a nivel mundial es el cáncer de próstata (1,6 millones de casos), mientras que el cáncer de tráquea, bronquios y pulmón son la principal causa de muerte por cáncer (1,2 millones). En las mujeres, el cáncer más común es el cáncer de mama (2,4 millones de casos), y también es la causa principal de muerte por cáncer (523,000 muertes) (Global Burden of Disease Cancer, 2017).

## 2.2 Carcinogénesis

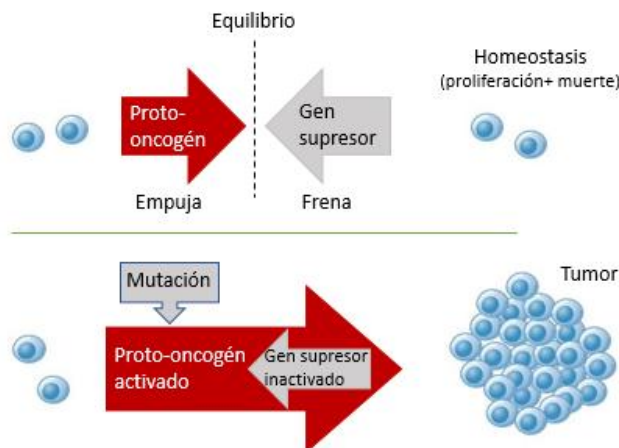
La carcinogénesis es un proceso de múltiples etapas, que van desde un estímulo carcinogénico inicial hasta la formación final del cáncer. La evolución de una célula normal hacia una célula cancerosa es un proceso complejo que lleva a la aparición de un conjunto de células que ya no tienen las mismas posibilidades de control que las células normales. La aparición de una población de células neoplásicas se puede dividir en las siguientes etapas: iniciación, promoción y progresión (Berenblum, 1975) (Rundhaug, Fischer, Rundhaug, & Fischer, 2010) (Fig. 2). Generalmente se consideran tres principales clases de genes esenciales en la carcinogénesis: proto-oncogenes, oncogenes y genes supresores de tumores.



**Figura 2. Modelo general de carcinogénesis.** (Modificado de Rundhaug et al., 2010).

### 2.2.1 Oncogenes y genes supresores de tumores.

Los oncogenes se caracterizan por su capacidad de transformar una célula mediante la desregulación de la expresión o de una función. Estos genes pueden provenir de otros llamados proto-oncogenes (genes potencialmente oncogénicos) que al mutar transforman a las células normales a cancerosas (Adamson, 1987). Las proteínas codificadas por los oncogenes se conocen como oncoproteínas que conducen a una división celular incrementada, disminución de la diferenciación celular e inhibición de la muerte celular, procesos importantes para el desarrollo celular normal participando en la formación y mantenimiento de tejidos y órganos (Chial, 2008). Su acción continua causa una activación constitutiva de ciertas vías de señalización funcionando como factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, factores de transcripción, proteínas anti-apoptóticas, entre otros (Greim & Snyder, 2008). Los reguladores negativos del ciclo celular son los productos de los genes supresores de tumores y tienden a ser menos activos (o incluso completamente inactivos) en las células cancerosas y su ausencia o formas recesivas favorecen la transformación maligna. Los oncogenes tienen un carácter dominante y producen transformación maligna por su activación, mientras que los genes supresores de tumores inducen el mismo efecto, ya sea por su ausencia o regulación negativa (Fig. 3) (Grandjouan & Henry, 1988).



**Figura 3. Regulación celular de los protooncogenes y los genes supresores de tumor.** (Modificado de Cavenee, 1995).

Uno de los supresores de tumores más importante es la proteína tumoral p53, que desempeña un papel clave, ya que es un punto de control del ciclo celular bloqueando la progresión en respuesta al DNA dañado (Raven, 2014). En las células de cáncer, p53 comúnmente falta, no es funcional o es menos activa de lo normal. (Volgelstein & Prives, 2010).

### **2.2.2 Agentes cancerígenos.**

Los mecanismos biológicos del cáncer demuestran que éstos se originan por la exposición a múltiples factores externos combinados con cambios genéticos internos. La prevención a la exposición a agentes cancerígenos debe ser una prioridad importante (Sonnenschein & Soto, 2008), ya que las personas con predisposiciones genéticas particulares son más susceptibles a sus efectos que otras (Vogelstein & Kinzler, 2004).

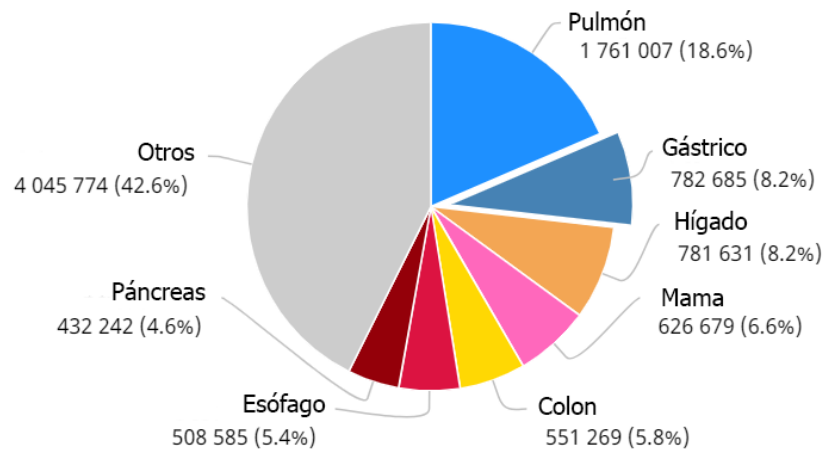
Se conoce una larga lista de agentes químicos carcinogénicos, algunos naturales y otros muchos generados por la actividad industrial humana. Su mecanismo de acción implica la unión covalente al DNA dañando su estructura y provocando mutaciones. Algunos lo hacen directamente, y otros, como el benzopireno o las aflatoxinas, actúan después de su modificación química durante el proceso de desintoxicación en el hígado. El tipo de mutación que causan varía de un compuesto a otro. Los agentes físicos cancerígenos son principalmente las radiaciones ionizantes, la luz ultravioleta y las fibras minerales, debido al potencial mutagénico que tienen al incidir sobre las moléculas de DNA a la que alteran de distintos modos, causando roturas en las cadenas de nucleótidos o induciendo la formación de enlaces covalentes estables entre bases de la misma o distinta cadena, lo que genera a su vez errores durante la replicación del DNA (Greim & Snyder, 2008).

Se estima que aproximadamente uno de cada cinco casos de cáncer en el mundo está vinculado a un agente infeccioso (De Flora & Bonanni, 2011). Hasta la fecha, hay siete virus oncogénicos documentados: virus de la hepatitis B y C (VHB y VHC), virus del papiloma humano (VPH), EBV, virus linfotrópico de células T humanas 1 (HTLV-1), poliomavirus de células de Merkel (MCPyV), y el virus del sarcoma de

Kaposi también conocido como virus herpes humano 8 (KSV); también se ha registrado una bacteria oncogénica (*Helicobacter pylori*) y tres parásitos (*Schistosoma haematobium*, *Opithorchis viverrini* y *Clonorchis sinensis*) (De Flora & Bonanni, 2011; IARC, 2011).

### 2.3 Cáncer Gástrico

El cáncer gástrico (CG) es la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo (Fig. 4). Se estima que en 2018 se produjeron más de un millón de casos nuevos de CG (1,033,701 casos, 5.7% del total), lo que la convierte en la quinta neoplasia maligna más común en el mundo después de cáncer de pulmón, mama, colon y próstata. Las tasas de mortalidad más altas estimadas se encuentran en Asia oriental (24 por 100,000 en hombres, 9.8 por 100,000 en mujeres), la más baja en América del Norte (2.8 y 1.5, respectivamente) (GLOBOCAN, 2018).

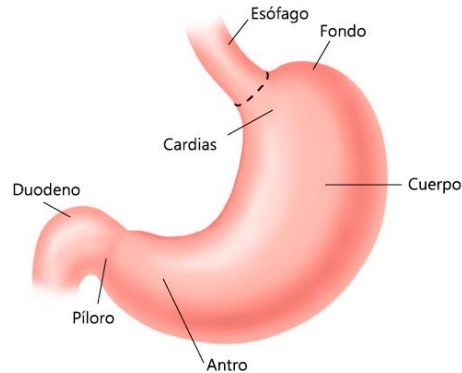


**Figura 4. Mortalidad por cáncer.** Número estimado de muertes por cáncer a nivel mundial en ambos sexos, en todas las edades en el año 2018 (GLOBOCAN, 2018).

La gran mayoría de los cánceres gástricos son adenocarcinomas (aproximadamente 90%), es decir, que surgen del epitelio glandular de la capa más superficial del estómago. Sin embargo, también hay linfomas del tejido linfoide asociado a mucosa (MALT), y los leiomiomas que surgen de los músculos que



rodean la mucosa (Karimi, Islami, Anandasabapathy, Freedman, & Kamangar, 2014). El estómago se divide en varios subsitios anatómicos, que incluyen el cardias (parte superior del estómago), el fondo, el cuerpo, el antro y el píloro (Fig. 5). Estas áreas se distinguen no sólo por su posición anatómica, sino por presentar diferencias histológicas.



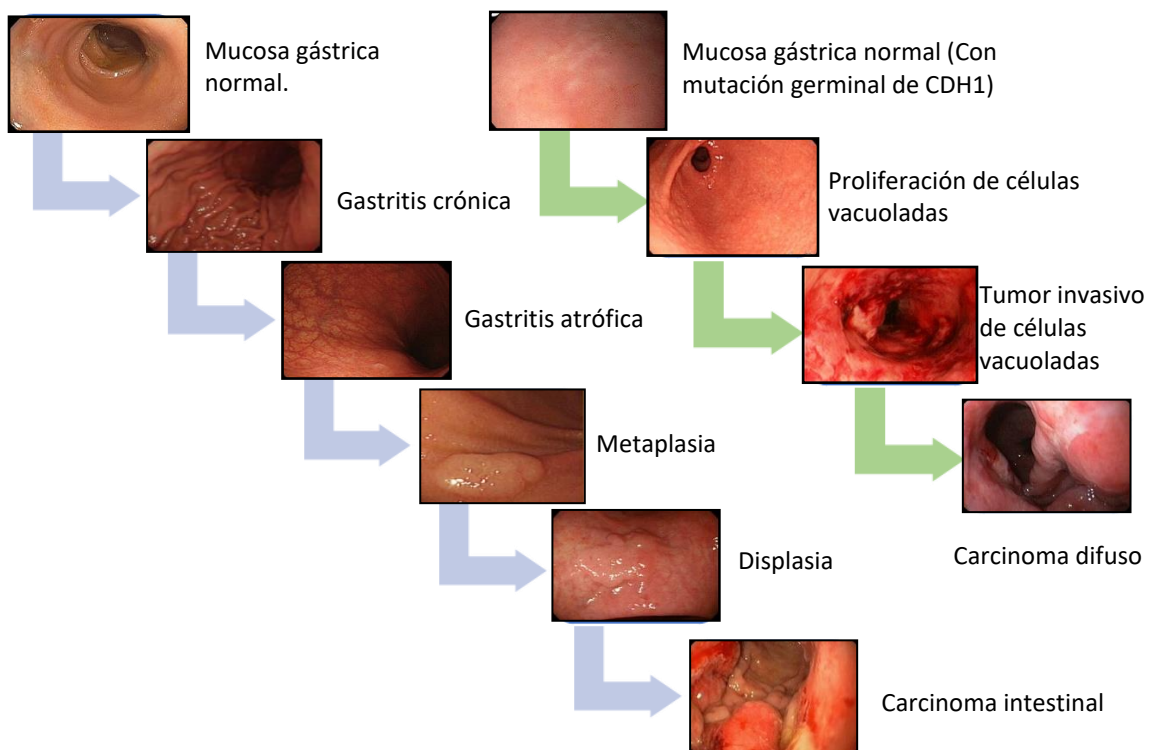
**Figura 5. Diagrama general del estómago.** (Abbruzzese, Evans, Willett, & Preiser, 2003).

### 2.3.1 Clasificación

Los carcinomas gástricos son morfológicamente heterogéneos, resultando en varias clasificaciones. En 1965 Lauren propuso una forma simplificada para la clasificación de los carcinomas gástricos que posteriormente se convirtió en una herramienta eficiente para estudiar el origen del CG. Histológicamente la clasificación de Lauren está basada en la observación de varios casos de CG dividiéndolos en dos tipos principales: Adenocarcinomas tipo intestinal y tipo difuso, además de un tipo indeterminado y uno mixto (Lauren, 1965). El carcinoma tipo intestinal forma tumores glandulares bien o moderadamente diferenciados, algunas veces el poco diferenciado se desarrolla solo en la periferia del tumor. En el carcinoma difuso las células epiteliales pierden cohesión y estimulan el crecimiento de tejido conectivo en exceso. El ritmo mitótico del carcinoma difuso es más lento que el del carcinoma intestinal. El carcinoma mixto contiene regiones tumorales del tipo intestinal y difuso aproximadamente en proporciones iguales y el tipo indeterminado se compone de

tumores tan indiferenciados que no pueden clasificarse en las categorías anteriores (Abbruzzese et al., 2003).

Se cree que los subtipos intestinal y difuso del adenocarcinoma gástrico resultan de dos vías patogénicas distintas: la vía Correa para el tipo intestinal y el modelo Carneiro para el tipo difuso hereditario (Fig.6). Correa postuló que el tipo intestinal de adenocarcinoma gástrico es la consecuencia de cambios progresivos en la mucosa gástrica con metamorfosis de la mucosa gástrica normal a carcinoma a través del desarrollo de inflamación, atrofia, metaplasia y displasia (Correa, 1988). El modelo de Carneiro para el desarrollo del CG difuso ha sido propuesto con base en el examen histológico detallado de toda la mucosa gástrica a partir de muestras de gastrectomía profiláctica de portadores de mutaciones en línea germinal del gen *CDH1* (Carneiro et al., 2004).



**Figura 6. Vías de carcinogénesis gástrica:** Correa (Carcinoma intestinal) y Carneiro (Carcinoma difuso). (Modificado de Carneiro et al., 2004; Correa, 1988).

### 2.3.2 Factores de riesgo

Se han descubierto varios factores de riesgo que hacen que una persona tenga más probabilidades de desarrollar CG como son los siguientes:

Distribución geográfica: La incidencia de CG es mayor en poblaciones no caucásicas (Jemal et al., 2009). Las tasas de incidencia más altas documentadas están en Asia oriental, Europa oriental y América del Sur, mientras que América del Norte y África muestran las tasas más bajas (Goldstein & Hirschhorn, 2004; Jemal et al., 2011). Se han observado variaciones significativas en la incidencia de CG entre diferentes grupos étnicos que viven en la misma región; los afroamericanos, los hispanos y los nativos americanos se ven más afectados que los caucásicos en los Estados Unidos (Parkin, 2004). Sin embargo, la distribución geográfica del CG no puede atribuirse solo a las diferencias raciales. Por ejemplo, se encontró que las personas que migran desde áreas de alta incidencia como Japón a regiones de baja incidencia como los Estados Unidos tienen un riesgo reducido de CG que las que permanecen en su lugar de origen (Howe et al., 2006; Parkin, 2004).

Edad y sexo: Se sabe que la incidencia de cáncer de estómago aumenta con la edad, y la incidencia máxima ocurre entre los 60-80 años (Parkin, 2004). La enfermedad se encuentra en mayor proporción en el sexo masculino en casi todos los países, con tasas de dos a cuatro veces más altas que las mujeres (Crew & Neugut, 2006).

Factores genéticos: Hay una variedad de genes que mutados, aumentan el riesgo de CG como *MCC*, *APC* y *p53* que son genes supresores de tumores que se han identificado en un gran porcentaje de CGs (Rhyu, Park, Jung, Choi, & Meltzer, 1994). Varios estudios han identificado a la E-cadherina, una molécula de adhesión dependiente de calcio que es responsable de la unión célula a célula, como un componente importante en la cascada de carcinogénesis gástrica (Brooks et al., 2004; Guilford et al., 1998; Ilyas & TomLinson, 1997). La susceptibilidad genética

se asocia a la transmisión hereditaria de un único alelo mutado de *CDH1* (codifica para E-cadherina) (Oliveira, Seruca & Carneiro, 2006). Si hay una mutación adquirida en el segundo alelo del gen de E-cadherina, la pérdida de la proteína conlleva a la pérdida de la adhesión intracelular (Robertson & Jankowski, 2008). Múltiples síndromes están asociados con el carcinoma gástrico, como la poliposis adenomatosa familiar (PAF) cuyo defecto genético se encuentra en el gen *APC* (Adenomatous Polyposis Coli tumor supresor) implicado en la vía de señalización de Wnt, lo que predispone al desarrollo de diferentes tipos de tumores, incluidos cáncer de colon y gástrico (McKie, Filipe, & Lemoine, 1993).

Factores ambientales y estilo de vida: Hay muchos factores ambientales y de comportamiento que afectan el desarrollo del CG. Fumar se considera un contribuyente significativo. Un estudio en 2007 reveló un aumento en el riesgo de desarrollar CG en un 60% para los hombres y 20% para las mujeres que fuman (Ladeiras et al., 2008). La exposición al tabaco en cualquier momento durante la vida del paciente tiene un riesgo del 18% y 45% para el desarrollo de CG de antro y cuerpo y carcinomas gástricos de cardias, respectivamente (Engel et al., 2003). También se ha demostrado que el consumo de altos niveles de sal y carne procesada está asociado positivamente con el CG (van den Brandt & Goldbohm, 2003). Los pacientes que han tenido cirugía gástrica por úlcera péptica también tienen 2-4 veces más riesgo de desarrollar CG. Esta asociación puede ser el resultado de la disminución de la producción de mucosa en el remanente gástrico y la inflamación crónica debido al reflujo de la bilis en el sitio (Stalnikowicz & Benbassat, 1990).

Agentes infecciosos: Se han asociado agentes patógenos virales y bacterianos en el desarrollo del cáncer. La bacteria *H. pylori* es un agente causal primario no solo para la enfermedad de úlcera péptica y gastritis crónica, sino también para el CG. Se estima que *H. pylori* participa en 80% de los casos de cáncer gástrico (Parkin,

2006; Parsonnet et al., 1997). Además, también se asocia EBV al CG y comprende aproximadamente el 10% de todos los CG (Shibata & Weiss, 1992).

Algunos de los factores de riesgo asociados a CG funcionan tanto a nivel individual como social, y se pueden ver como factores asociados con el hospedero, el entorno o ambos (Fig. 7). Un cambio en este equilibrio precario o un aumento en la ingesta de sal, puede afectar la velocidad de la cascada de eventos que conducen al desarrollo del CG (Piazuelo, Epplen, & Correa, 2010). Un programa plausible para la prevención del CG implica la ingesta de una dieta balanceada que contenga frutas y verduras, un saneamiento e higiene y el seguimiento de las lesiones precancerosas (Nagini, 2012).

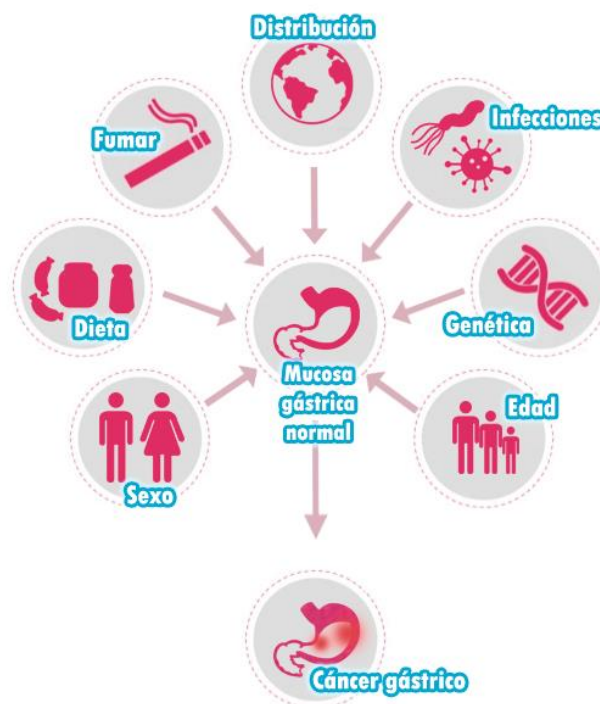
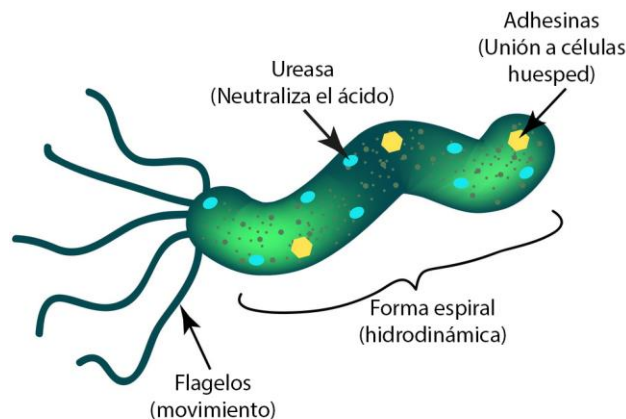


Figura 7. Factores de riesgo implicados en la promoción del CG.

## 2.4 *Helicobacter pilory*

La infección crónica con *H. pylori* se considera esencial para el desarrollo del CG, por lo que la IARC ha clasificado a esta bacteria como carcinógeno de tipo I (IARC, 1994). *H. pylori* es una bacteria Gram-negativa multiflagelada, espiral,

microaerofílica que se localiza principalmente en el lumen gástrico. Identificada y cultivada por primera vez en 1982 por Marshall y Warren (Marshall & Warren, 1984), *H. pylori* está muy adaptada a colonizar el estómago humano. Posee una potente ureasa que le permite vivir en el microambiente ácido del lumen gástrico. Esto se logra al hidrolizar la urea que se filtra en la mucosa, dando como resultado una nube de amonio que protege a la bacteria del pH ácido (Cover & Blaser, 2009). Además sus flagelos le facilitan penetrar y anidarse bajo la capa de moco evadiendo la respuesta inmune del hospedero, mientras que la adhesión a las células epiteliales mediada por adhesinas le permiten establecer una permanencia a largo plazo en la mucosa gástrica (Valenzuela, 2004) (Fig. 8). La adhesión de las bacterias a las células epiteliales induce una respuesta inflamatoria, lo que resulta en el reclutamiento de neutrófilos, seguido de linfocitos B, T y macrófagos. En consecuencia, se generan grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, lo que ocasiona daño a las células epiteliales (Correa & Houghton, 2007).



**Figura 8. Estructura básica de *Helicobacter pylori*.** (Modificado de infografía creada por Mikrostoker, s.f.)

*H. pylori* está presente en más del 50% de la población humana (Parkin, 2006). En países en desarrollo la infección se adquiere a edades tempranas. En México, a la edad de un año el 20% de los niños están infectados, a los 10 años el 50% y a la edad de 20 el 80% de la población está infectada (Torres, Herrera & Muñoz, 1998). A pesar de la amplia distribución de la infección por *H. pylori*, se estima que solo

una fracción de los sujetos infectados desarrollará adenocarcinoma gástrico (Parkin, 2006).

#### **2.4.1 Carcinogénesis mediada por *H. pylori***

No está completamente claro cómo es que *H. pylori* causa CG. Dos vías potenciales son las más consideradas: la acción indirecta de *H. pylori* en las células epiteliales gástricas al causar inflamación y la acción directa de las bacterias sobre las células epiteliales. Aunque la relación entre las dos vías no está clara, ambas vías parecen trabajar juntas para promover el desarrollo de CG (Chiba, Marusawa & Watanabe, 2008).

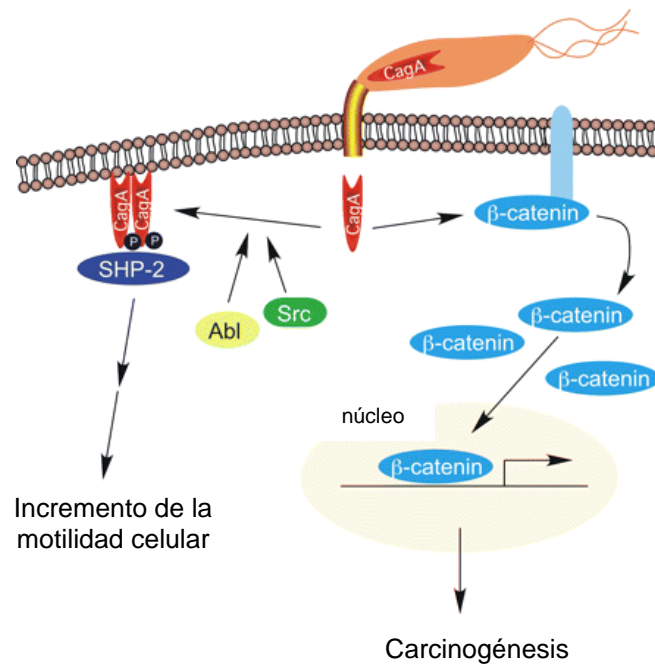
Varias proteínas codificadas por el genoma de *H. pylori* están relacionadas con la generación de cáncer. Por ejemplo, la isla de patogenicidad de genes asociados a citotoxinas (cagPAI), un importante determinante de la virulencia bacteriana es constituido por un grupo de genes presentes en aproximadamente el 60% de los aislados de *H. pylori* de países occidentales y en casi todos los aislados de países de Asia oriental. Es una región de 40 kb de DNA cromosómico que codifica aproximadamente 31 genes que forman un sistema de secreción tipo IV (T4SS) para translocar productos bacterianos en la célula hospedero. El gen *cagA* reside dentro del cagPAI y es responsable de la mayoría de los fenotipos malignos asociados a *H. pylori* (Hatakeyama, 2009). Aunque todas las cepas de *H. pylori* inducen gastritis, las cepas que contienen el cagPAI aumentan los riesgos de gastritis severa, gastritis atrófica y CG distal en comparación con las cepas que carecen de ella (Blaser, Chyou, & Nomura, 1995).

##### **2.4.1.1 Citotoxina asociada al gen A (CagA)**

El potencial oncogénico de CagA se demostró directamente mediante la observación de que ratones transgénicos que expresan constitutivamente *cagA* desarrollan carcinomas gastrointestinales y tumores malignos hematopoyéticos de forma espontánea (Ohnishi et al., 2008). La mayoría de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con úlcera péptica portan el gen *cagA* (CagA

positiva/CagApos), mientras que muchas cepas de *H. pylori* de personas asintomáticas infectadas carecen del gen (CagA negativa/CagAneg) (Akopyants et al., 1998). Las cepas CagA positivas son más prevalentes en regiones de alto riesgo de CG que en las poblaciones de bajo riesgo (Parsonnet et al., 1997). Se han descrito varios mecanismos por los que CagA induce la transformación en una célula hospedero, como por ejemplo, a través de su interacción con la proteína SHP-2, una tirosin fosfatasa citoplasmática (Higashi et al., 2002). Después de su inyección en la célula, CagA es fosforilada en tirosinas ubicadas dentro de un motivo repetido *in tandem* que contiene los aminoácidos Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (motivos EPIYA) por las cinasas de la familia Src y Abl, una vez fosforilada se une a SHP-2. CagA perturba las funciones normales de las células epiteliales gástricas a través de la desregulación de SHP-2, induciendo reordenamientos del citoesqueleto, mayor proliferación y motilidad (Higashi et al., 2002; 2004) (Fig. 9). En células AGS derivadas de un paciente con CG, la internalización de CagA y la subsiguiente señalización celular alterada dan como resultado un cambio morfológico de células dependiente de actina conocido como fenotipo "colibrí", en el que las células se transforman de una forma poligonal uniforme a una forma severamente alargada caracterizada por la formación de proyecciones en forma de aguja (Segal, Cha, Lo, Falkow & Tompkins, 1999). CagA también induce la señalización de la vía de MAPK (Proteína cinasa activada por mitógeno) promoviendo una proliferación celular anormal y la progresión del ciclo celular. Esta última observación, junto con los cambios fenotípicos, demuestra que la desregulación de las funciones normales de SHP-2 por su unión con CagA juega un papel importante en la transformación celular y la promoción de CG (Higashi et al., 2004). CagA no fosforilada también interactúa con ciertas proteínas de la célula hospedero y produce la activación aberrante de  $\beta$ -catenina y la alteración de los complejos de unión apical (Amieva et al., 2003) (Fig.9). Estas interacciones rompen las uniones adherentes y esto conduce a una pérdida de polaridad celular y la inducción de efectos mitogénicos y proinflamatorios que pueden ser importantes en la carcinogénesis gástrica (Suzuki et al., 2009).





**Figura 9. Señalización molecular en la célula hospedadora inducida por la internalización de CagA (Peek, 2008).**

Los motivos EPIYA en los que sucede la fosforilación de CagA se pueden repetir hasta cinco veces en el extremo C-terminal de la proteína. Las secuencias codificantes de los motivos EPIYA se encuentran rodeadas por segmentos repetidos de DNA; basados en estos se han denominado cuatro tipos EPIYA: A, B, C y D (Backert & Selbach, 2008; Hatakeyama, 2004). La patogenicidad de las diferentes cepas de *H. pylori* depende del número y tipo de repetido EPIYA, por ejemplo, las cepas asiáticas (EPIYA A y B seguido de 1-3 repeticiones de EPIYA D) son más patogénicas que las cepas occidentales (EPIYA A y B seguido de 1-3 repeticiones de EPIYA C) ya que el segmento EPIYA-D se une a SHP-2 con más fuerza que el segmento EPIYA-C y, por lo tanto, condicionan una mayor actividad de CagA (Arévalo, Trespacios, & Otero, 2009; Backert & Selbach, 2008). Además, el número de repeticiones de EPIYA es de especial importancia en CG ya que el riesgo es significativamente más alto en pacientes infectados con cepas de *H. pylori* que presentan múltiples repeticiones (Backert & Selbach, 2008).

## 2.5 Virus de Epstein-Barr

El virus de Epstein-Barr fue descubierto en 1964 en linfocitos B cultivados de un linfoma de Burkitt (LB) endémico de África (Epstein, Achong & Barr, 1964). EBV presenta un núcleo proteico en forma de toroide que contiene al genoma, una nucleocápside que está formada por 162 capsómeros, un tegumento de proteína y una envoltura con glicoproteínas que forman espículas externas (Fields, Knipe & Howley, 2007) (Fig. 10). Su genoma es una molécula de DNA de cadena doble de aproximadamente 172 kb que codifica para aproximadamente 80 diferentes proteínas (Baer et al., 1984).

Este virus también es un agente carcinogénico reconocido (IARC, 1997). Sus propiedades oncogénicas se confirmaron cuando se demostró que transformaba células B *in vitro* (Pope, Horne & Scott, 1968). Sin embargo, también se ha demostrado que EBV infecta asintóticamente a la mayoría de la población adulta del mundo, ya que el virus ha evolucionado para persistir en las células B durante la vida de las personas infectadas (Henle, Hummeler & Henle, 1966).

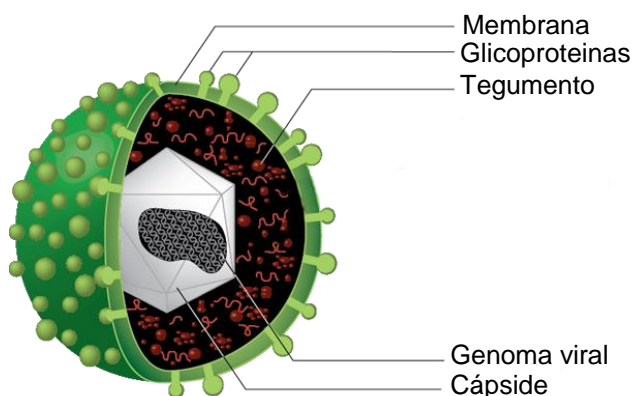
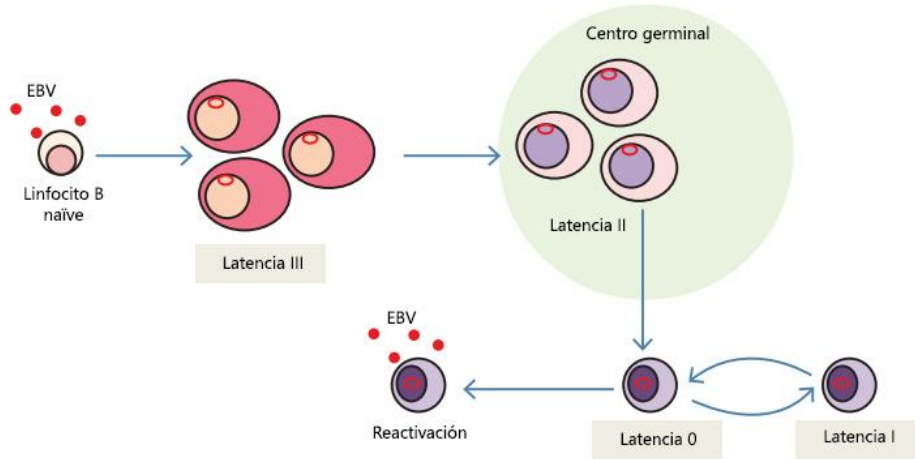


Figura 10. Estructura del virus de Epstein-Barr (Reinhard Zeidler, s.f).

EBV se transmite por vía oral y tiene al menos dos tipos de células diana naturales; los linfocitos B y las células epiteliales (Niedobitek & Young, 1994). La infección primaria generalmente es asintomática o causa mononucleosis infecciosa (MI)

(Henle, Henle & Diehl, 1968). En la infección primaria, EBV infecta los linfocitos B de la mucosa orofaríngea. EBV también puede infectar células epiteliales demostrado por la presencia del virus en las células tumorales de casi todos los carcinomas nasofaríngeos (CNFs) indiferenciados y en el 10% de los CG (Fields et al., 2007; Greenspan et al., 1985).

La infección de los linfocitos B por este virus ocurre por la unión de la partícula viral a CD21 (receptor CR2 del factor de complemento C3d) en la superficie celular; la proteína de pegado en EBV es la glicoproteína gp350/220 de la envoltura que también media la internalización del virus en la célula por endocitosis. Una vez internalizado, el DNA viral migra al núcleo donde se circulariza para formar un episoma o elemento circular extracromosómico (Fingerroth et al., 1984; Rickinson et al., 1984). Este proceso *in vitro* en linfocitos B de sangre periférica inmortaliza las células B en reposo dando lugar al desarrollo de líneas celulares linfoblastoides (LCL's), que son una población de células B que prolifera activamente. Las LCL's expresan constitutivamente un conjunto de genes virales latentes que consisten en seis antígenos nucleares (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C y LP), tres proteínas latentes de membrana (LMP1, 2A y 2B), y dos sncRNAs nucleares (EBER1 y 2) y varios miRNAs virales (Fig. 11). Se han reconocido tres tipos de latencia viral en función de la expresión variable de estos genes, principalmente en aislados clínicos de células obtenidas de pacientes con linfomas y carcinomas EBV positivos (Lat I, II y III) (Brooks et.al., 1992; Fields et al., 2007; Gregory et al., 1990; Herbst et.al., 1993; Rowe et al., 1987). La Lat III está presente en las LCL's y en linfoproliferaciones en individuos inmunocomprometidos. En linfoma de Hodgkin (LH) y cáncer nasofaríngeo (CNF) se expresan las LMPs además de EBNA1, los EBERs y varios miRNAs virales (Lat II) y en el linfoma de Burkitt (LB) solo los EBERs, algunos miRNAs virales y EBNA1 (Lat I) (Tabla 1). En portadores asintomáticos EBV se encuentra en linfocitos B en latencia 0, en la cual no hay expresión de proteínas virales (Lat 0).



**Figura 11. Infección viral y persistencia de EBV.** (Modificado de: Vockerodt et al., 2015).

Tipo de latencia	Genes expresados	Encontrada en:	Función propuesta
<b>Latencia III</b>	EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP LMP1 LMP2A, 2B sncRNAs: EBER1, 2 miRNAs: BART, BHRF1 y otros	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LCL's</li> </ul>	Activa a los linfocitos B naíve para volverlos linfoblastos proliferativos.
<b>Latencia II</b>	EBNA1 LMP1 LMP2A BARF1 sncRNAs: EBER1, 2 miRNAs: BART, BHRF1 y otros	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfoma de Hodgkin</li> <li>• CNF</li> </ul>	Provee señales de supervivencia para que linfocitos B infectados y activados se diferencien en células B de memoria.
<b>Latencia I</b>	EBNA1 sncRNAs: EBER1, 2 miRNAs: BART, BHRF1 y otros	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfoma de Burkitt</li> </ul>	Permite la segregación del genoma viral a las células hijas en centroblastos y en linfocitos B de memoria en proliferación fisiológica.
<b>Latencia 0</b>	sncRNAs: EBER1, 2 miRNAs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Portadores asintomáticos</li> </ul>	Permite la persistencia del virus en linfocitos B de memoria quiescentes. No es detectable por el sistema inmune

**Tabla 1. Programas de latencia de EBV.** (Brooks et.al., 1992; Fields et al., 2007; Gregory et.al., 1990; Herbst et.al., 1993; Rowe et al., 1987, Ungerleider et al., 2018)

El cambio de infección latente a lítica está precedido por la expresión de la proteína transactivadora BZLF1 (Zta), un producto genético temprano inmediato. Esta proteína actúa como el interruptor que desencadena la replicación viral y también regula el alza de otros genes tempranos (Dawson, Eliopoulos, Dawson & Young, 1995), que a su vez median la transcripción de la DNA polimerasa viral y timidina cinasa que son importantes para la replicación del DNA viral. Finalmente, se sintetizan productos génicos tardíos, incluidos los componentes estructurales del virus, como el antígeno de la cápside viral (VCA) y la glicoproteína gp350/220 de la envoltura (Tabla 2) (Straus, Cohen, Tosato, & Meier, 1993)

Fase lítica	Genes expresados	Función propuesta
Temprana	<i>BZLF1 (Zta)</i> <i>BRLF1 (Rta)</i> <i>BHRF1</i> <i>BALF2</i> Y otros	Producción de partículas virales infecciosas que permiten que el virus se transmita de una célula a otra y de un hospedero a otro.
Tardía	<i>BcLF1 (VCA)</i> <i>gp350/220</i> <i>MCP</i> Y otros	

**Tabla 2. Ciclo lítico de EBV.** (Speck, Chatila, & Flemington, 1997; Davenport & Pagano, 1999; Tsurumi, Fujita, & Kudoh, 2005; Murata, 2014; Novalic & van Rossen, 2016)

### 2.5.1 CG asociado a EBV

Se ha demostrado que aproximadamente el 10% de los casos de CG están asociados con la infección directa por EBV (Akiba, Koriyama, Goepfert & Eizuru, 2008; Sousa, Correia, Medeiros & Dinis, 2008). La evidencia de la implicación del EBV en el carcinoma gástrico se basa en la presencia de productos génicos virales, como pequeños RNAs codificados por EBV (EBER's) en células tumorales, pero no en el epitelio no neoplásico circundante (Shibata & Weiss, 1992), la presencia de EBV clonal en las células tumorales (Imai et al., 1994) y anticuerpos elevados contra EBV en sueros prediagnósticos de pacientes con carcinoma gástrico asociado a

EBV (Levine et al., 1995). Además, estudios recientes han sugerido que el CG asociado al EBV (CGaEBV) es un subgrupo distinto de cánceres gástricos con características moleculares específicas (Wang et al., 2014). Entre las diferencias más evidentes se encuentran un programa de expresión génica particular y un genoma celular fuertemente metilado. La secuenciación del transcriptoma del CGaEBV clasifica la latencia de EBV, como una variación del típico programa de latencia II encontrado en CNF (Strong et al., 2013). En la mayoría de los estudios se ha abordado la presencia de las proteínas clásicas de latencia II, con solo EBNA-1 encontrado consistentemente positivo en muestras clínicas, y algunos estudios respaldan la presencia de LMP2A (Luo et al., 2005). Por el contrario, la expresión de LMP1 ha sido negativa en la mayoría de estos estudios (Bass et al., 2014). LMP1 es el oncogén clásico de EBV e interactúa con varias proteínas de la célula hospedero que disparan múltiples vías de señalización celular como NF- $\kappa$ B, MAPK, PI3-K, IRF7 y STAT (Kieser & Sterz, 2015). LMP1 imita la señal de la activación de NF- $\kappa$ B mediada por CD40 previniendo la apoptosis y potencializando el crecimiento celular y la transformación oncogénica (Devergne et al., 1996; Uchida et al., 1999). Además, LMP1 activa la vía PI3K/Akt, lo que resulta en la mejora de la supervivencia celular y la remodelación de los filamentos de actina (Dawson, Tramontanis, Eliopoulos & Young, 2003). LMP2A se ha encontrado en la mitad de los casos de EBVaGC y se ha sugerido que LMP2A contribuye a la carcinogénesis gástrica induciendo la hipermetilación del genoma a través de la fosforilación de STAT3 (Transductor de señal y activador de la transcripción 3) y la regulación positiva de DNMT1 (DNA metiltransferasa 1) (Zhao et al., 2013). Se sospecha que BARP1, otro gen de EBV que es capaz de activar proteínas antiapoptóticas, y LMP2A están involucrados en la carcinogénesis gástrica mediada por EBV (Robertson, 2005). El gen BARP1 se expresa en casi el 100% de los casos de CGaEBV (zur Hausen et al., 2000). La expresión de BARP1 también se observa en CNF, mientras que en general es indetectable en linfocitos B y linfomas EBV positivos (EBVpos), lo que puede ser crucial en las neoplasias epiteliales asociadas a EBV. La transfección de BARP1 en una línea celular de carcinoma gástrico induce alteraciones significativas

en la expresión de genes de la célula hospedero, particularmente en aquellos genes relacionados con la proliferación y la resistencia a la apoptosis (Wang et al., 2006).

Cuando y cómo EBV infecta las células epiteliales aún no está claro. Se propone que los episodios periódicos de reactivación viral de las células B infectadas que transitan por la mucosa del tracto digestivo superior facilitan la infección de las células epiteliales y la transmisión viral a nuevos individuos (Ryan et al., 2009).

### 3 Antecedentes

Se pueden detectar tanto a EBV como *H. pylori* en la mucosa de pacientes que padecen gastritis crónica moderada, donde la infiltración de células inflamatorias es abundante (Kaneda, Matsusaka, Aburatani & Fukayama, 2012). La observación sugirió que la inflamación causada por la infección bacteriana podría promover la infección de la mucosa gástrica por EBV (Iizasa et al., 2012; Rickinson, 2014). La oncoproteína CagA de la bacteria *H. pylori*, puede translocarse no solo en las células epiteliales, sino también, en los linfocitos B humanos a través del sistema de secreción tipo IV y desencadenar su propia activación, lo que puede tener consecuencias biológicas importantes para el hospedero (Lin et al., 2010).

Se postula que, para infectar a las células epiteliales, EBV debe salir primero de latencia de las células B, un paso desencadenado por la expresión del factor viral Zta (factor de transcripción codificado por el gen *BZLF1*), que es el principal orquestador del ciclo lítico. Sin embargo, en el tracto digestivo las señales que desencadenan la expresión de Zta son desconocidas. Un mecanismo podría ser a través de interacciones directas entre *H. pylori* y linfocitos B infectados con EBV. Uno de los principales inductores del ciclo lítico de EBV *in vitro* es el éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (PMA), que actúa a través de la transactivación de *BZLF1*, acción que se puede potenciar en combinación con butirato de sodio (NaB), que inhibe a la histona deacetilasa tipo 1 (HDAC1) e induce la expresión o represión de un grupo de genes (Baumann et al., 1998; Nutter et al., 1987). PKC es una cinasa que se activa directamente por ésteres de forbol como PMA y está involucrada en la reactivación de EBV (Newton, 1997). CagA también es un conocido activador de PKC (Brandt, Wessler, Hartig, & Backert, 2009). En este escenario es posible que la señalización de CagA pueda funcionar como desencadenante del ciclo lítico de EBV, y la pérdida de polaridad celular inducida por CagA también podría favorecer el tropismo de EBV hacia las células epiteliales. Además, los individuos infectados por *H. pylori* y EBV muestran una carga viral



significativamente más alta en el epitelio gástrico, que los no infectados con la bacteria, lo que sugiere un papel de *H. pylori* en la reactivación lítica de EBV (Minoura et al., 2006).

En estudios previos del grupo de trabajo del Dr. Ezequiel M. Fuentes Pananá se ha documentado la participación de EBV en CG. Se encontró evidencia de infección viral del epitelio en pacientes con lesiones gástricas muy tempranas, como gastritis no atrófica, y en CG (Martínez et al., 2014) (Fig. 12). Esto es importante porque apoya la presencia del EBV en la progresión a CG desde lesiones precursoras. Esto también apoya que el estómago es un sitio de reactivación viral similar al de la nasofaringe en la que es necesaria la liberación de partículas virales para facilitar la infección y persistencia del virus.

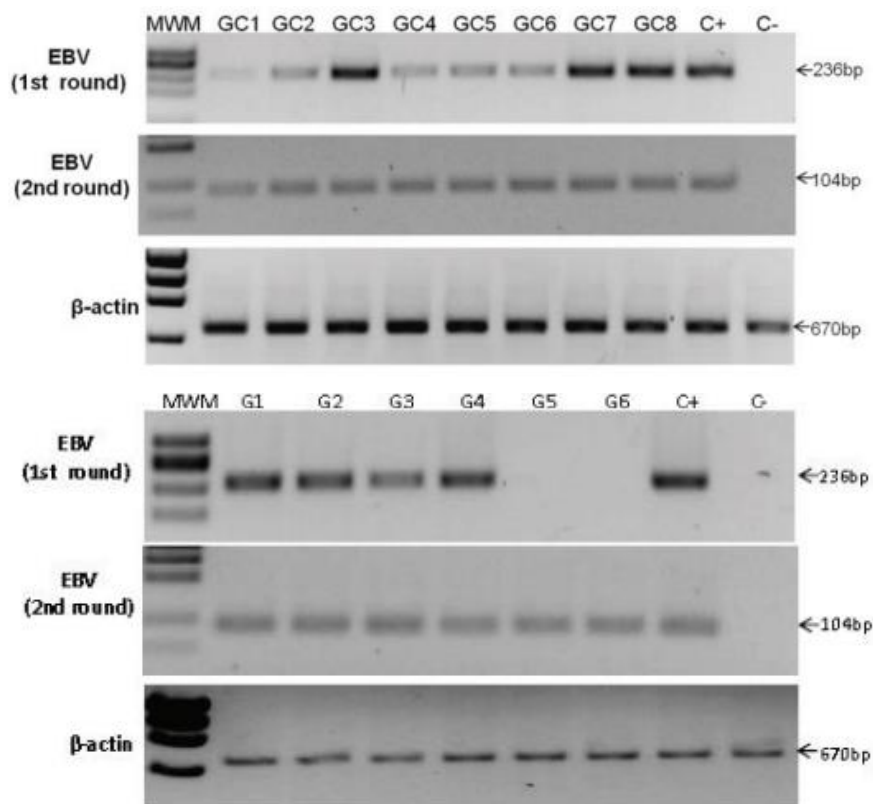
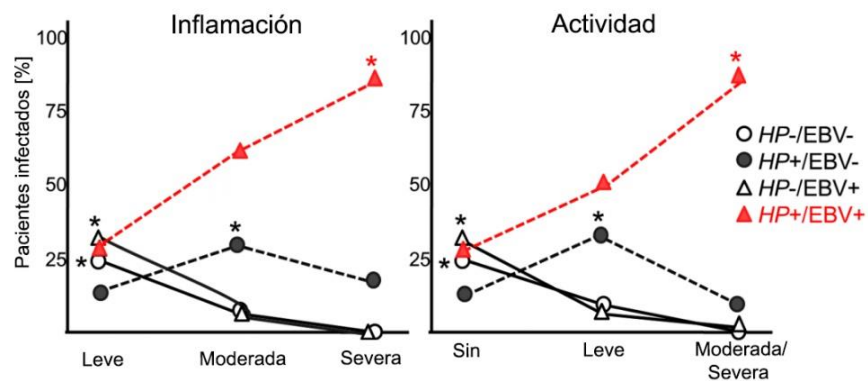


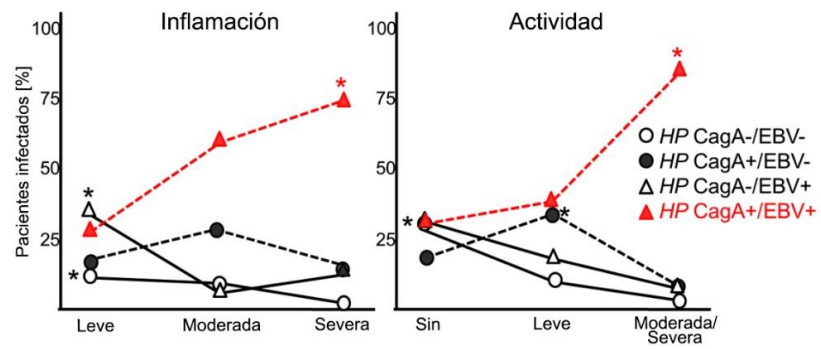
Figura 12. PCR de IR1 (Repetido interno 1) de EBV para la detección del virus en gastritis no atrófica (carriles G1-G6) y en CG (GC1 a GC8). (Martínez et al., 2014).

Además en Cardenas et al., 2015 se analizaron los títulos de anticuerpos aumentados contra EBV-VCA, mostrando que estos tenían una asociación significativamente mayor con lesiones premalignas (valor P = 0.023) y con CG intestinal (valor P = 0.038). Por el contrario, no se observó tal tendencia significativa para CG difuso.

En otro estudio que buscaba entender la contribución de EBV y de *H. pylori* en la inflamación gástrica y la progresión a lesiones severas se encontró que únicamente los individuos coinfectados por ambos patógenos presentan grados severos de inflamación y actividad (Cardenas et al., 2013) (Fig. 13). Además, se analizaron las interacciones positivas entre *H. pylori* CagApos y EBV según el grado de inflamación y se observó que solo los pacientes doblemente infectados (*H. pylori* CagApos/EBVpos) se asociaron significativamente con inflamación severa medida por infiltración de células mononucleares (inflamación) y células polimorfonucleares (actividad) en la mucosa gástrica (Fig. 14). Estos resultados sugieren que la infección por *H. pylori* sola, incluso con las cepas más patogénicas (CagApos) no es suficiente para desarrollar gastritis severa (Cardenas et al., 2013).



**Figura 13. Hp y EBV en pacientes pediátricos con gastritis según los diferentes grados de inflamación (Infiltrados MN) y actividad (Infiltrados PMN) de la lesión. (Cardenas et al., 2013)**



**Figura 14. Hp (CagApos/CagAneg) y EBV en pacientes pediátricos con gastritis según los diferentes grados inflamación (Infiltrados MN) y actividad (Infiltrados PMN) de la lesión (Cardenas et al., 2013).**

## 4 Propuesta de trabajo

Proponemos que en el estómago existe una interacción a nivel molecular entre *H. pylori* y EBV. *H. pylori* promueve la llegada de los linfocitos B al estómago como parte de la respuesta inflamatoria y también de la reactivación viral que favorece la infección del epitelio. En esta interacción es probable que *H. pylori* influya en la expresión génica de EBV en linfocitos B (Fig. 15). Por lo tanto, *H. pylori* podría tener una participación en CGaEBV. Específicamente, la propuesta está basada en entender la influencia de la oncoproteína CagA de la bacteria *H. pylori* en el ciclo de reactivación viral de EBV en linfocitos B.

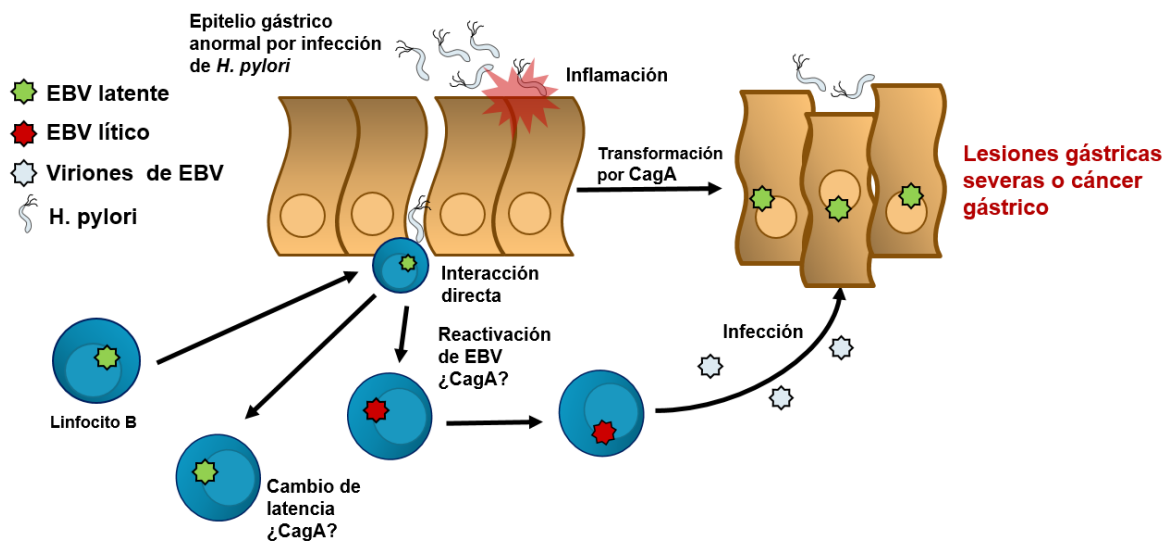


Figura 15. Posible interacción directa de EBV y *H. pylori* en la mucosa gástrica.

## 5 Justificación del estudio

El cáncer es una de las enfermedades más importantes en México. Durante 2000-2012, murieron 69,107 individuos por CG. La tasa de mortalidad de la población mundial es de 5.6 muertes por cada 100,000 habitantes (Sanchez, 2016).

Los eventos moleculares y celulares que llevan al desarrollo de CG aún no se comprenden por completo. La coexistencia de *H. pylori* y EBV en el epitelio gástrico debe estudiarse para entender cómo interactúan ambos patógenos y como esto lleva a daño de la mucosa gástrica, lo que podría tener implicaciones para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad; eventualmente también, podría ayudar a identificar a la población con mayor riesgo de presentar lesiones gástricas graves que puedan derivar en CG.

## 6 Hipótesis

Debido a que EBV y *H. pylori* pueden detectarse en la mucosa de pacientes con lesiones gástricas, se sugiere que la bacteria podría tener interacciones directas con linfocitos B infectados con EBV mediante la señalización de la oncoproteína CagA y ésta podría funcionar como desencadenante del ciclo lítico de EBV o causar un cambio en el patrón de latencia de EBV en los linfocitos B.

## 7 Objetivos

### 7.1 Objetivo general

Determinar si EBV puede cambiar su patrón de latencia o ser reactivado en linfocitos B EBVpos por acción de la oncoproteína CagA de la bacteria *H. pylori*.

### 7.2 Objetivos particulares

1. Diseñar un sistema de PCRs en tiempo real (RT-PCR's) que nos permitan determinar el patrón de expresión genética de 6 genes virales de latencia (*EBNA1*, *EBNA2*, *LMP1*, *LMP2A*) y reactivación (*BZLF1* y *BcLF1*) en 5 líneas celulares de linfocitos B EBVpos (Namalwa, Raji, Akata, HS445 y LCL-HIM1).
2. Determinar si EBV puede ser reactivado por CagA en linfocitos B mediante un sistema de transfección *in vitro* de CagA, cuantificando la producción de copias virales en el sobrenadante de las células transfectadas.
3. Seleccionar qué línea celular de linfocitos B EBVpos se reactiva con mejor eficiencia usando inductores químicos (PMA + NaB) para utilizarla en los ensayos de infección directa con *H. pylori*.
4. Determinar si la infección de linfocitos B EBVpos (HS445) con *H. pylori* (cepas: CagApos y CagAneg) induce la reactivación de EBV cuantificando la expresión de genes líticos virales (*BZLF1* y *BcLF1*) y la producción de copias virales en el sobrenadante de las infecciones mediante la cuantificación de BALF5.

## 8 Materiales y métodos

### 8.1 Líneas celulares

Se seleccionaron 6 líneas de linfocitos B (5 EBVpos y una EBVneg), además de 2 líneas celulares de origen epitelial, una de fácil transfección (MCF-7) y otra que es el modelo de CG más utilizado para realizar infecciones con *H. pylori* (AGS) (Tablas 3 y 4).

Línea celular	Tipo	Latencia asociada (EBV)	Malignidad asociada	Método de cultivo
<b>Raji</b> ATCC-CCL-86	Linfocito B	III	Linfoma de Burkitt	Medio de cultivo RPMI 1640 (ATCC, Cat.30 -2001) + 10% SFB (Gibco No.Cat.12483) + 1x a/a (Gibco No.Cat.15240062)
<b>Namalwa</b> ATCC-CRL-1432			Linfoproliferación	
<b>LCL-HIM1</b> Lab-UIVC		II	Linfoma de Hodgkin	
<b>HS445</b> ATCC-HTB-146		I	Linfoma de Burkitt	
<b>Akata</b> RRID:CVCL_0148		EBVneg		
<b>Ramos</b> ATCC-CRL-1596				

**Tabla 3. Líneas celulares de linfocitos B.** (EBVneg: negativas a EBV); (SFB: Suero fetal bovino); (a/a: antibiótico antimicótico - Anfotericina, estreptomycin, penicilina); (Lab-UIVC: LCLs generadas *in vitro* por el grupo de trabajo del Dr. Ezequiel M. Fuentes Pananá).

Línea celular	Tipo	Latencia asociada (EBV)	Malignidad asociada	Método de cultivo
<b>MCF-7</b> ATCC-HTB-22	Epitelial	EBVneg	Adenocarcinoma de mama	Medio de cultivo DMEM (Gibco No.Cat. 11965092) + 10% SFB + 1x a/a
<b>AGS</b> ATCC-CRL-1739			Adenocarcinoma gástrico	Medio de cultivo F12 (Gibco No.Cat.11765) + 10% SFB + 1x a/a

**Tabla 4. Líneas celulares epiteliales.** (EBVneg: negativas a EBV); (SFB: Suero fetal bovino); (a/a: antibiótico antimicótico - Anfotericina, estreptomycin, penicilina).

Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en botellas de cultivo (Corning; Sigma-Aldrich). Adicionalmente como agente selectivo para células Akata, se adicionó G418 a 700 µg/mL (Gibco No.Cat.10131035).

## 8.2 PCR tiempo real

A partir de un cultivo celular en estado basal (sin estímulos) de las cinco líneas celulares EBVpos y una línea EBVneg como control negativo, se midieron los niveles basales de expresión de 6 genes virales (*EBNA1*, *EBNA2*, *LMP1*, *LMP2A*, *BZLF1* y *BcLF1*) mediante RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction). Se extrajo el RNA de 4x10<sup>6</sup> células utilizando el kit RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN No.Cat.74136) y columnas QIAshredder homogenizer (QIAGEN No.Cat.79656), una vez obtenido el RNA se cuantificó en un Nanodrop 1000 Thermo Scientific y se sintetizó el cDNA utilizando el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Real time – quantitative PCR) (Thermo Scientific No.Cat.K1642) a partir de 1 µg de RNA purificado, para servir de templado en la reacción de amplificación de PCR tiempo real, utilizando la siguiente mezcla por reacción: 2.75 µL de agua libre de nucleasas, 0.5 µL del primer forward a 10 mM, 0.5 µL del primer



reverse a 10 mM, 6.25  $\mu$ L de Maxima SybrGreen qPCR Master Mix (Thermo Scientific No.Cat.K0253) y 2.5  $\mu$ L de cDNA diluido 2.5 veces obteniendo un volumen total de 12.5  $\mu$ L en tubos de 0.1 mL (Axygen No.Cat.PCR-0104). Los programas de amplificación por RT-PCR y las secuencias de los pares de oligonucleótidos con los tamaños de productos esperados de cada gen se muestran en las tablas 5 y 6 respectivamente. SybrGreen es un compuesto que se une al zurco menor de todas las moléculas de DNA de doble cadena emitiendo una señal fluorescente de una longitud de onda definida, señal que se mide en tiempo real en el termociclador Rotor-Gene Q de QIAGEN. El tamaño de cada producto del PCR se comprobó corriendo en geles de agarosa al 2% (Invitrogen No.Cat.16500500) los 12.5  $\mu$ L de la reacción de RT-PCR durante 1 hora y 30 minutos a 85 volts en buffer TAE 1x y tiñiendo el gel con bromuro de etidio (Invitrogen No.Cat.15585011). Se visualizaron los fragmentos de DNA bajo luz ultravioleta usando un fotodocumentador (QUANTUM ST5 Gel documentation imaging system).

		50 ciclos		
Gen	Hold	Desnaturalización	Pegado	Extensión
<i>GAPDH</i>	95°C 10 min	94°C 20 seg	59°C 20 seg	72°C 20 seg
<i>EBNA1</i>				
<i>LMP2A</i>				
<i>BZLF1</i>				
<i>BcLF1</i>				
<i>EBNA2</i>	95°C 10 min	94°C 20 seg	56°C 20 seg	72°C 20 seg
<i>LMP1</i>				
<i>BALF5</i>	95°C 10 min	94°C 20 seg	58°C 20 seg	72°C 20 seg

**Tabla 5. Programas de amplificación de RT-PCR.**

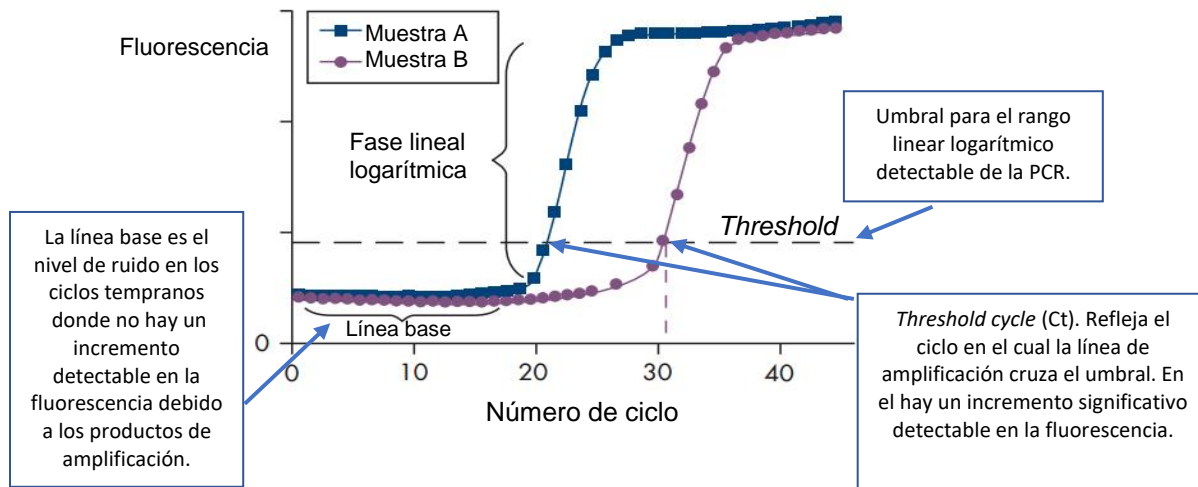
Gen	Primer	Secuencia (5'→3')	Producto de PCR (pb)	Referencia
<i>GAPDH</i>	Fw	CTTCACCACCATGGAGAAGGC	238	(Sun & Stetler, 2009)
	Rv	GGCATGGACTGTGGTCATGAG		
<i>EBNA1</i>	Fw	TACAGGACCTGGAAATGGCC	79	(Aguayo et al., 2011)
	Rv	TCTTTGAGGTCCACTGCCG		
<i>EBNA2</i>	Fw	AGGGATGCCTGGACACAAGA	97	(G. Kelly et al., 2005)
	Rv	TTGTGACAGAGGTGACAAAA		
<i>LMP1</i>	Fw	AATTTGCACGGACAGGCATT	134	(Repic et al., 2010)
	Rv	AAGGCCAAAAGCTGCCAGAT		
<i>LMP2A</i>	Fw	CGGGATGACTCATCTCAACACATA	153	(G. Kelly et al., 2006)
	Rv	GGCGCTGACAACGGTACTAACT		
<i>BZLF1</i>	Fw	AAATTTAAGAGATCCTCGTGTAACATC	92	(Yu, et al., 2012)
	Rv	CGCCTCCTGTTGAAGCAGAT		
<i>BcLF1</i>	Fw	TGAGTCCACGATCCTAGCCAT	232	Diseño propio
	Rv	CAGTACCTACACGACCGCCAA		
<i>BALF5</i>	Fw	CCCTGTTTATCCGATGGAATG	90	(Kimura et al., 1999)
	Rv	CGGAAGCCCTCTGGACTTC		

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de RT-PCR.

### 8.3 Análisis de los RT-PCR

Los datos se muestran como gráficos de amplificación en forma sigmoïdal (cuando se usa una escala logarítmica), en los que la fluorescencia se grafica contra el número de ciclos de la reacción de PCR. Cada nueva duplicación de los fragmentos se traduce en un incremento lineal logarítmico de la señal fluorescente (fase lineal). La unidad cuantitativa base para la PCR en tiempo real es el ciclo umbral o *threshold cycle* (Ct), que se define como el ciclo de PCR en el que la señal fluorescente del colorante reportero cruza un umbral arbitrario determinado (Fig. 16). Durante la fase exponencial de amplificación, el valor numérico del Ct está inversamente

relacionado con la cantidad de amplicón en la reacción (es decir, cuanto menor es la Ct, mayor es la cantidad de amplicón) (Schmittgen & Livak, 2008).



**Figura 16. Gráfica de amplificación típica de un RT-PCR** (Modificado de QIAGEN, 2006).

### 8.3.1 Normalización

Al presentar los datos de perfiles de expresión génica, se deben normalizar los datos a un control de referencia por lo que en este caso  $2^{-\Delta Ct}$  es la mejor forma de presentar los datos en lugar del valor de Ct sin procesar (Livak & Schmittgen, 2001).  $\Delta Ct$  describe la diferencia entre el valor Ct del gen de interés (gen diana) y el Ct del gen de referencia (en este caso, se utilizó *GAPDH*).

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen diana}) - Ct (\text{gen de referencia}).$$

La especificidad de la reacción de PCR se comprobó por las curvas de MELT o curvas de fusión, en donde la amplificación de un solo fragmento da como resultado un “pico único” en la curva de disociación en cada reacción del RT-PCR para todos los genes virales de interés y *GAPDH* en todas las líneas celulares (Ver figura suplementaria 1).

### 8.3.2 Expresión transcripcional de genes de EBV por el método de cuantificación relativa.

Para conocer los niveles de expresión de los genes de interés se empleó el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  que determina la relación entre la cantidad del gen problema (genes virales) y la cantidad de un gen de referencia (*GAPDH*). Este valor normalizado se usa para comparar la expresión génica diferencial entre las diferentes condiciones experimentales. Para que este cálculo sea confiable, las eficiencias del gen problema y el gen de referencia tienen que ser comparables. La pendiente de una curva estándar nos indica la eficiencia de la PCR en tiempo real. Una pendiente de -3.322 significa que la PCR tiene una eficiencia de 1 (100%) y esto quiere decir que la cantidad de producto se duplica durante cada ciclo de la reacción de PCR (Kralik & Ricchi, 2017).

Para hacer la comparación de eficiencias entre el gen problema y el gen de referencia se realizaron 4 diluciones seriadas 1:10 del cDNA de las líneas celulares de linfocitos B EBVpos. Luego, se prepararon las respectivas reacciones de RT-PCR de las diluciones seriadas de los genes problema (genes virales) y el gen de referencia (*GAPDH*). Se construyeron las curvas estándar a partir de sus Ct's (Ver figura suplementaria 2).

El cálculo de la eficiencia se realizó de la siguiente manera:

$$E = 10^{(-1/m)} - 1 \quad (m = \text{pendiente de la curva estándar})$$

Posteriormente se graficó el  $\Delta Ct$  y el Log de la concentración de cDNA utilizado, se hace una regresión lineal y si la pendiente  $<0.1$  significa que las eficiencias de amplificación son comparables. Todos los genes virales normalizados contra *GAPDH* reflejaron eficiencias comparables en los linfocitos B EBVpos (Ver figura suplementaria 2).

Método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Se obtiene el valor  $\Delta Ct$  para cada muestra calculando la diferencia entre el valor Ct del gen diana y el valor Ct del gen de referencia endógeno. Esto se determina para cada condición de interés y para la condición basal.

$\Delta Ct$  (condición estimulada o de interés) = Ct (gen diana) – Ct (gen de referencia)

$\Delta Ct$  (condición basal) = Ct (gen diana) – (Ct gen de referencia)

A continuación, se calcula el valor  $\Delta\Delta Ct$  para cada condición restando el valor  $\Delta Ct$  de la condición basal al valor  $\Delta Ct$  de la condición de interés. El  $\Delta\Delta Ct$  indica el cambio de una condición de interés con respecto a la condición basal.

$\Delta\Delta Ct$  =  $\Delta Ct$  (condición de interés) –  $\Delta Ct$  (condición basal)

Después de probar que las eficiencias de PCR del gen diana y del gen de referencia endógeno son comparables, el nivel normalizado de expresión del gen diana se calcula usando la fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Fold change / veces de cambio =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

La expresión relativa de la condición basal se establece en 1 porque  $\Delta\Delta Ct$  es igual a 0 y, por lo tanto,  $2^0$  es igual a 1.

#### **8.4 Inducción química de la reactivación de EBV en líneas celulares de linfocitos B EBVpos.**

Se probó el nivel de inducción química en las diferentes líneas de linfocitos B EBVpos que se caracterizaron. Partiendo de un cultivo de  $4 \times 10^6$  linfocitos a una densidad de  $6 \times 10^5$  células/mL se les agregó 40 ng/mL de PMA y 3 mM de NaB.

Después de 24 horas con el estímulo inductor se separaron las células del sobrenadante centrifugándolas a 1300 rpm durante 5 min. Se extrajo el RNA celular, se sintetizó cDNA y se analizó la expresión de *BZLF1* (gen lítico temprano) por el método de cuantificación relativa comparando con un cultivo normal sin estímulo durante el mismo tiempo.

## 8.5 Transfección del gen *cagA* en linfocitos B

Mediante el método de transfección asistida por magneto MATra (IBA MATra A-Reagent No.Cat. 7-2001), se transfectaron linfocitos B HS445 en cultivo. Usando esta técnica se transfectó DNA plasmídico (plásmidos con el gen *cagA*). En un primer paso el DNA se asocia con partículas magnéticas y mediante la aplicación de fuerza magnética el plásmido se dirige hacia los linfocitos y se internaliza mediante pinocitosis, lo que conduce a una transfección (Fig. 17). Ya que MATra, requiere que las células estén adheridas al fondo de la placa de cultivo y los linfocitos son células en suspensión, se utilizaron placas de 48 pozos cargadas con poli-D-lisina para mantenerlas inmóviles.



**Figura 17. Método de transfección asistida por magneto (MATra)** (BA Lifesciences, 2010).

Como control de transfección se usaron células MCF-7 (células epiteliales de adenocarcinoma de mama), las cuales se transfectan eficientemente con este método. 24 horas antes de la transfección, se siembran las células en las placas

con medio suplementado,  $9 \times 10^4$  linfocitos en placas con polilisina de 48 pozos y  $1.5 \times 10^5$  células MCF-7 en placas de 24 pozos.

Se prepararon los plásmidos y los demás reactivos como se menciona en la tabla 7. Las cantidades están consideradas por pozo a transfectar.

Células	Linfocitos B HS445	MCF-7
Placa	48 pozos + polilisina	24 pozos
Células	$9 \times 10^4$	$1.5 \times 10^5$
Medio suplementado	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L
Superficie de crecimiento	0.95 cm <sup>2</sup>	1.9 cm <sup>2</sup>
DNA de plásmido	0.400 $\mu$ g	0.6 $\mu$ g
Medio no suplementado	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Reactivo de MATra	0.8 $\mu$ L	1.2 $\mu$ L

**Tabla 7. Reactivos para la transfección con tecnología MATra.**

El paso de asociación del plásmido y las partículas magnéticas se preparó en medio sin suplementos y se dejó a temperatura ambiente durante 20 min para la formación del complejo. El cultivo de células sí tenía medio con suplementos. Posteriormente se agregó el complejo equivalente a cada pozo y se dejó incubar con la placa magnética asociada a la técnica de MATra (Universal Magnet Plate No. Cat. 7-2011-000) durante 15 min en una incubadora de células a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Después de 48 horas de la transfección se recolectó el sobrenadante por centrifugación a 1300 rpm por 5 min, luego el sobrenadante se centrifugó 1 vez más a 13500 rpm para eliminar restos celulares y se reservó para el análisis de copias virales.

### 8.5.1 Plásmidos

Se usaron dos plásmidos para transfectar en los linfocitos HS445 y en las células MCF-7: 1) el vector comercial pEGFP-C1 (GenBank ID: NM\_002710) y 2) la construcción pEGFP-C3-CagA1-1216 o GFP-CagA Full que contiene la secuencia completa del gen cagA (Bagnoli, Buti, Tompkins, Covacci & Amieva, 2005) (Fig. 18). Los plásmidos se purificaron de bacterias *E. coli* transformadas con los mismos

mediante el kit EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN No.Cat. 12362), para la obtención de plásmidos libres de lipopolisacárido (LPS), ya que se sabe que el LPS puede activar a los linfocitos B e inducir su proliferación y diferenciación (Xu, Zhang, Ciric, & Rostami, 2008).

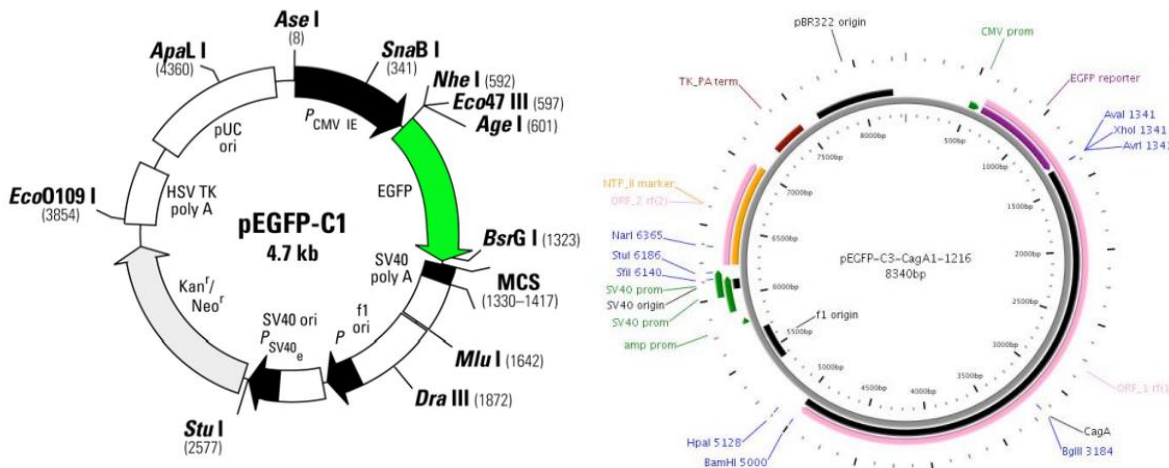


Figura 18. Plásmidos transfectados (Amieva et al., 2003; Lamond & Trinkle, 2001).

## 8.6 Cultivo de *Helicobacter pylori*

Se utilizaron 2 cepas de *H. pylori* una CagA positiva y una CagA negativa (CagApos y CagAneg). La primera es una cepa que contiene CagA de tipo occidental, es decir, con un motivo EPIYA ABCCC (ATCC, Manassas, VA, USA No.Cat. 43504). La segunda cepa se obtuvo de un aislado clínico del grupo de trabajo del Dr. Javier Torres y la Dra. Margarita Camorlinga del Hospital de Pediatría IMSS SXXI, identificada como 365A3, la cual tiene una CagPAI incompleta y carece del gen *cagA*. El cultivo de la bacteria *H. pylori* se hizo en cajas petri preparadas con Agar base sangre (BD, Bioscience No.Cat. 21037), esterilizado y suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 5%. *H. pylori* se sembró sobre las cajas con hisopos estériles y se incubaron a 37°C y 9% de CO<sub>2</sub> hasta obtener un crecimiento en forma de cespel. Para mantener a las bacterias vivas se realizaron pases a nuevas cajas petri con hisopos estériles cada 48 horas. Antes de comenzar cada experimento, se cultivaban cajas de agar sangre con 2x10<sup>7</sup> bacterias para que estas



se encontraran en fase logarítmica al momento de usarlas para el experimento de infección (22-24 horas después), el tiempo se determinó a partir de la elaboración de una cinética de crecimiento de las bacterias. Para cuantificar las bacterias se hizo lo siguiente: se recolectaron las bacterias que crecieron sobre el agar con un hisopo estéril y se re-suspendieron en 1 mL de PBS 1x en un tubo de 1.5 mL. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min, se retiró el PBS del botón de bacterias y se volvió a re-suspender la bacteria en 1 mL de PBS. A partir de esta suspensión se realizó una dilución 1:10 en PBS 1x en otro tubo con volumen final de 1 mL. Esta dilución se utilizó para cuantificar la bacteria mediante espectrofotometría a 550 nm. La relación de la absorbancia con la cantidad de bacteria es la siguiente:  $Abs_{550nm} = 1$  equivale a  $1 \times 10^8$  bacterias totales, multiplicado por el factor de dilución (10) =  $1 \times 10^9$  bacterias/ml en la suspensión original. A partir de este dato se calculó el volumen de la suspensión de bacterias que se requirió para infectar un determinado número de células dependiendo del MOI (Multiplicidad de infección), es decir, el número de bacterias por cada célula a infectar. Como un control negativo de interacción directa también se infectaron las células con bacterias CagAneg muertas y CagApos muertas (CagAneg-M y CagApos-M) las cuales se trataron previamente con gentamicina (80 mg/mL) por 2 horas. Además, para comprobar que las bacterias que se usaron eran CagAneg y CagApos, se infectaron células epiteliales gástricas AGS para monitorear el fenotipo colibrí ocasionado por la cepa CagApos.

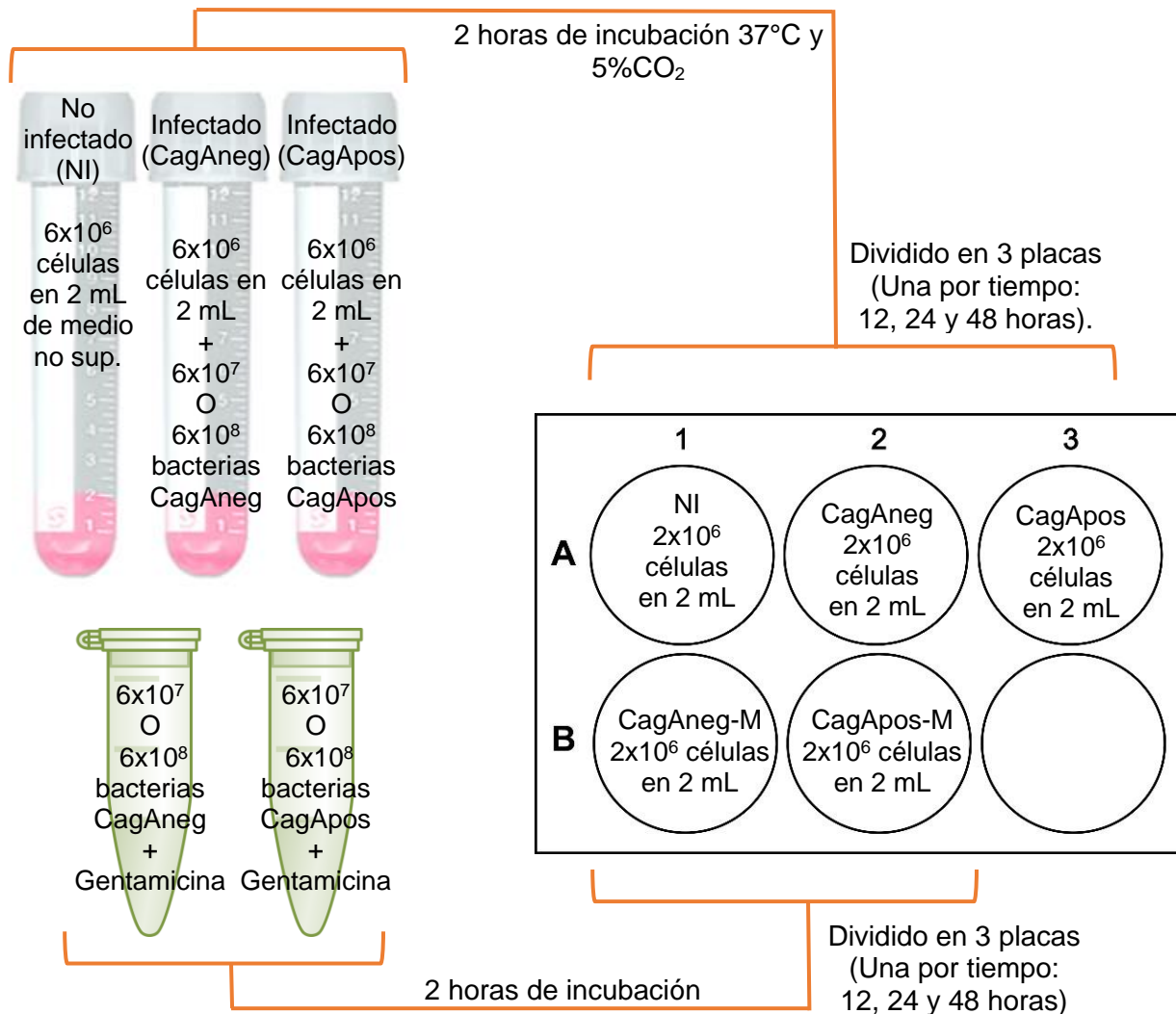
### **8.7 Infección directa de linfocitos B con *Helicobacter pylori***

Partiendo de un cultivo normal de  $3 \times 10^7$  linfocitos HS445 se lavaron con PBS 1x (Gibco) para quitarle los suplementos en los que crecieron antes del experimento, se re-suspendieron en medio RPMI sin suplementos, se separaron  $1.8 \times 10^7$  y se repartieron en 3 tubos de cultivo estériles, dejando  $6 \times 10^6$  células en cada uno con una densidad de  $3 \times 10^6$  células/mL de medio RPMI sin suplementos.

### Infección a MOI: 10 y 100

Se infectaron linfocitos B HS445 directamente con *Helicobacter pylori* a MOI 10 y 100 por cada condición (CagApos y CagAneg); cada una de las infecciones se monitoreó en 3 tiempos (12, 24 y 48 horas). Además, se infectaron el mismo número de células con su respectivo control de bacteria muerta (CagApos-M y CagAneg-M).

Una vez determinado el volumen de bacterias correspondiente al número necesario de MOI para infectar se agregó cada cepa (CagApos y CagAneg) en PBS 1x a los tubos que contenían  $6 \times 10^6$  linfocitos HS445 (Fig. 19). Estos tubos junto con la condición no infectada (NI) se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 2 horas. Cada condición de infección o no infección se dividió en 3 placas de seis pozos (cada condición ocupando un pozo por placa), una por cada tiempo de monitoreo (12, 24 y 48 horas) dejando  $2 \times 10^6$  células en cada pozo y se agregó medio RPMI sin suplementos para completar 2 mL totales por pozo. Para las condiciones con bacteria muerta se agregaron  $2 \times 10^6$  células por pozo y posteriormente se agregó el MOI correspondiente de bacteria tratada con gentamicina por 2 horas (Fig.19). Finalmente, todos los pozos se suplementaron con SFB a una concentración final de 2%.



**Figura 19. Método de infección directa de linfocitos HS445 con *H. pylori*.**

Se continuó el cultivo en las placas a 37°C y 5%CO<sub>2</sub> hasta los tiempos de cosecha (12, 24 y 48 horas). En cada tiempo se tomaron las células y el sobrenadante de las 5 condiciones de la placa correspondiente y se colocaron en tubos de 5 mL, se centrifugaron a 1300 rpm por 5 min y se separó el botón celular del sobrenadante con bacterias. Del botón celular se extrajo el RNA como se describió antes y se reservó a -70°C. El sobrenadante se centrifugó a 4000 rpm por 5 min para separar las bacterias, luego se centrifugó de nuevo a 10000 rpm por 5 min y una vez más a 13500 rpm durante 5 min para eliminar cualquier residuo celular.

Como control, se infectaron células AGS (células epiteliales de adenocarcinoma gástrico) para detectar el fenotipo colibrí en las células infectadas con CagApos y la ausencia de él en la infección con las demás condiciones. Por condición (CagApos, CagAneg, CagAneg-M y CagApos-M) se infectaron  $1.5 \times 10^5$  células, por lo tanto, se agregaron  $1.5 \times 10^6$  y  $1.5 \times 10^7$  de cada cepa de bacterias (MOI 10 y MOI 100 respectivamente). Se monitorearon a las 24 horas (Ver figura suplementaria 3)

## 8.8 Copias virales en sobrenadante

Para cada condición se extrajo el DNA de 200  $\mu$ L de sobrenadante con el kit Genomic DNA extraction de Favorgene, el DNA purificado se cuantificó en un Nanodrop 1000 de Thermo Scientific. Para cuantificar la cantidad de copias virales (cantidad de material genético viral) liberadas en el sobrenadante se empleó el método de cuantificación absoluta que utiliza una curva estándar de DNA. La curva estándar se generó utilizando un plásmido que contiene un fragmento del gen *BALF5* (que codifica para la DNA polimerasa de EBV) (Tsurumi, Daikoku, Kurachi & Nishiyama, 1993) . Se realizaron diluciones seriadas de este plásmido, para obtener 6 diferentes concentraciones del estándar ( $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ , 100 y 10 copias virales/2.5  $\mu$ L) (Ver figura suplementaria 4). Posteriormente se realizó el RT-qPCR utilizando la curva estándar de copias de *BALF5* y la mezcla de reacción antes mencionada por condición y por triplicado. El valor Ct de la muestra desconocida se interpola con los de la curva estándar para determinar la cantidad del *BALF5* por condición.

## 8.9 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se emplearon las pruebas de ANOVA y comparación múltiple de Tukey con el programa GraphPad Prisma 6, para los cálculos de promedio, desviación estándar y cuantificación relativa se usó Microsoft Excel 2013.

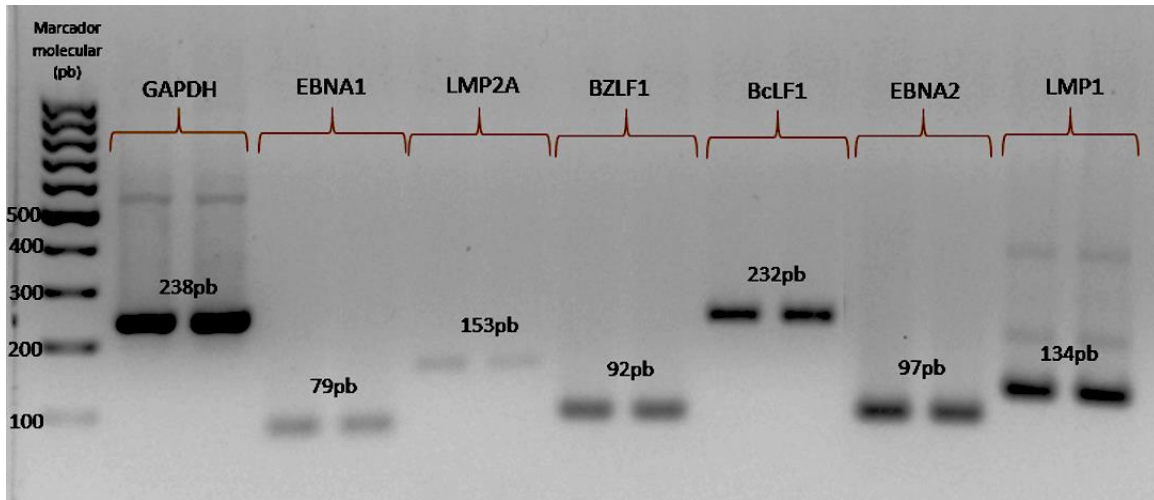
## 9 Resultados

### 9.1 Caracterización del patrón de expresión génica de 6 genes virales en 5 líneas de linfocitos B EBVpos.

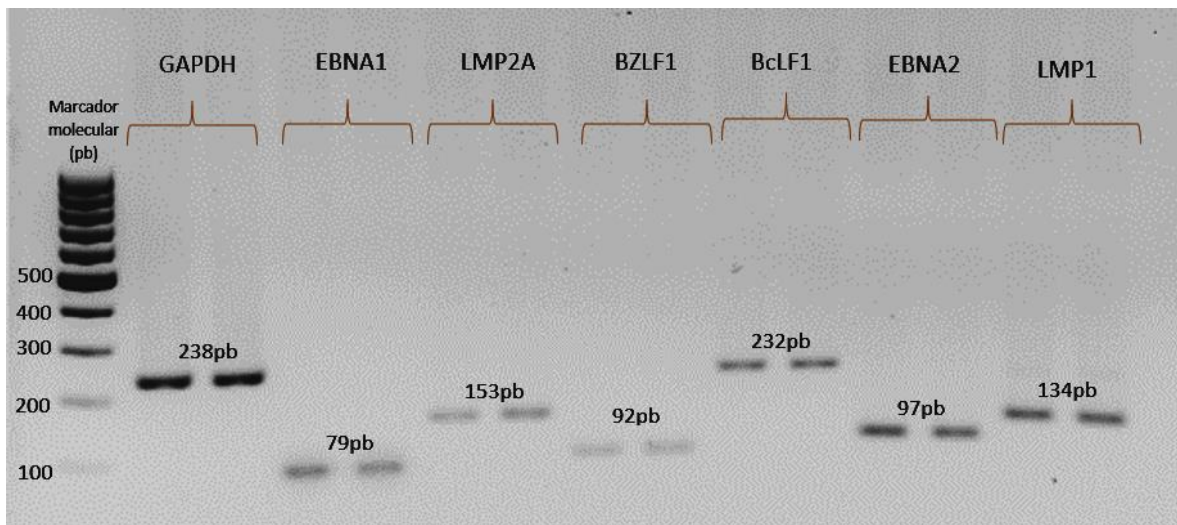
Para determinar si CagA podía reactivar a EBV o inducir un cambio de latencia en los linfocitos EBVpos, era necesario conocer los niveles de expresión basal de los genes de EBV en las líneas celulares de linfocitos B EBVpos. Para ello, se caracterizó la expresión de 6 genes virales mediante RT-PCR para distinguir los patrones de expresión de la latencia viral (Tabla 8). Una vez que se comprobó que el producto de amplificación de PCR tiempo real de cada uno de los genes daba un pico único en el MELT (Ver figura suplementaria 1), se corrieron en geles de agarosa para comprobar el tamaño de cada uno de los amplicones esperados de los genes de EBV Y *GAPDH* por línea celular (Fig. 20 a 24).

Estadio viral	Genes expresados
Latencia III	<i>EBNA1, EBNA2, LMP1, LMP2A</i>
Latencia II	<i>EBNA1, LMP1, LMP2A</i>
Latencia I	<i>EBNA1</i>
Latencia 0	Ninguno
Ciclo lítico	<i>BZLF1, BcLF1</i>

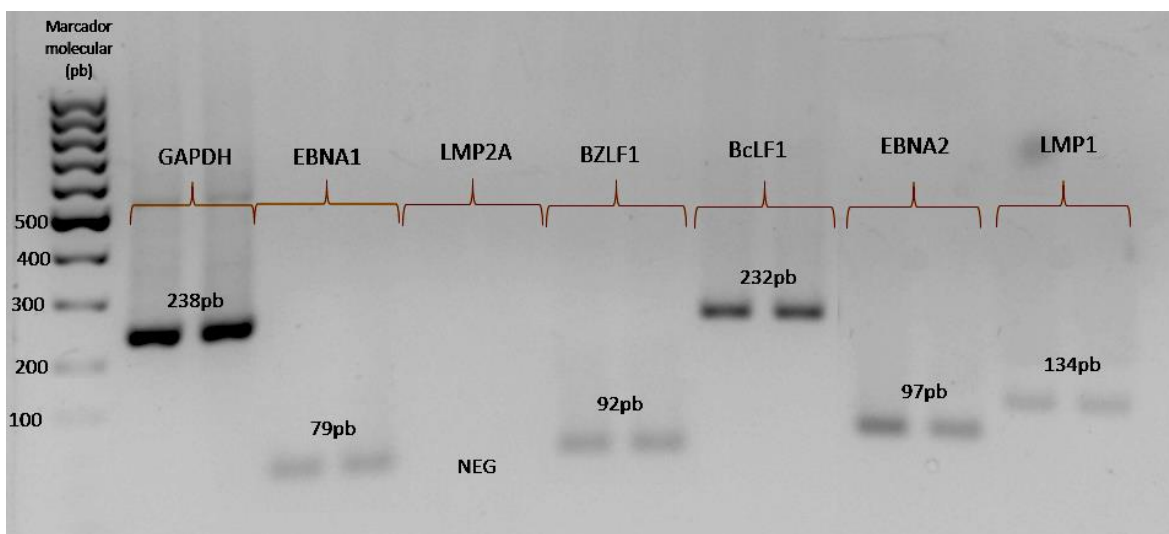
**Tabla 8. Genes de EBV y su asociación con cada estado de latencia viral.** (Brooks et.al., 1992; Gregory et.al., 1990; Herbst et.al., 1993; Rowe et al., 1987)



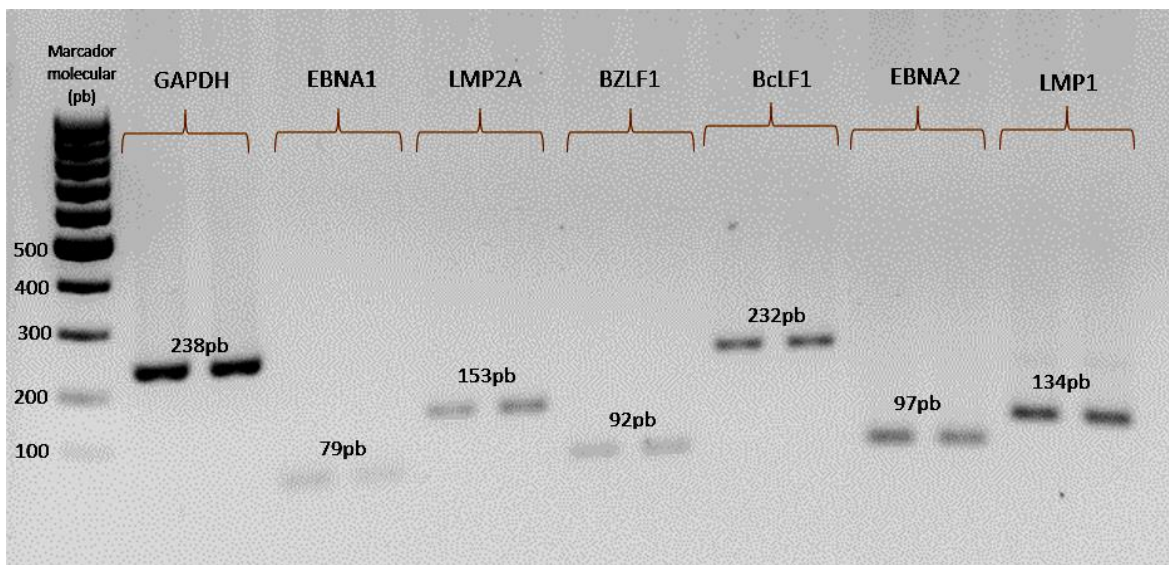
**Figura 20. Amplicones de 6 genes de EBV y GAPDH en Raji (Lat.III).** En esta línea celular se expresan todos los genes virales evaluados a nivel de mRNA. Los genes que no concuerdan con el patrón de expresión del virus en latencia III son los genes líticos virales (BZLF1 y BCLF1). Gel de agarosa al 2% donde se corrieron por duplicado los RT-PCR de cada gen.



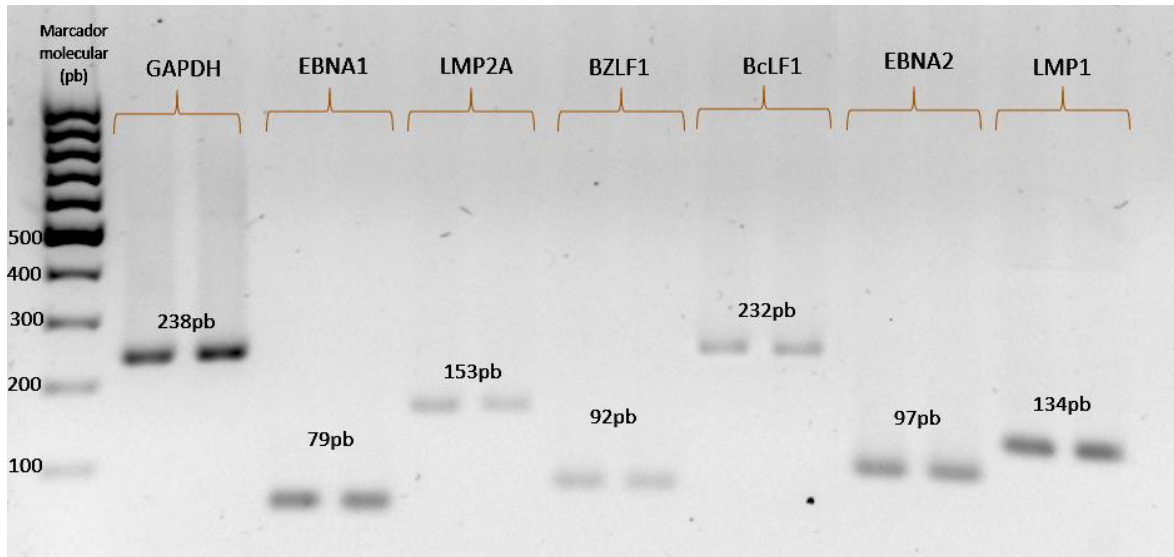
**Figura 21. Amplicones de 6 genes de EBV y GAPDH en LCL-HIM1 (Lat.III).** En esta línea celular se expresan todos los genes virales evaluados a nivel de mRNA. Los genes que no concuerdan con el patrón de expresión del virus en latencia III son los genes líticos virales (BZLF1 y BCLF1). Gel de agarosa al 2% donde se corrieron por duplicado los RT-PCR de cada gen.



**Figura 22. Amplicones de 6 genes de EBV y GAPDH en Namalwa (Lat.III).** En esta línea celular se expresan la mayoría de los genes virales evaluados a nivel de mRNA con excepción de LMP2A. Los genes que no concuerdan con el patrón de expresión del virus en latencia III son los genes líticos virales (BZLF1 y BCLF1). Gel de agarosa al 2% donde se corrieron por duplicado los RT-PCR de cada gen. NEG: negativo



**Figura 23. Amplicones de 6 genes de EBV y GAPDH en HS445 (Lat.II).** En esta línea celular se expresan todos los genes virales evaluados a nivel de mRNA. Los genes que no concuerdan con el patrón de expresión del virus en latencia II son: EBNA2 y los genes líticos virales (BZLF1 y BCLF1). Gel de agarosa al 2% donde se corrieron por duplicado los RT-PCR de cada gen.



**Figura 24. Amplicones de 6 genes de EBV y GAPDH en Akata (Lat.I).** En esta línea celular se expresan todos los genes virales evaluados a nivel de mRNA. Los genes que no concuerdan con el patrón de expresión del virus en latencia I son: EBNA2, LMP1, LMP2A y los genes líticos virales (BZLF1 y BCLF1). Gel de agarosa al 2% donde se corrieron por duplicado las amplificaciones por RT-PCR de cada gen.

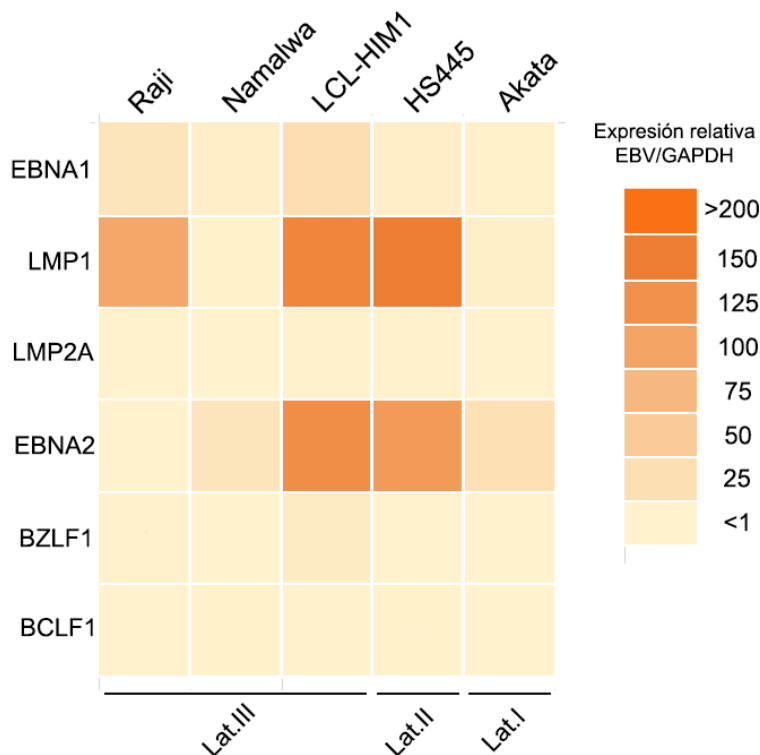
Posteriormente se calculó el nivel de expresión de estos genes con respecto al gen endógeno GAPDH por el método de cuantificación relativa mediante el cálculo de  $2^{-\Delta Ct}$  (Tabla 9). Como control negativo se analizaron los 6 genes virales en Ramos (línea celular EBVneg) sin encontrar amplificación de ninguno de ellos, pero sí de *GAPDH*. Como control negativo se analizaron los 6 genes virales en Ramos (línea celular EBVneg, datos no mostrados) sin encontrar amplificación de ninguno, pero sí de *GAPDH*.

Las 5 líneas celulares de linfocitos B EBVpos presentaron distintos niveles de expresión de los 6 genes virales evaluados, incluso entre aquellas que comparten latencia, por ejemplo, las líneas celulares latencia III: Raji, Namalwa y LCL-HIM1, de las cuales se esperaba que presentarían el mismo patrón y de nivel de expresión. Con lo anterior resultó imposible categorizar las líneas celulares por RT-PCR, ni asociarla con una latencia específica (Fig. 25).



Latencia	Latencia III			Latencia II	Latencia I
Línea celular	RAJI	NAMALWA	LCL-HIM1	HS445	AKATA
EBNA-1	13.79	4.33	21.09	4.2	2.85
LMP1	77.48	0.82	111.87	120.18	3.72
LMP2A	0.01	NEG	1.39	1.30	0.14
EBNA-2	0.46	13.85	104.14	89.41	18.92
BZLF1	1.31	0.24	7.32	0.62	0.35
BcLF1	0.33	1.78	1.50	1.02	0.74

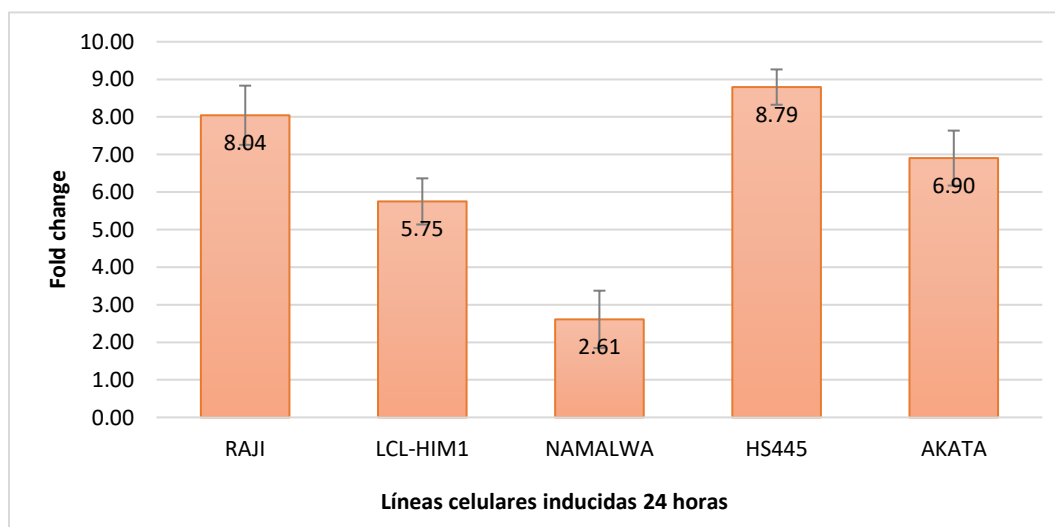
**Tabla 9. Nivel de expresión de 6 genes virales en 5 líneas celulares de linfocitos B.** Los niveles de expresión están normalizados a *GAPDH* ( $2^{-\Delta Ct} * 1000$ ). En rojo se muestran los niveles de expresión de los genes que son atípicos (de los que se esperaba una expresión diferente:  $> 1$  cuando NO se esperaba ver la expresión de ese gen o  $< 1$ , cuando SI se esperaba ver la expresión de ese gen) y del que no hubo expresión (NEG, negativo). Los datos representan la media de 3 experimentos independientes.



**Figura 25. Heatmaps de expresión de genes virales en líneas celulares de linfocitos B.** Patrón de expresión de genes virales encontrado en este trabajo de 5 líneas celulares de linfocitos B EBVpos (Raji, Namalwa, LCL-HIM1, HS445 y Akata) normalizados a *GAPDH* ( $2^{-\Delta Ct} * 1000$ ).

## 9.2 Inducción química de la reactivación de EBV en linfocitos B.

Para saber cuál de las líneas celulares de linfocitos B EBVpos podía reactivar mejor a EBV con un estímulo químico de PMA + NaB (que también representaría una vía de señalización posiblemente activada por CagA) se midió el nivel de expresión de un gen lítico temprano (*BZLF1*) en las 5 líneas celulares de linfocitos B EBVpos mediante RT-PCR, 24 horas después de la inducción química (Fig. 26).



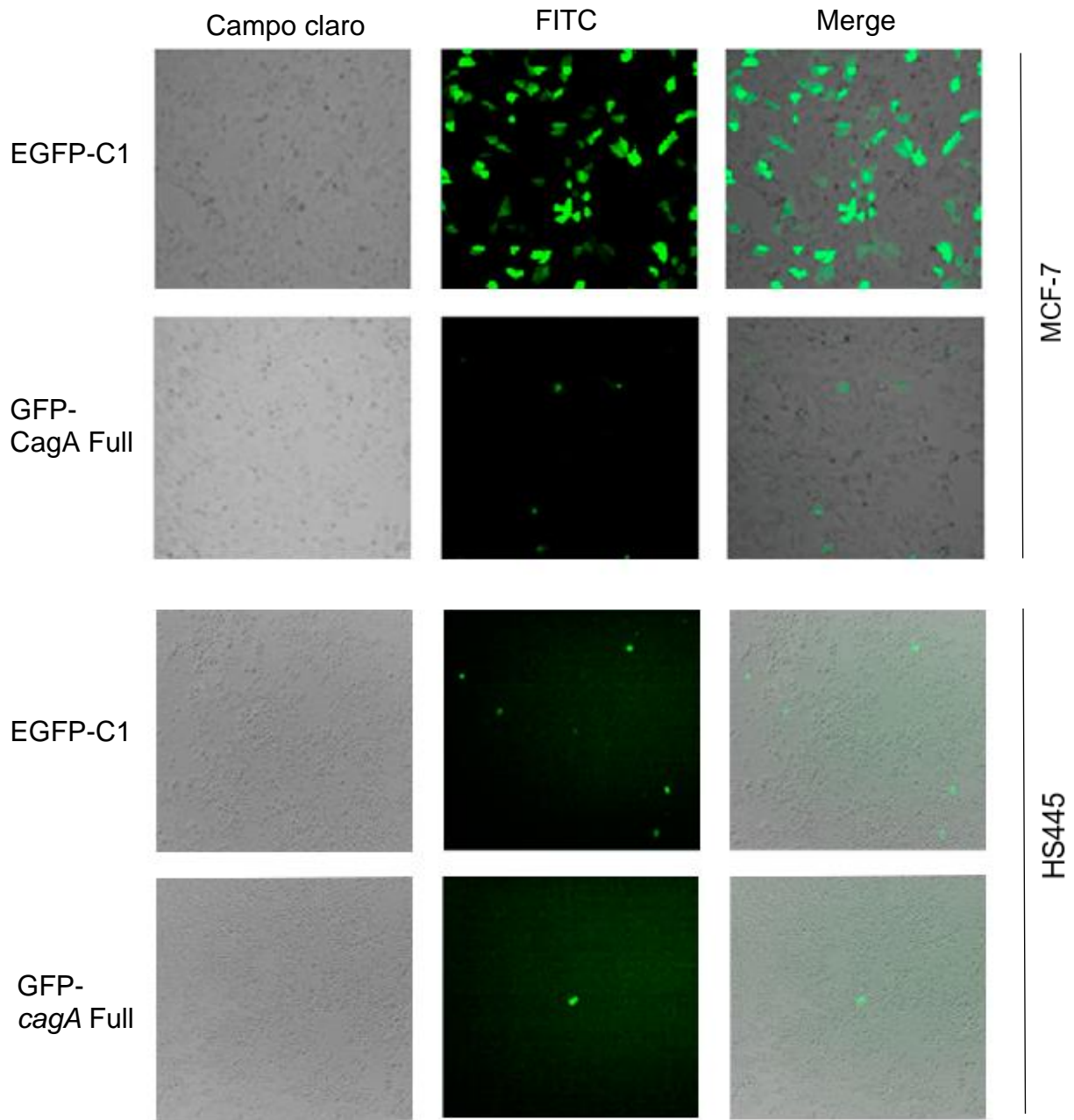
**Figura 26. Veces de expresión (Fold change) de *BZLF1* en líneas celulares de linfocitos B.** Niveles de expresión normalizados contra *GAPDH* y con respecto a su respectiva condición basal ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). 24 horas después de la inducción química PMA + NaB en diferentes líneas de linfocitos B EBVpos. El valor basal de expresión de *BZLF1* por línea celular es 1. Los datos representan la media  $\pm$  DE (Desviación estándar) de 3 experimentos independientes, cada uno por triplicado.

Todas las líneas celulares de linfocitos B EBVpos aumentaron la expresión basal de *BZLF1* lo que suponemos que se traduce en inicio del ciclo lítico como respuesta al estímulo químico. Cada línea celular respondió de manera diferente, esto puede deberse a que cada una de ellas presenta un número distinto de episomas de EBV; además, como se observó en la caracterización anterior, cada una tiene distintos patrones de expresión de los genes virales y el comienzo del ciclo lítico podría tener distinta cinética en cada línea.

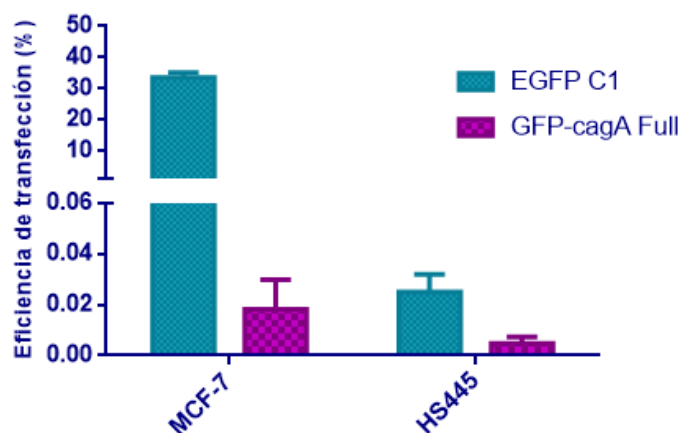
### 9.3 Transfección de *cagA* en linfocitos B HS445.

Para averiguar si EBV se reactiva en los linfocitos B por efecto de la oncoproteína CagA de *H. pylori*, se planeó transfectar los linfocitos B EBVpos mediante la tecnología de MATra con el plásmido GFP-*cagA* Full que contiene la secuencia completa del gen *cagA* y así obligar a interactuar a la proteína CagA con las vías de señalización del linfocito B y como control se utilizó EGFP-C1 un vector sin *cagA* pero con GFP (proteína verde fluorescente). Ya que los linfocitos HS445 presentaron el nivel más alto de expresión de *BZLF1* por inducción química, con 8.79 veces más que la expresión basal, se eligió esta línea de linfocitos para probar la transfección de *cagA* y así aumentar la probabilidad de detectar un cambio.

Primero se transfectaron células epiteliales MCF-7 con ambos plásmidos, ya que se conoce que son células de fácil transfección y, por lo tanto, funcionaron como control de transfección. Luego de 48 horas post-transfección se contabilizó el número de células positivas a GFP en un total de 800 células mediante microscopía de fluorescencia utilizando el filtro para FITC (Fig. 27). De esta forma se calculó el porcentaje de transfección por plásmido en cada línea celular. El plásmido vacío (EGFP-C1) se transfectó con mayor eficiencia en ambas líneas celulares (MCF-7 y HS445) respecto al plásmido que contiene *cagA* (GFP-*cagA* Full) 32% vs 0.01% respectivamente en las MCF-7 y 0.02% vs 0.0028% en los linfocitos HS445 (Fig. 28). Lo anterior también es prueba de que los linfocitos se transfectaron con muy baja eficiencia.

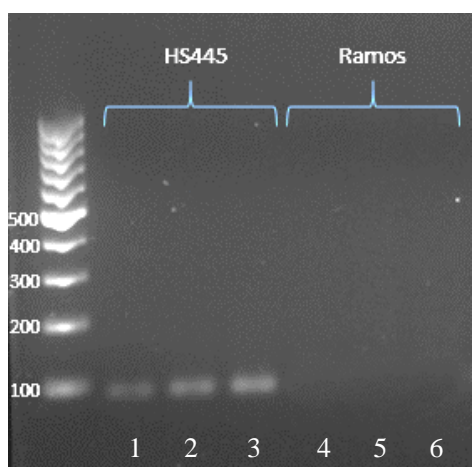


**Figura 27. Transfección de EGFP-C1 y GFP-cagA Full en células MCF-7 y linfocitos B HS445 con MATra.** 48 horas post-transfección se observó la fluorescencia de GFP en las células con que expresan correctamente el DNA plasmídico. Se puede observar que los linfocitos B HS445 no se transfectaron con eficiencia a comparación de las células epiteliales MCF-7. Además, también se aprecia la eficiencia de transfección respecto a los dos plásmidos, siendo GFP-cagA Full el de menor eficiencia incluso en las células MCF-7. Observadas con el filtro verde FITC a un aumento de 20x.



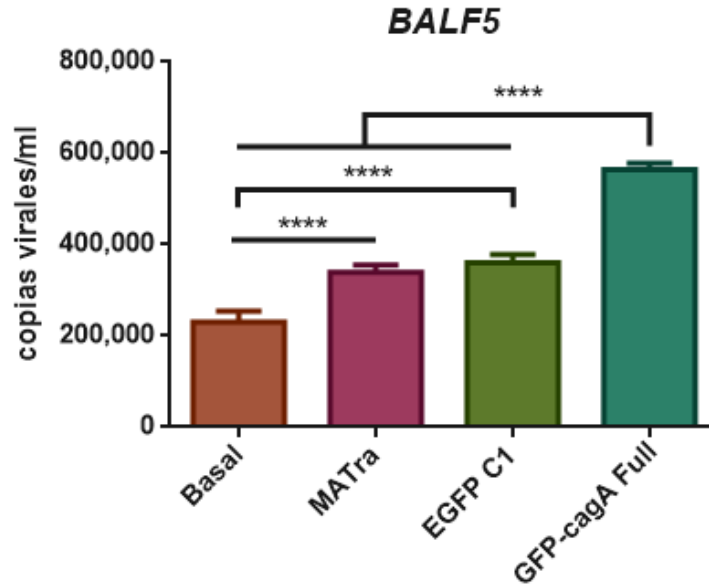
**Figura 28. Eficiencia de transfección por MATra en MCF-7 y linfocitos HS445.** Se grafica el porcentaje de células transfectadas por línea celular con los plásmidos EGFP-C1 y GFP-cagA Full. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes.

Después de la transfección, se extrajo el DNA del sobrenadante, a partir del cual se amplificó *BALF5* mediante RT-qPCR. Con esto se calcularon las copias virales por el método de cuantificación absoluta, que utiliza una curva estándar de DNA plasmídico, donde el número de copias de *BALF5* se traduce en la cantidad de copias virales liberadas en el sobrenadante. Para observar la expresión basal de *BALF5* en las HS445 EBVpos y comprobar que el producto amplificado es único (sin productos inespecíficos) se corrió en un gel de agarosa al 2% (Fig. 29).



**Figura 29. Gel de agarosa de *BALF5*.** Se corrió por triplicado la amplificación del producto de RT-PCR de *BALF5* de 90pb de un cultivo de linfocitos B en condiciones basales (no inducidas). HS445 (EBVpos, pozos 1 a 3) y como control negativo Ramos (EBVneg, pozos 4 a 6) en un gel de agarosa al 2%.

En la Fig. 30 se observan el número de copias de *BALF5* detectadas en el sobrenadante de la transfección de los linfocitos HS445 con MATra únicamente, EGFP-C1, GFP-*cagA* Full y en condición basal (sin plásmidos ni reactivos de transfección). Se detectaron en promedio 335,541 copias de *BALF5*/mL en el sobrenadante de la condición control de la transfección, es decir, la condición que no contenía plásmido a transfectar, cantidad que representa 1.45 veces las copias de *BALF5* generadas en promedio de manera basal en un cultivo de HS445 (230,642 copias virales/mL), lo que nos indica que la adherencia de los linfocitos B a la placa con polilisina y/o la interacción de las nanopartículas de MATra con los linfocitos HS445 es suficiente para reactivar a EBV. Las copias de *BALF5* en el sobrenadante de la transfección con el plásmido EGFP-C1 no representan una diferencia significativa respecto al control de transfección al presentar en promedio 368,594 y 335,541 copias virales/mL respectivamente. Finalmente, las copias de *BALF5* en el sobrenadante de la transfección con GFP-*cagA* Full (566,451 copias virales/mL) son significativamente mayores ( $p < 0.0001$ ), presentando 1.68 veces las copias virales generadas solo con MATra (335,541 copias virales/mL). Así mismo, las copias virales en la transfección con GFP-*cagA* Full son significativamente mayores ( $p < 0.0001$ ) representando 1.53 veces de copias virales respecto a la condición transfectada con el plásmido vacío (368,594 copias virales/mL), por lo tanto, a pesar de la baja eficiencia de transfección, si se logra apreciar una diferencia significativa en la liberación de copias virales en el sobrenadante por la transfección del plásmido que contiene *cagA*.

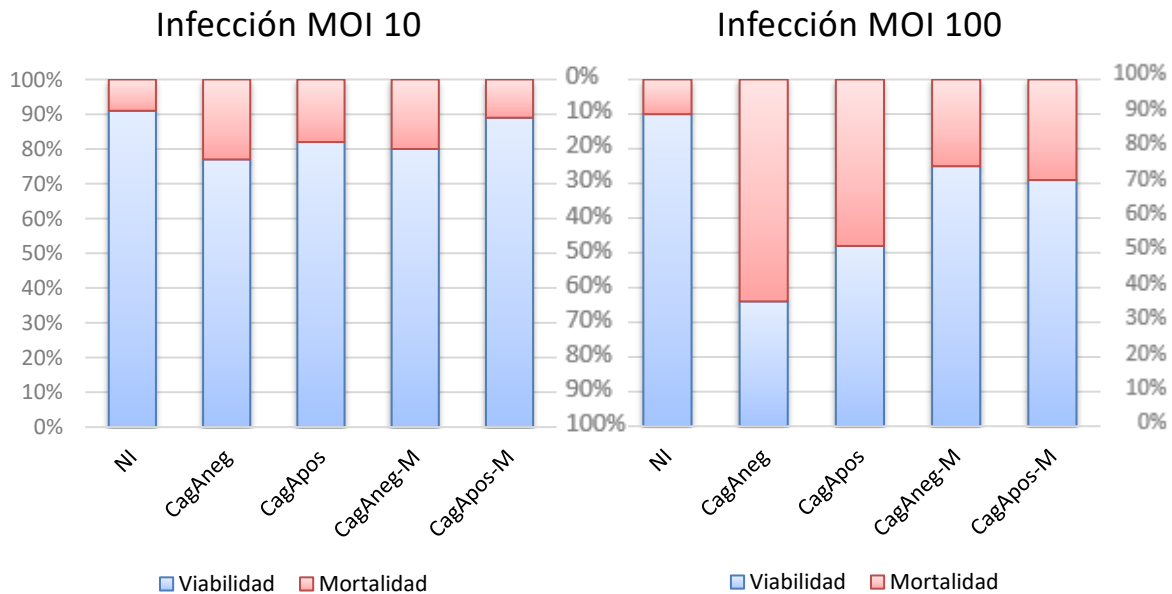


**Figura 30. Copias de EBV en sobrenadante de la transfección de linfocitos HS445 con MATra.** Se grafican las copias de *BALF5* en el sobrenadante (copias virales/mL) generadas 48 horas después: de un cultivo basal de los linfocitos HS445, de la interacción de HS445 con los reactivos de MATra y de la transfección de HS445 con 2 plásmidos (EGFP-C1 y GFP-*cagA* Full). Los datos representan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes, cada uno por triplicado, \*\*\*\* P <0.0001 por ANOVA de comparación múltiple.

#### 9.4 Infección directa de linfocitos B con *H. pylori*.

Para conocer si CagA de *H. pylori* induce la reactivación de EBV en linfocitos B, se realizó una infección directa de linfocitos HS445 y dos cepas de *H. pylori*: CagApos y CagAneg. Se establecieron cinco condiciones para el ensayo de infección de los linfocitos HS445: 1) CagAneg, 2) CagApos, 3) CagAneg-M, 4) CagApos-M, 5) control sin infección. Las infecciones con la bacteria viva (CagAneg y CagApos) nos indican sobre la interacción activa de CagA con la célula, mientras que las infecciones con la bacteria muerta nos podrían indicar sobre otras interacciones, por ejemplo, a partir de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés).

Se utilizaron dos MOI (10 y 100). La condición de MOI 100 se probó porque es la proporción más utilizada en los estudios de infección de células epiteliales con *H. pylori*, sin embargo, también causa un nivel de mortalidad de hasta 64% en los linfocitos B a las 48 horas post-infección (Fig-31), lo cual se consideró alto. Con MOI 10 se mejoró notablemente la viabilidad de los linfocitos a las 48 horas post-infección donde la mortalidad más alta fue de 23% en los linfocitos HS445 infectados con *H. pylori* CagAneg (Fig. 31).



**Figura 31. Porcentaje de viabilidad y mortalidad de linfocitos B HS445 infectados con *H. pylori*.** Se grafica con barras rojas el porcentaje de células HS445 que mueren y en barras azules el porcentaje de células que se mantienen vivas 48 horas post-infección en diferentes condiciones (CagAneg, CagApos, CagAneg-M, CagApos-M) y sin infección con dos diferentes MOI (10 y 100). Mortalidad y viabilidad cuantificadas mediante azul tripan.

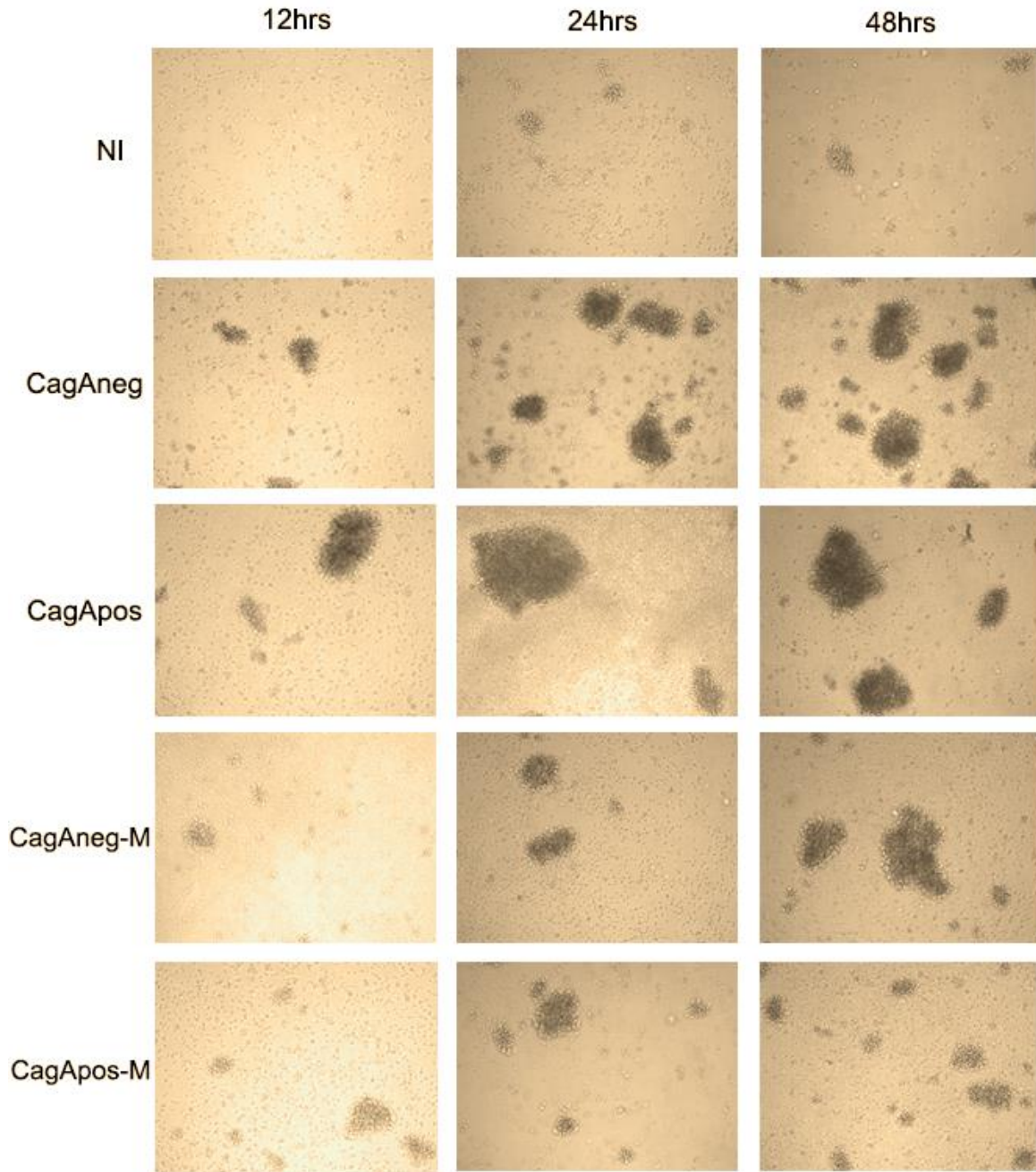
La infección de las células AGS con *H. pylori* se pudo reproducir de forma exitosa como control de infección, monitoreando el fenotipo colibrí, que es evidencia morfológica de la transducción, fosforilación y señalización de CagA en las células AGS (Ver figura suplementaria 3).



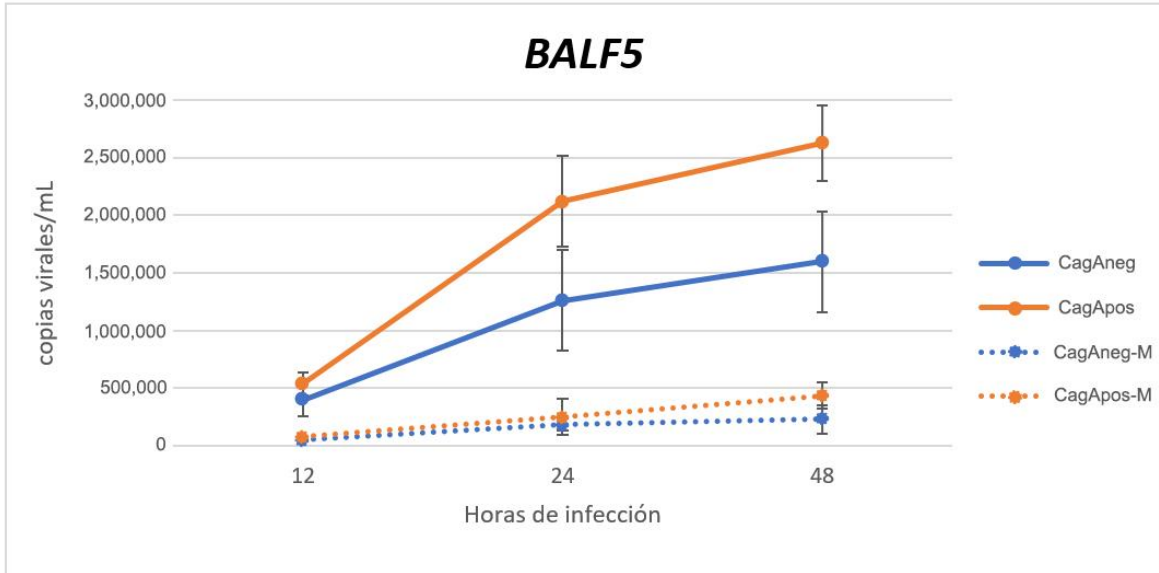
Se monitorearon 3 tiempos (12, 24 y 48 horas) en las infecciones de HS445 (EBVpos) con *H. pylori* para determinar una cinética de infección. Se esperaba observar tanto la generación de copias de *BALF5* en el sobrenadante de la infección (copias virales/mL), como el aumento en los niveles de expresión de dos genes *BZLF1* (iniciador del ciclo lítico) y *BcLF1* (gen tardío que codifica para VCA, una proteína de la cápside viral). Después de cada tiempo establecido de infección se extrajo el DNA del sobrenadante (para amplificar *BALF5*) y el RNA de los linfocitos B HS445, a partir del cual se sintetizó cDNA (para detectar cambios de expresión de *BZLF1* y *BcLF1*).

En la infección con MOI 100, tanto las condiciones con bacterias vivas como con bacterias muertas observadas al microscopio óptico se manifiestan de manera similar, formando cúmulos grandes de linfocitos desde las primeras horas de infección, a diferencia de los linfocitos que no están infectados con la bacteria (NI) que los forman en tiempos tardíos, posiblemente por el estrés generado por las condiciones del medio reducido en SFB (SFB al 2%) (Fig. 32).

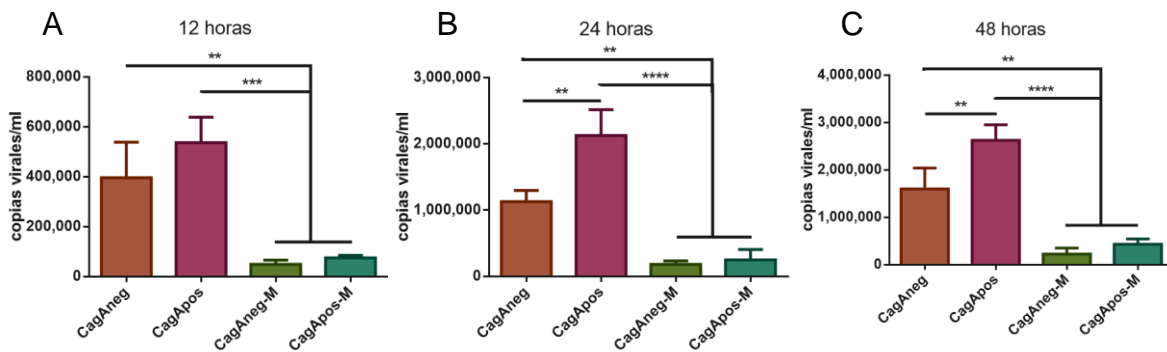
Se encontró que las condiciones CagAneg y CagApos generaron más copias virales/mL que sus respectivas condiciones con bacterias muertas (CagAneg-M y CagApos-M) en todos los tiempos y además este número de copias aumentó en función del tiempo (Fig. 33). La diferencia en el número de copias virales entre bacteria viva y muerta se observó desde las 12 horas post-infección, siendo significativamente mayor en las infecciones con las bacterias vivas ( $p > 0.001$ ) (Fig. 34A), mientras que las diferencias en las copias virales generadas entre las infecciones con bacteria CagAneg y CagApos se observan significativamente diferentes a partir de las 24 horas post-infección, en donde la condición con CagApos presenta 1.88 veces el número de copias virales generadas en la infección con CagAneg ( $p > 0.01$ ) (Fig. 34B). La condición CagApos generó los niveles más altos de copias virales tanto a las 24 horas como a las 48 horas post-infección con 2,125,330 y 2,625,142 copias virales/mL respectivamente (Fig. 34B y C).



**Figura 32. Infección de linfocitos B con *H. pylori* MOI 100.** Se muestran las fotografías de los linfocitos B HS445 EBVpos con las diferentes condiciones de infección (CagAneg, CagApos, CagAneg-M, CagApos-M) y no infectado monitoreadas cada una a las 12, 24 y 48 horas post-infección, en donde podemos indentificar la formación de cúmulos celulares (Los más grandes con la condición CagApos), como se observaron al reactivar químicamente a EBV en los linfocitos B (datos no mostrados). Observadas con microscopio óptico a un aumento de 10x.

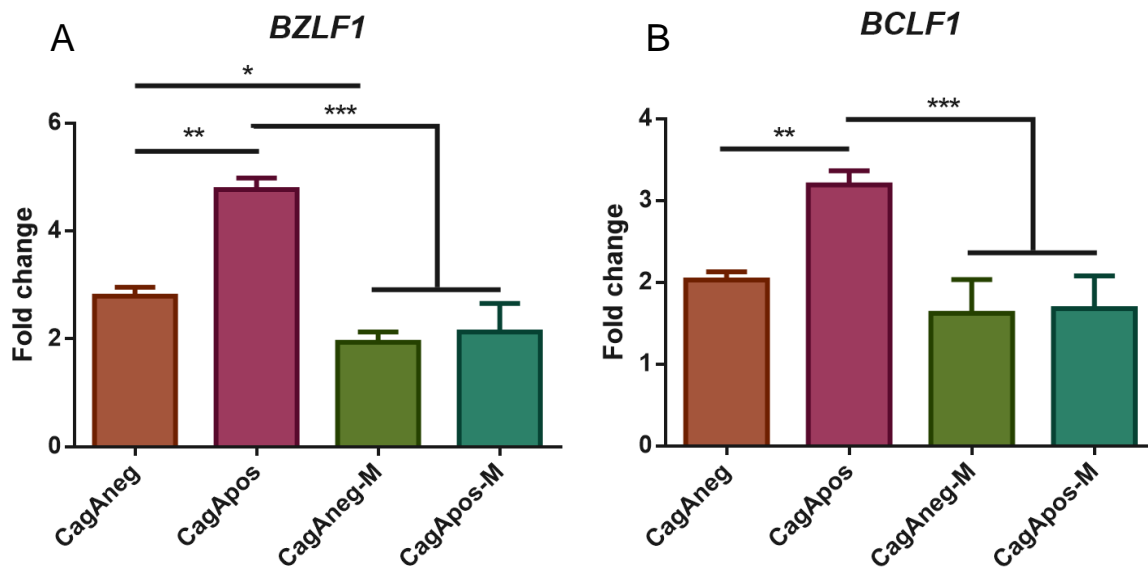


**Figura 33. Copias de EBV en la cinética de infección de linfocitos HS445 con *H. pylori* con MOI 100.** Cuantificación absoluta de copias del gen BALF5 en el sobrenadante de la infección de linfocitos B HS445 con dos cepas de *H. pylori* (CagAneg y CagApos) y con sus respectivas muertas (CagAneg-M y CagApos-M) cada una a un MOI de 100 durante una cinética de 3 tiempos (12, 24 y 48 horas). Los datos representan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes.



**Figura 34. Copias de EBV en el sobrenadante de la infección de linfocitos HS445 con *H. pylori* a MOI 100.** Copias virales generadas a las A) 12, B) 24 y C) 48 horas post-infección en 4 condiciones (CagAneg, CagApos, CagAneg-M y CagApos-M). Los datos representan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes, cada uno por triplicado; \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 y \*\*\*\* P < 0.0001 por ANOVA de comparación múltiple.

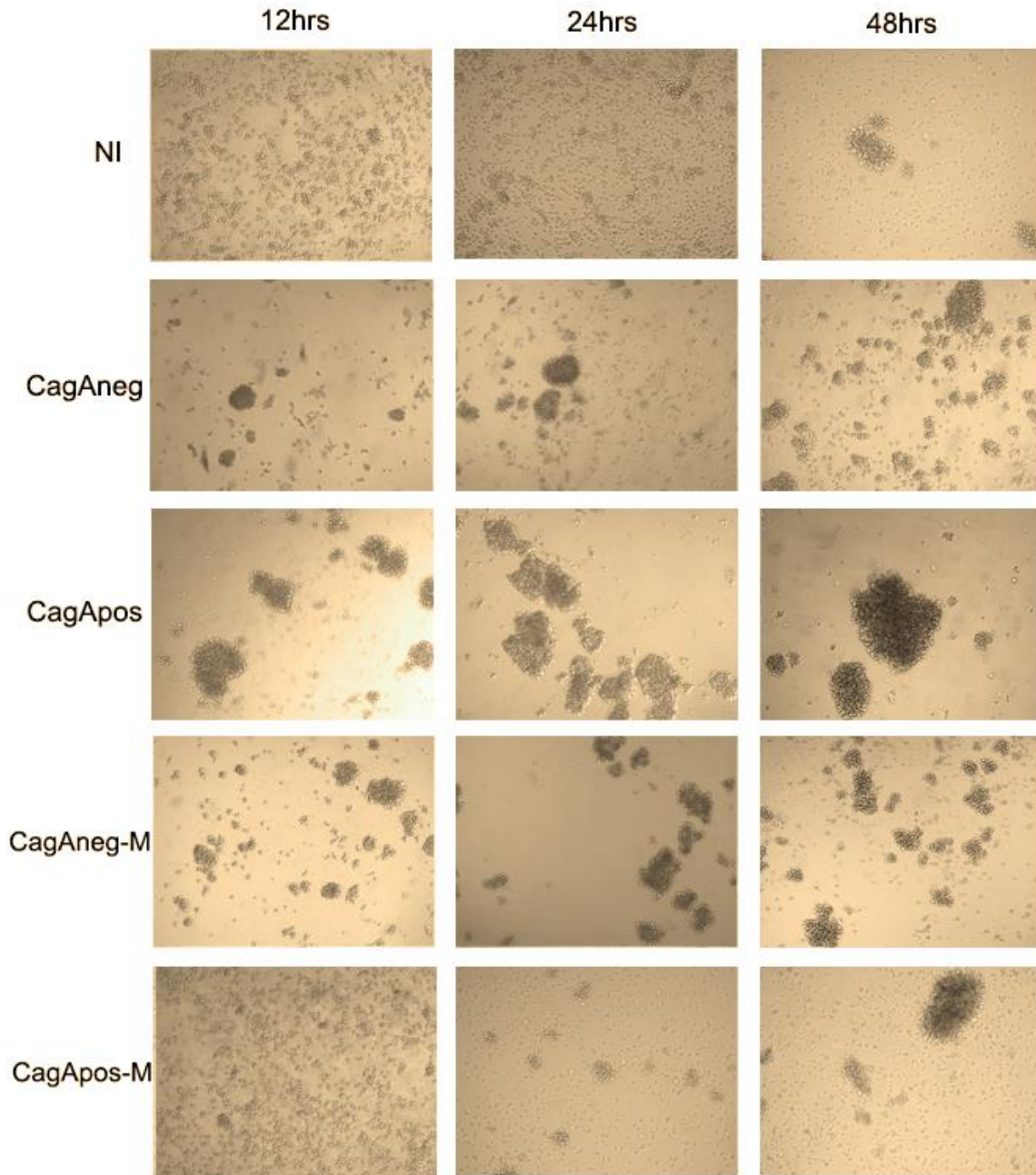
Se seleccionaron las 24 horas de infección como el tiempo crítico en el que podría haberse inducido el ciclo lítico en los linfocitos B HS445 EBVpos y en este tiempo se encontró un aumento en la expresión del gen orquestador de ciclo lítico *BZLF1* de 2.79 veces con CagAneg, 4.77 veces con CagApos, ambos significativamente diferentes ( $p < 0.01$ ), 1.94 veces con CagAneg-M y 2.13 veces con CagApos-M (Fig. 35A). Todos estos niveles de expresión se calculan respecto a la condición no infectada. El gen tardío *BcLF1* presentó también aumento en su expresión a las 24 horas post-infección en todas las condiciones siendo de 2.03 veces con CagAneg, 3.19 veces con CagApos, también significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.01$ ), 1.62 veces con CagAneg-M y 1.68 veces con CagApos-M (Fig. 35B).



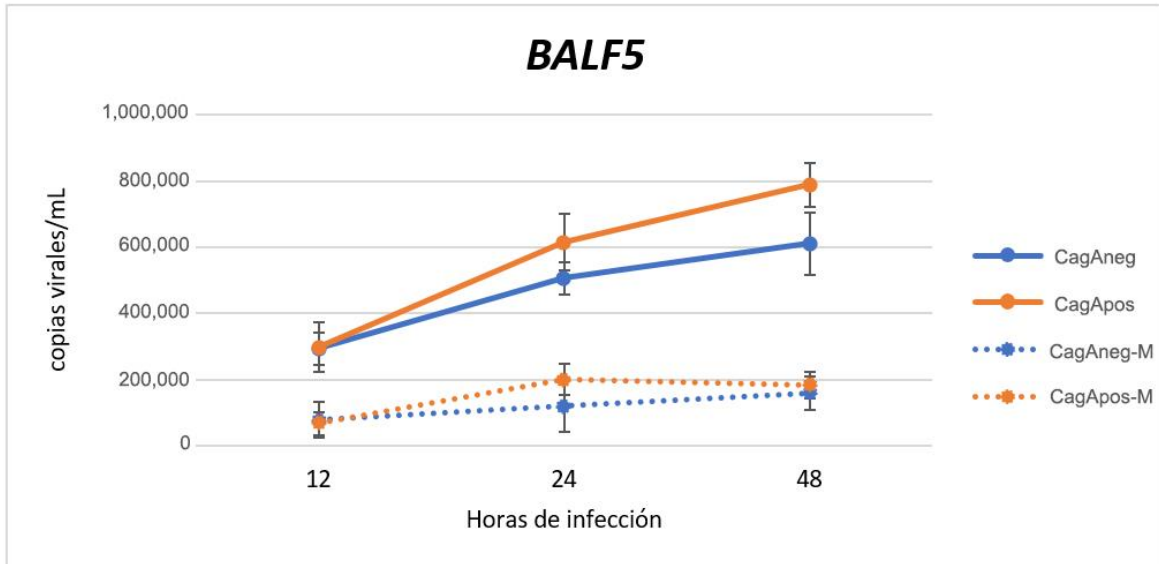
**Figura 35. Veces de expresión (Fold change) de BZLF1 y BcLF1 de EBV en los linfocitos HS445 infectados con *H. pylori* a MOI 100.** Niveles de expresión de A) *BZLF1* y B) *BCLF1* normalizados con *GAPDH* y a su respectiva condición sin infección ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) después de 24 horas de infección de linfocitos HS445 con *H. pylori* (CagAneg, CagApos, CagAneg-M y CagApos-M). Los datos representan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes, cada uno por triplicado; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  por ANOVA de comparación múltiple.

En la infección con MOI 10, en las imágenes observadas al microscopio óptico, tanto en las condiciones con bacteria viva y con bacteria muerta se formaron cúmulos de linfocitos desde las primeras horas de infección, siendo particularmente más grandes los generados con la condición con CagApos y más abundantes en las infecciones con la bacteria viva respecto a las infecciones con la bacteria muerta (Fig. 36).

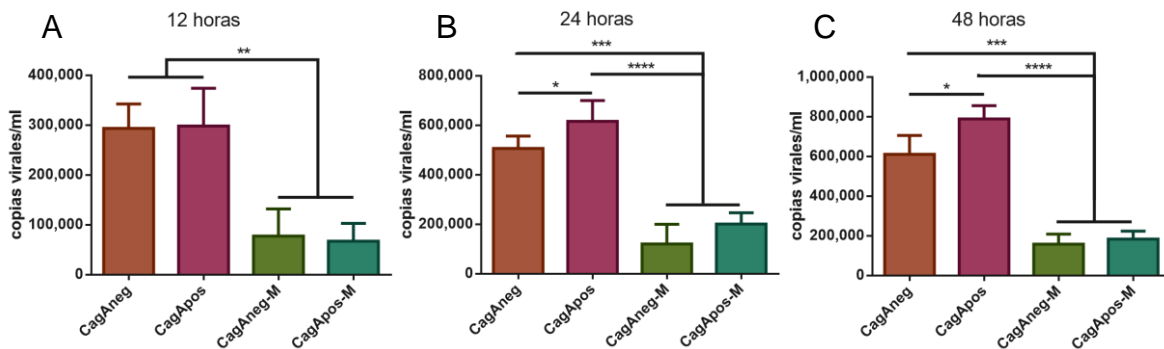
Respecto a las copias virales en el sobrenadante, un resultado muy similar al MOI 100 se observó con un MOI 10, con la diferencia de que el número de copias virales en sobrenadante fue menor en proporción con respecto a MOI 100 (Fig. 37). La diferencia en el número de copias virales entre bacteria viva y muerta se observó desde las 12 horas post-infección, siendo significativamente mayor el número de copias virales generado por las infecciones con las bacterias vivas ( $p > 0.001$ ) (Fig. 38A). Las diferencias en las copias virales generadas entre las infecciones con bacteria CagAneg y CagApos se observan significativamente diferentes a partir de las 24 horas post-infección en donde la condición CagApos presenta 1.24 veces las copias virales generadas con CagApos ( $p > 0.05$ ) (Fig. 38B). En este caso, la condición CagApos también generó los niveles más altos de copias virales y significativamente diferentes a las demás condiciones tanto a las 24 horas como a las 48 horas post-infección con 615,335 y 788,404 copias virales/mL respectivamente (Fig. 38B y C), lo que representa 3.4 y 3.3 veces menos a lo obtenido con MOI 100.



**Figura 36. Infección de linfocitos B con *H. pylori* MOI 10.** Se muestran las fotografías de los linfocitos B HS445 EBVpos con las diferentes condiciones de infección (CagAneg, CagApos, CagAneg-M, CagApos-M) y no infectado monitoreadas cada una a las 12, 24 y 48 horas post-infección, en donde podemos indentificar la formación de cúmulos celulares (Los más grandes con la condición CagApos). Observadas con microscopio óptico a un aumento de 10x.

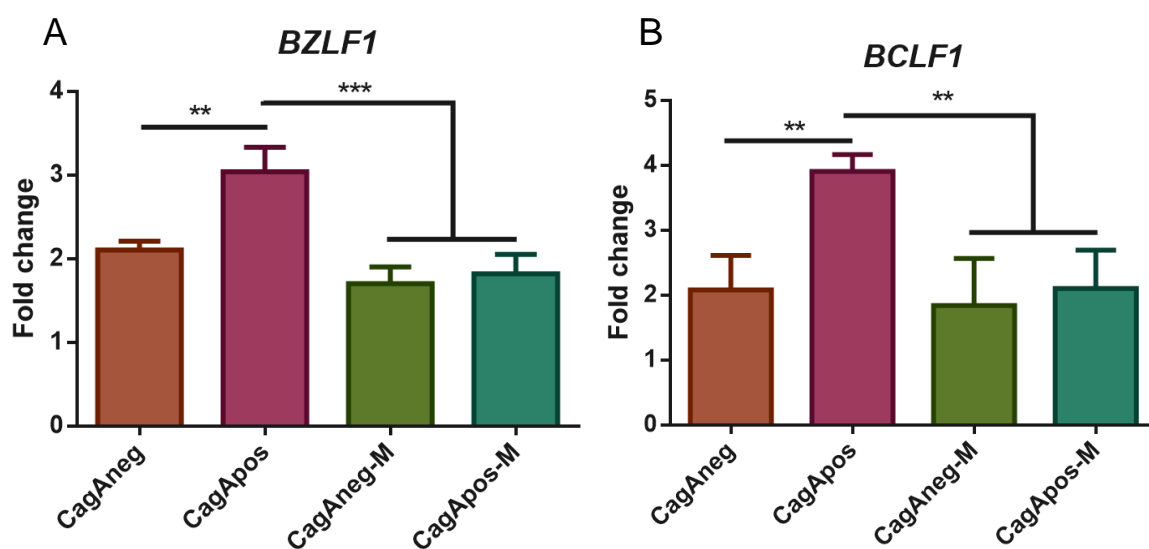


**Figura 37. Cinética de copias virales en sobrenadante de infección de linfocitos HS445 con *H. pylori* a MOI 10.** Cuantificación absoluta de copias del gen BALF5 en el sobrenadante de la infección de linfocitos B HS445 con dos cepas de *H. pylori* (CagAneg y CagApos) y con sus respectivas muertas (CagAneg-M y CagApos-M), cada una a un MOI de 10 durante una cinética de 3 tiempos (12, 24 y 48 horas). Los datos representan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes, cada uno por triplicado.



**Figura 38. Copias de BALF5 en el sobrenadante de la infección de linfocitos HS445 con *H. pylori* a MOI 10.** Copias virales generadas a las A) 12, B) 24 y C) 48 horas post-infección en 4 condiciones (CagAneg, CagApos, CagAneg-M y CagApos-M). Los datos representan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes, cada uno por triplicado; \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 y \*\*\*\* P < 0.0001 por ANOVA de comparación múltiple.

Finalmente, a las 24 horas post-infección se cuatificaron los cambios de expresión de los dos genes líticos (*BZLF1* y *BcLF1*) y en la infección a MOI 10 se encontró un aumento en la expresión de *BZLF1* de 2.11 veces con CagAneg, 3.04 veces con CagApos, entre estas condiciones se presentó una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ), y en las condiciones con bacteria muerta la expresión de *BZLF1* fue de 1.70 veces con CagAneg-M y 1.82 veces con CagApos-M (Fig. 39A). El gen *BcLF1* también presentó un aumento en su expresión a las 24 horas post-infección en todas las condiciones siendo de 2.08 veces con CagAneg, 3.91 veces con CagApos, también significativamente distintas entre sí ( $p < 0.01$ ), 1.84 veces con CagAneg-M y 2.10 veces con CagApos-M (Fig. 39B). Los niveles de expresión están calculados respecto a la condición no infectada.



**Figura 39. Veces de expresión (Fold change) de BZLF1 y BcLF1 de EBV en los linfocitos HS445 infectados con *H. pylori* a MOI 10.** Niveles de expresión de A) *BZLF1* y B) *BCLF1* normalizados con *GAPDH* y a su respectiva condición sin infección ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) después de 24 horas de infección de linfocitos HS445 con *H. pylori* (CagAneg, CagApos, CagAneg-M y CagApos-M). Los datos representan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes, cada uno por triplicado; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.001$  por ANOVA de comparación múltiple.



## 10 Discusión

Se ha observado que el riesgo de padecer CG aumenta con la coinfección por *H. pylori* y EBV (Cárdenas et al., 2015; 2017), por ello es necesario investigar cómo es que estos patógenos cooperan en el desarrollo de CG, desde lesiones gástricas tempranas que son precursoras de cáncer (Cardenas et al., 2013). En el presente trabajo, nos preguntamos si *H. pylori* y su oncoproteína CagA pudieran reactivar a EBV en linfocitos B y así generar nuevas copias virales y esto explique la infección del epitelio gástrico por EBV.

La reactivación puede ocurrir en cualquier parte u órgano del hospedero donde viajan las células de memoria infectadas por el virus y así, EBV se puede propagar, generalmente, a través del contacto de célula a célula (Shannon et al., 2009). La bacteria *H. pylori* neutraliza los ácidos estomacales pero causa úlceras gástricas cuando penetra en el revestimiento mucoso gástrico (Berger, 2000). Y aunque pocas bacterias se encuentran en el espacio intercelular más profundo (Bauer & Meyer, 2011), estas bacterias en una asociación más íntima con el tejido epitelial podrían dar lugar a una comunicación directa de EBV con *H. pylori* en la que puede haber una interacción directa entre ambos patógenos, desencadenando respuestas involucradas en el cambio de la latencia viral o en la inducción del ciclo lítico. EBV tiene un ciclo de vida bifásico, latente (un estado silente) y lítico (fase productiva o productora de viriones infectivos). Durante los diferentes estados de latencia, se expresa un número limitado de genes virales que mantienen el episoma viral dentro de la célula hospedera (Haan, Aiyar & Longnecker, 2001). Las definiciones de latencia no son absolutas, pero representan puntos en un espectro de expresión de los genes de EBV que puede aparecer en diferentes momentos o en diferentes sitios anatómicos durante la infección de EBV *in vivo* (Thorley, Hawkins, Tracy & Shapiro, 2013). Sin embargo, existen otros estudios en los que detectan patrones de expresión inusuales, como en el trabajo de Tierney, Shannon, Fitzsimmons, Bell & Rowe en 2015, quienes encuentran muy poca expresión de mRNA de EBNA1 y también de genes líticos en sus líneas celulares, incluidas Namalwa, Akata y LCL's.

En el estudio de Greijer et al., 2017 también registran expresión de mRNA de *BZLF1* y *BcLF1* en Akata, Raji y LCL´s y niveles inesperadamente bajos de EBNA1 el cual atribuyen a la alta estabilidad de la proteína EBNA1 de hasta 48 horas (Davenport & Pagano, 1999). En nuestros resultados no se observó la expresión de *LMP2A* en la línea celular Namalwa, algo que no se esperaba, sin embargo esto concuerda con el análisis de Satoh, Fukuda & Sairenji en 2002 quienes tampoco encuentran mRNA de *LMP2A* en Namalwa y hacen hincapié en que la expresión de los genes virales que miden en esta línea celular no se ajusta a la clasificación típica de las latencias virales. Lo anterior es prueba de que las latencias virales no son absolutas y además es importante destacar que los diferentes programas de expresión latente se encontraron en las enfermedades malignas linfoproliferativas y epiteliales (Price & Luftig, 2015) y las líneas celulares, al ser un cultivo de células transformadas inmortalizadas y, después de varios pases celulares, su comportamiento genético podría no ajustarse al encontrado en la mayoría de los tumores de linfocitos B EBVpos o a los patrones de expresión en células B *in vivo* después de la infección natural por EBV. Se sabe además, que la reactivación ocasional y la regulación de la latencia se desencadena por estímulos ambientales, pero también está estrechamente controlada por el sistema inmune (Kang & Kieff, 2015). El ambiente *in vitro* en el que crecen las líneas celulares no tienen este control inmunológico que las haría regular sus genes de una manera particular, por lo que podría ser otra explicación a los patrones heterogéneos de expresión encontrados. Recientemente en el estudio de Ungerleider et al., 2018 destacan la importancia de los RNAs circulares (cirRNAs) que produce EBV y que dependen de su estado de latencia y reactivación, encontrando que se producen cirRNAs a partir de loci de latencia como los de las EBNA y LMPs y sabiendo que un subconjunto de circRNAs se puede traducir para formar derivados de péptidos más pequeños de los genes parentales (Pamudurti et al., 2017), sería posible que los primers utilizados en este estudio pudieran hibridar parcial o totalmente con estas secuencias de RNA que no son de nuestro interés. Al no poder determinar el patrón de latencia expresado en las líneas celulares de linfocitos B EBVpos con las que trabajamos, no sería posible detectar

un “cambio de latencia” ya que no se cuenta con un patrón basal referente bien delimitado. Es importante considerar que esto aplica a este análisis transcripcional, por lo que un complemento a la información que tenemos sería la expresión proteica de los genes de EBV. Por los resultados anteriores nos concentramos en probar si podía haber inducción del ciclo lítico viral por transfección de CagA y/o por interacción directa de los linfocitos B EBVpos con diferentes cepas de *H. pylori*.

Se probó entonces la inducción química con PMA + NaB de las 5 líneas celulares de linfocitos B EBVpos. En el estudio de Churin et al., 2003 encontraron *in vitro* que la reactivación de EBV se produce por la vía de señalización de PLC $\gamma$ , además, PKC es una cinasa que se activa directamente por ésteres de forbol como PMA, por lo tanto, está involucrada en la reactivación de EBV (Newton, 1997) y CagA también es un conocido activador de PKC (Brandt et al., 2009) por lo que es posible que la señalización de CagA pueda funcionar como desencadenante del ciclo lítico de EBV. La inducción química con PMA + NaB nos guiaría a saber cómo reaccionaría EBVpos ante una señalización de CagA dentro de los linfocitos.

Se indujo la reactivación de EBV en líneas celulares de linfocitos EBVpos en diferentes niveles por la estimulación química por PMA + NaB, lo que podría deberse a que cada línea está infectada con un número diferente de episomas virales de EBV; por ejemplo, se conoce que cada célula de Namalwa está infectada con dos copias de EBV (Henderson, Ripley, Heller & Kieff, 1983), mientras otras como Akata tiene 20 copias virales por célula (Daibata & Sairenji, 1993) y Raji 55 copias por célula (Adams, Lindahl & Klein, 1973), entonces, la reactivación de dos episomas virales en una célula produciría menos copias virales que las generadas por 55 episomas. No se conoce profundamente cómo se induce el ciclo lítico a partir de las diferentes latencias pero se sabe que la activación de Zta es un factor determinante para reducir la expresión de los promotores asociados a la latencia Cp y Wp (Kenney et al., 1989) y ya que cada una de las líneas celulares tienen un patrón distinto de expresión de genes virales, los mecanismos de regulación para restringir sus niveles de expresión podrían ser distintos en cada una, ya que parten de distintos estados de latencia. La inducción de Zta depende también de factores internos específicos

en los linfocitos B (Li et al., 2016). Esto se demuestra porque no en todas las líneas celulares de linfocitos B EBVpos se puede reactivar eficientemente el virus con el mismo estímulo. Por ejemplo, para las Akata, el mejor estímulo para reactivar al virus es el entrecruzamiento con anti-IgG (Daibata, Humphreys, Takada & Sairenji, 1990) esto también podría explicar los niveles variables de expresión de *BZLF1* encontrados.

A partir de los resultados de la inducción química se decidió trabajar sólo con los linfocitos HS445, ya que fueron los que mejor respondieron ante el estímulo químico (presentaron el nivel más alto de inducción dado por *BZLF1*). Se decidió transfectar a los linfocitos B HS445, un plásmido que contiene el gen *cagA* (GFP-*cagA* Full) y aparte uno que no lo contiene (EGFP-C1; vector solo) mediante un sistema de transfección por asistencia magnética (MATra) para evitar la posible reactivación de EBV en los linfocitos por el estrés celular causado por métodos de transfección más agresivo, como la lipofección o la electroporación, que, a pesar de tener una mediana eficiencia de transfección en los linfocitos B y ser el método más comúnmente usado para transfectar linfocitos B (Potter & Heller, 2003), también genera estrés en los linfocitos B, lo que muy probablemente resultaría en la reactivación de EBV. MATra es un método de transfección menos agresivo en donde el plásmido se internaliza en la célula mediante pinocitosis (Bertram, 2006). Además, también se utilizaron los plásmidos libres de endotoxinas para evitar la activación de los linfocitos B, la disminución de la eficiencia de transfección y la reactivación espontánea de EBV (Butash, Natarajan, Young & Fox, 2000). La transfección de los dos plásmidos de interés en los linfocitos B HS445 fue muy ineficiente, teniendo eficiencias <0.003%, lo que haría muy difícil poder observar la cinética de reactivación por CagA. La selección y expansión de las pocas células transfectadas tomaría varios días, por lo que ya no encontraríamos la expresión, por ejemplo, de *BZLF1* que es un gen inmediato temprano en la reactivación de EBV. En el artículo de Daibata et al., 1990 el vector GFP-*cagA* Full presenta baja eficiencia de transfección (4%), lo que nos sugiere que hay algo en el plásmido que está afectando la eficiencia de la expresión de CagA, lo que explicaría por qué no

vemos suficiente GFP, incluso en las células MCF-7 que son fáciles de transfectar. En los linfocitos no esperábamos obtener una alta eficiencia de transfección, ya que se ha demostrado que son extremadamente difíciles de transfectar (Ling et al., 2014). Además, el número de copias virales generadas por los linfocitos que solo tuvieron contacto con los reactivos de MATra resultó ser significativamente mayor al número de copias virales producidas de manera basal (45%), lo que nos indicó que el contacto con las nanopartículas magnéticas está reactivando de manera inespecífica a EBV en los linfocitos HS445. Así mismo, el número de copias virales generadas de manera basal lo consideramos alto, lo que atribuimos a un posible estímulo generado por la adhesión de los linfocitos a la superficie de la placa recubierta con poli-D-lisina o a la sola manipulación de las células durante la transfección. Por lo tanto, este método de transfección no es el ideal para utilizar con los linfocitos EBVpos tanto por su baja eficiencia en este tipo celular, como por la sensibilidad del virus con los reactivos de transfección.

Se decidió entonces, probar la infección directa de los linfocitos B con la bacteria *H. pylori*. Esto teniendo en cuenta que *H. pylori* puede internalizar CagA en linfocitos B a través de su sistema de secreción tipo IV (TSS) (Lin et al., 2010), y CagA citoplasmática puede interactuar con las cinasas celulares y desencadenar su activación al fosforilarse (Krisch, Posselt, Hammerl & Wessler, 2016). Ésto podría tener consecuencias biológicas que pueden incluir la interacción molecular entre *H. pylori*/CagA y EBV en los linfocitos infectados. Nosotros observamos que la infección directa a dos MOIs (10 y 100) se comporta de manera similar, pero en proporciones distintas. Las copias virales generadas después de la infección fueron aumentando respecto al tiempo, las cuales pueden explicarse tanto por la reactivación como por el estrés de las condiciones de la infección (SFB reducido). Recientemente, en el artículo de Pandey, Jha, Shukla, Shirley & Robertson, 2018 concluyen que CagA es un contribuyente importante al aumento de la producción de copias virales de EBV en células epiteliales gástricas infectadas por EBV en el contexto de la coinfección con *H. pylori*, resultado que correlaciona con nuestros resultados en linfocitos B EBVpos.

En nuestro experimento de infección directa, además de cuantificar las copias virales de EBV también encontramos el aumento en la expresión de dos genes líticos virales (*BZLF1* y *BCLF1*) como consecuencia de la infección con *H. pylori* CagApos que es significativamente mayor al aumento de expresión generado por la infección con *H. pylori* CagAneg o con la bacteria muerta, lo que nos estaría hablando de una contribución importante, más no única de CagA en la reactivación de EBV y que en las infecciones con CagAneg y con la bacteria muerta también generan un aumento en la expresión de *BZLF1* y *BCLF1* la reactivación de EBV también puede atribuirse a otros factores de *H. pylori*, pero es claro que la condición de infección con CagApos genera una diferencia determinante en los niveles de reactivación de EBV. Es importante mencionar que no se utilizaron cepas isogénicas de *H. pylori* para la infección. Las cepas isogénicas son idénticas en todos los aspectos, excepto por un cambio definido en el genoma, lo que permite observar únicamente los efectos del gen alterado. De aquí la importancia de los experimentos con cepas isogénicas (Gulig, 1993). Sabemos que la cepa CagAneg empleada tiene una delección del gen que codifica para la proteína CagA, sin embargo, se desconoce qué otras variaciones genéticas pueda tener con respecto a la cepa CagApos, variaciones que, podrían afectar los resultados aquí obtenidos, por lo que es deseable que estos experimentos se repitan usando bacterias isogénicas.

Los resultados anteriores sugieren que *H. pylori* puede ayudar a que EBV infecte el epitelio gástrico al reactivarlo dentro de los linfocitos B. Por otro lado, sabiendo que en ausencia de infección por EBV, *H. pylori* no es suficiente para desencadenar gastritis severa en niños (Cardenas et al., 2013) y CG en adultos (Cárdenas et al., 2015; 2017), resulta de importancia clínica encontrar a ambos patógenos en muestras de lesiones gástricas tempranas para el correcto diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Además, podrían usarse como marcador para identificar la población con mayor riesgo de presentar lesiones gástricas graves en un futuro o identificar blancos que permitan prevenir el desarrollo del CG.

## 11 Conclusión

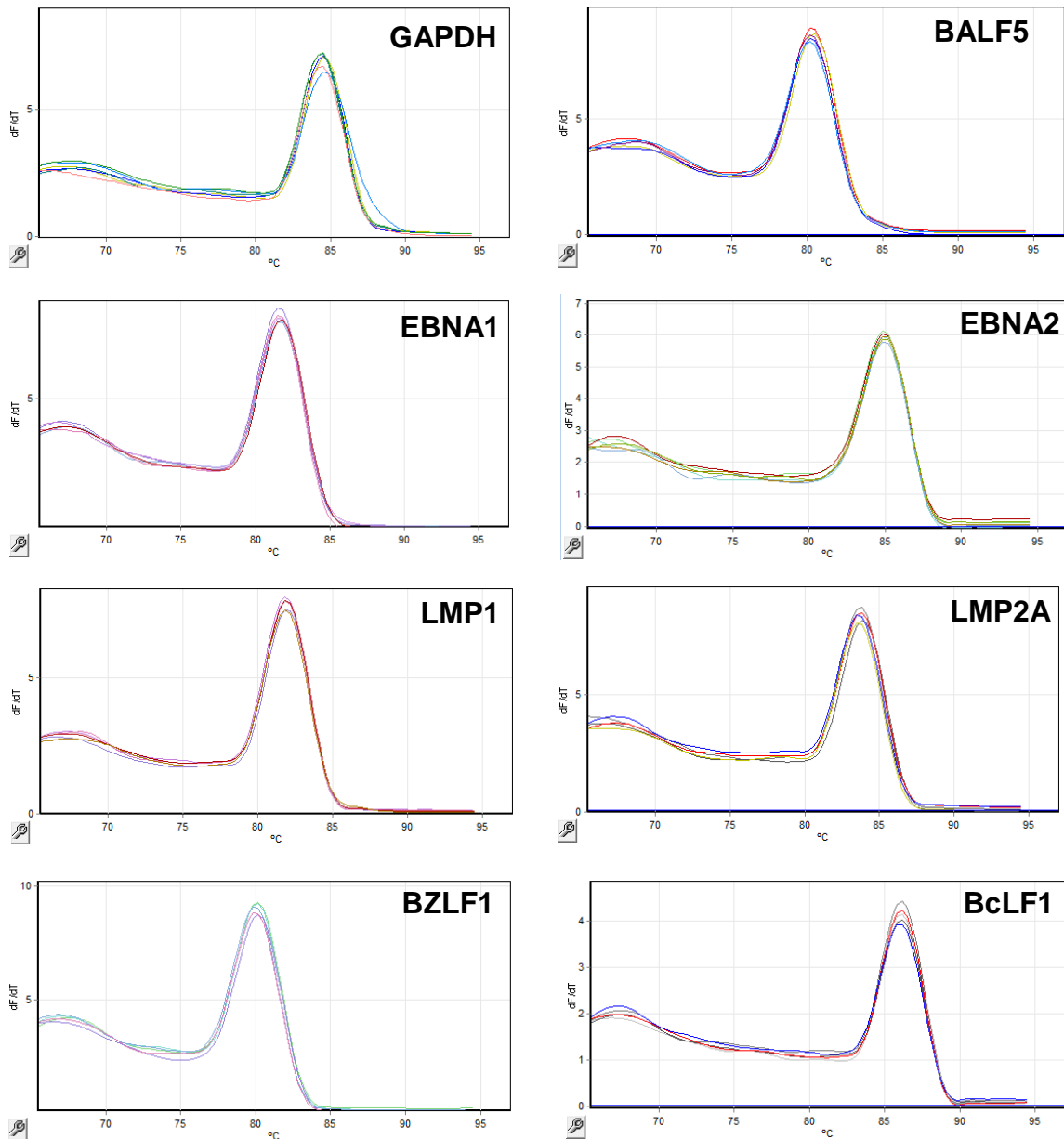
La bacteria *H. pylori* CagApos activa el ciclo lítico de EBV en linfocitos EBVpos, al aumentar la expresión de dos genes líticos virales (*BZLF1* y *BcLF1*) hasta 3.04 y 3.91 veces respectivamente a las 24 horas de una infección directa. Además, *H. pylori* CagApos genera 1.88 veces el número de copias virales que se producen con *H. pylori* CagAneg en la infección directa y en la transfección de un plásmido que contiene el gen *cagA* en linfocitos B EBVpos se generan hasta 1.53 veces las copias virales respecto a la transfección con un plásmido vacío.

## 12 Perspectivas

1. Aislamiento de las copias virales generadas en la transfección y en la infección directa para infectar células epiteliales gástricas y comprobar que éstas sean partículas virales infectivas.
2. Disrupción de la vía de señalización de PKC para corroborar que ésta sea la una vía de interacción directa entre ambos patógenos.

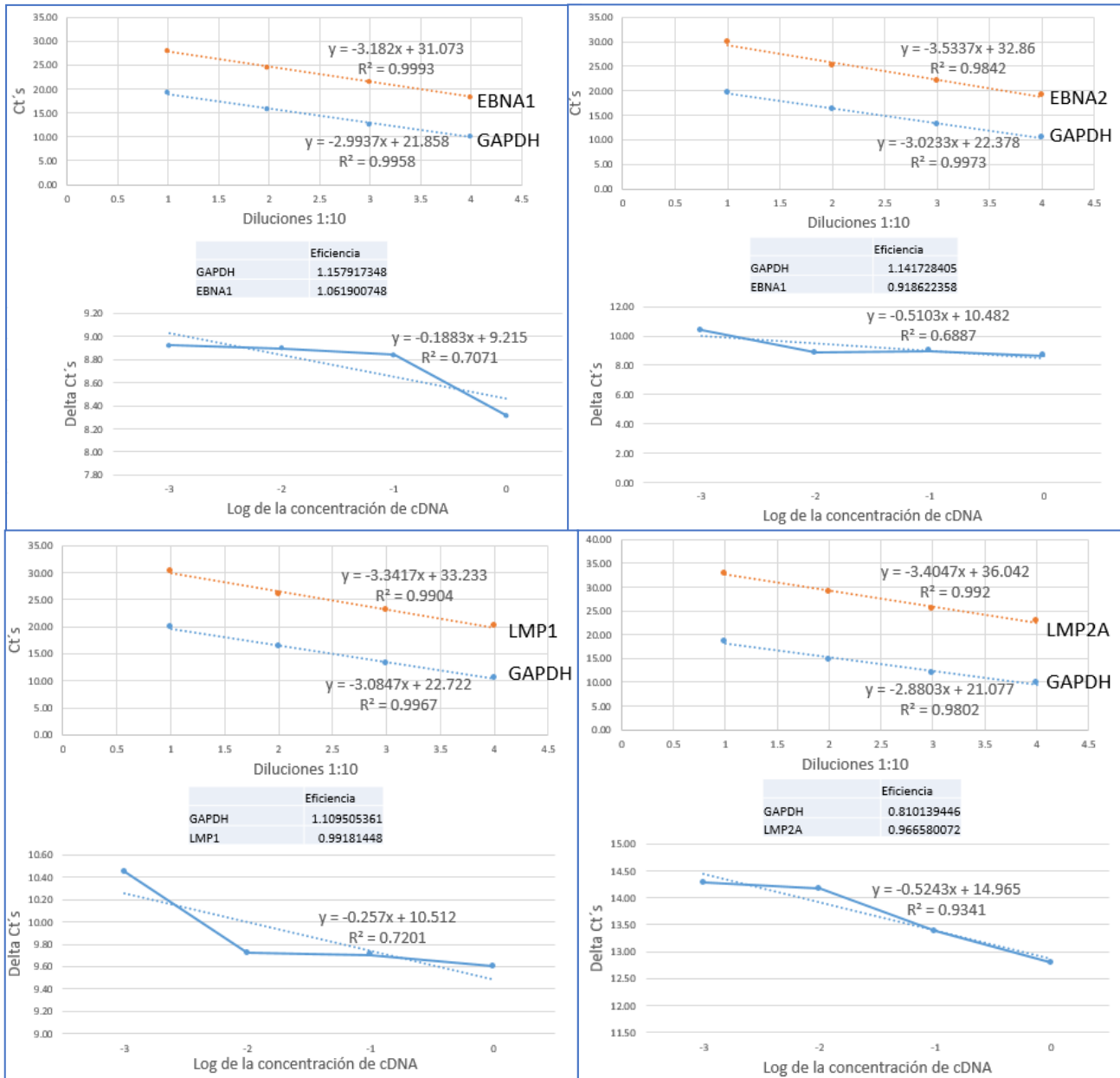
Aún no está claro cuáles son los mecanismos moleculares exactos por los cuales interactúan estos patógenos. Por lo que, aún hacen falta estudios detallados que definan los mecanismos moleculares por los cuales EBV y *H. pylori* contribuyen a la generación de lesiones gástricas y facilitan la progresión del CG.

## 13 Figuras suplementarias

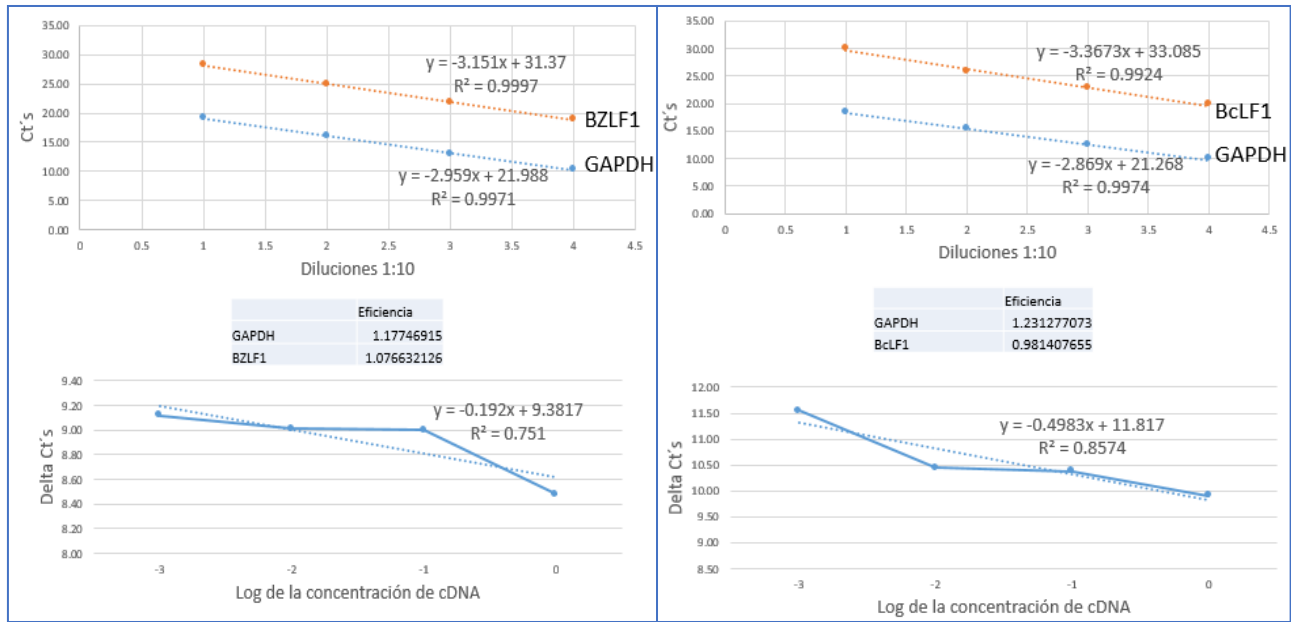


**Figura suplementaria 1. Curvas de MELT de los RT-PCRs en los linfocitos B HS445.** Muestran la amplificación de un producto único en las reacciones de RT-PCR para cada uno de los genes EBV que probamos. En las líneas celulares de linfocitos B EBVpos Raji, Namalwa, LCL-HIM1 y Akata las reacciones también son específicas (no se muestran).

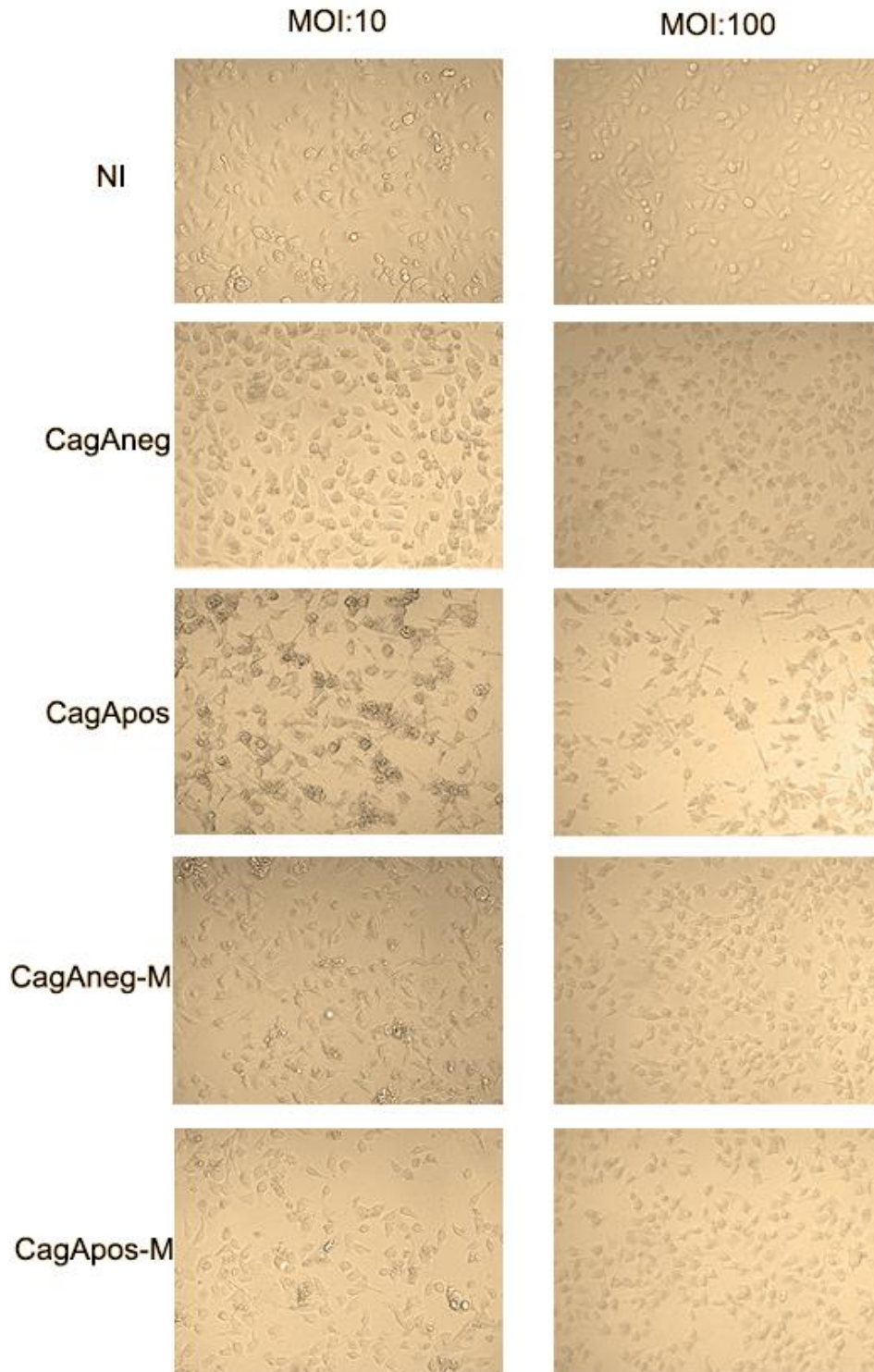




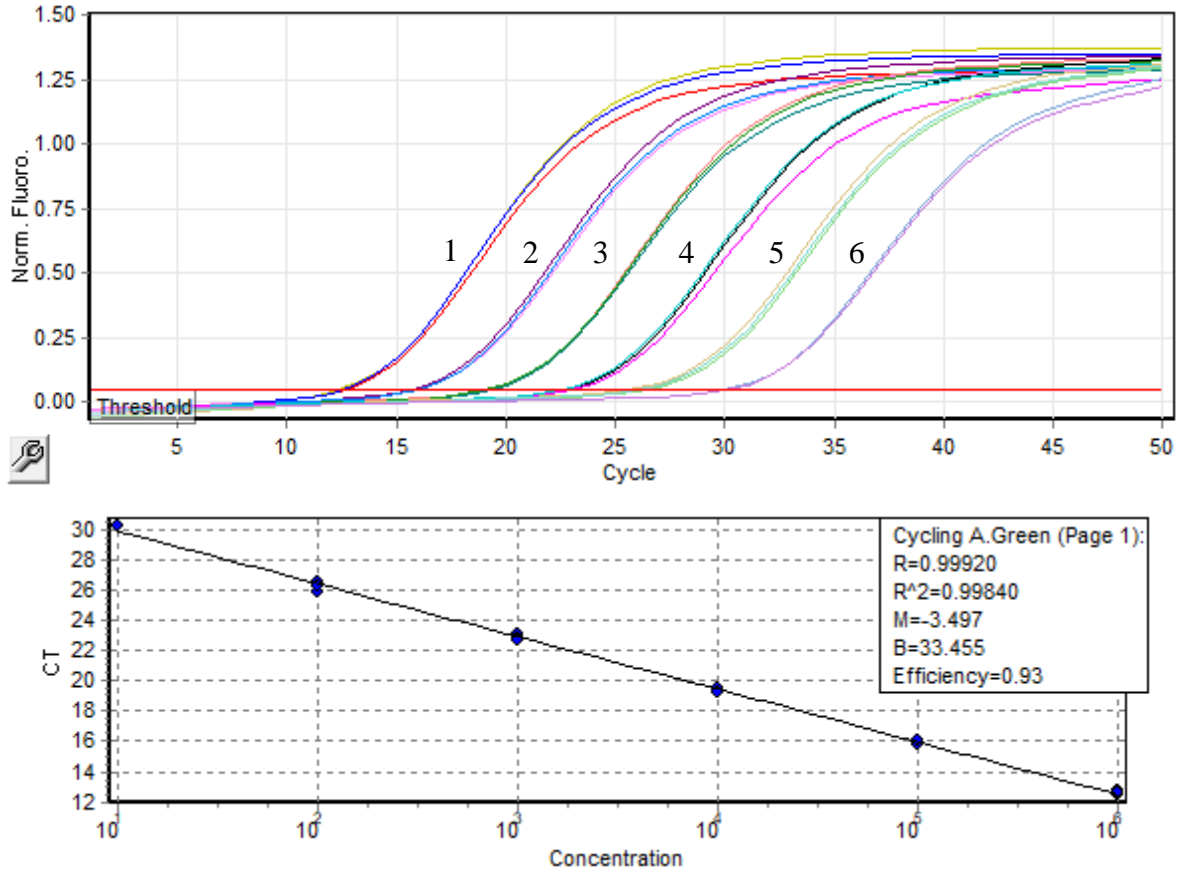
**Figura suplementaria 2, parte 1. Validación del método de cuantificación relativa para los genes EBNA1, EBNA2, LMP1 y LMP2A de EBV. Comparación de eficiencias de RT-PCRs en linfocitos HS445.**



**Figura suplementaria 2, parte 2. Validación del método de cuantificación relativa para los genes BZLF1 y BCLF1 de EBV.** Comparación de eficiencias de RT-PCRs en linfocitos HS445. En las líneas celulares de linfocitos B EBVpos Raji, Namalwa, LCL-HIM1 y Akata las reacciones también muestran eficiencias comparables (no se muestran).



**Figura suplementaria 3. Infección de células AGS con *Helicobacter pylori*.** Se muestran las fotografías de lo observado con al microscopio óptico con MOI: 10 y 100 a las 24 horas post-infección. CagApos es la única cepa que internaliza la proteína CagA en las células AGS, por lo tanto, es la única que genera el fenotipo colibrí.



**Figura suplementaria 4. Curva estándar de BALF5.** RT-PCR de 6 diluciones de plásmido pGEM T-easy+BALF5 en concentraciones de  $1=1 \times 10^6$ ;  $2=1 \times 10^5$ ;  $3=1 \times 10^4$ ;  $4=1 \times 10^3$ ;  $5=100$ ;  $6=10$  copias virales y su regresión lineal.

## 14 Bibliografía

- Abbruzzese, J. L., Evans, D. B., Willett, C. G., & Fenoglio-Preiser, C. (2003). *Gastrointestinal Oncology*. Oxford University Press. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=m2d9bXOrB4wC>
- Adams, A., Lindahl, T., & Klein, G. (1973). Linear association between cellular DNA and Epstein-Barr virus DNA in a human lymphoblastoid cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(10), 2888–2892. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4355371>
- Adamson, E. D. (1987). Oncogenes in development. *Development (Cambridge, England)*, 99(4), 449–471. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2822372>
- Aguayo, F., Khan, N., Koriyama, C., González, C., Ampuero, S., Padilla, O., ... Akiba, S. (2011). Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in breast cancer from Chile. *Infectious Agents and Cancer*, 6(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-6-7>
- Akiba, S., Koriyama, C., Herrera-Goepfert, R., & Eizuru, Y. (2008). Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: epidemiological and clinicopathological features. *Cancer Sci*, 99(2), 195–201. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00674.x>
- Akopyants, N. S., Clifton, S. W., Kersulyte, D., Crabtree, J. E., Youree, B. E., Reece, C. A., ... Berg, D. E. (1998). Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology*, 28(1), 37–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593295>
- Amieva, M. R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L. S., Nelson, W. J., & Falkow, S. (2003). Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5624), 1430–1434. <https://doi.org/10.1126/science.1081919>
- Angus Lamond & Laura Trinkle-Mulcahy. (2001). Addgene: pEGFP(C1) #44221. Retrieved November 13, 2018, from <https://www.addgene.org/44221/>
- Arévalo, A., Trespalacios, A. A., & Otero, W. (2009). Importancia de la proteína CagA en infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 24, 388–395. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99572009000400009&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572009000400009&nrm=iso)
- BA Lifesciences. (2010). Magnetic assisted transfection - MATra | IBA Lifesciences. Retrieved November 13, 2018, from <https://www.iba-lifesciences.com/matra-technology.html>
- Backert, S., & Selbach, M. (2008). Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 10(8), 1573–1581. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01156.x>
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., ... Barrell, B. G. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein—Barr virus genome. *Nature*, 310(5974), 207–211. <https://doi.org/10.1038/310207a0>
- Bagnoli, F., Buti, L., Tompkins, L., Covacci, A., & Amieva, M. R. (2005). *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), 16339–16344. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502598102>
- Bass, A. J., Thorsson, V., Shmulevich, I., Reynolds, S. M., Miller, M., Bernard, B., ... Liu, J. (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513(7517), 202–209. <https://doi.org/10.1038/nature13480>
- Bauer, B., & Meyer, T. F. (2011). The Human Gastric Pathogen *Helicobacter pylori* and Its Association with Gastric Cancer and Ulcer Disease. *Ulcers*, 2011, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2011/340157>
- Baumann, M., Mischak, H., Dammeier, S., Kolch, W., Gires, O., Pich, D., ... Hammerschmidt, W. (1998). Activation of the Epstein-Barr virus transcription factor BZLF1 by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced phosphorylation. *Journal of Virology*, 72(10), 8105–8114. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9733851>
- Berenblum, I. (1975). Sequential Aspects of Chemical Carcinogenesis: Skin. In *Cancer. A Comprehensive Treatise* (pp. 323–344). Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4449-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4449-0_10)
- Berger, A. (2000). Scientists discover how helicobacter survives gastric acid. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 320(7230), 268. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10650011>
- Bertram, J. (2006). MATra - Magnet Assisted Transfection: combining nanotechnology and magnetic forces to improve intracellular delivery of nucleic acids. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7(4), 277–285. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16918404>
- Blaser, M. J., Chyou, P. H., & Nomura, A. (1995). Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. *Cancer Research*, 55(3), 562–565. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7834625>
- Brandt, S., Wessler, S., Hartig, R., & Backert, S. (2009). *Helicobacter pylori* activates protein kinase C delta to control Raf in MAP kinase signalling: Role in AGS epithelial cell scattering and elongation. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(10), 874–892. <https://doi.org/10.1002/cm.20373>
- Brooks-Wilson, A. R., Kaurah, P., Suriano, G., Leach, S., Senz, J., Grehan, N., ... Huntsman, D. (2004). Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J Med Genet*, 41(7), 508–517. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15235021>
- Brooks, L., Yao, Q. Y., Rickinson, A. B., & Young, L. S. (1992). Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *Journal of Virology*, 66(5), 2689–2697. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1313894>
- Butash, K. A., Natarajan, P., Young, A., & Fox, D. K. (2000). Reexamination of the effect of endotoxin on cell proliferation and transfection efficiency. *BioTechniques*, 29(3), 610–

- 614, 616, 618–619. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10997275>
- Cardenas-Mondragon, M. G., Carreon-Talavera, R., Camorlinga-Ponce, M., Gomez-Delgado, A., Torres, J., & Fuentes-Panana, E. M. (2013). Epstein Barr virus and Helicobacter pylori co-infection are positively associated with severe gastritis in pediatric patients. *PLoS One*, 8(4), e62850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062850>
- Cardenas-Mondragon, M. G., Torres, J., Flores-Luna, L., Camorlinga-Ponce, M., Carreon-Talavera, R., Gomez-Delgado, A., ... Fuentes-Panana, E. M. (2015). Case-control study of Epstein-Barr virus and Helicobacter pylori serology in Latin American patients with gastric disease. *Br J Cancer*, 112(12), 1866–1873. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.175>
- Cárdenas-Mondragón, M. G., Torres, J., Flores-Luna, L., Camorlinga-Ponce, M., Carreón-Talavera, R., Gomez-Delgado, A., ... Fuentes-Panana, E. M. (2015). Case-control study of Epstein-Barr virus and Helicobacter pylori serology in Latin American patients with gastric disease. *British Journal of Cancer*, 112(12), 1866–1873. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.175>
- Cárdenas-Mondragón, M. G., Torres, J., Sánchez-Zauco, N., Gómez-Delgado, A., Camorlinga-Ponce, M., Maldonado-Bernal, C., & Fuentes-Panana, E. M. (2017). Elevated Levels of Interferon- $\gamma$  Are Associated with High Levels of Epstein-Barr Virus Reactivation in Patients with the Intestinal Type of Gastric Cancer. *Journal of Immunology Research*, 2017, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/7069242>
- Carneiro, F., Huntsman, D. G., Smyrk, T. C., Owen, D. A., Seruca, R., Pharoah, P., ... Sobrinho-Simoes, M. (2004). Model of the early development of diffuse gastric cancer in E-cadherin mutation carriers and its implications for patient screening. *J Pathol*, 203(2), 681–687. <https://doi.org/10.1002/path.1564>
- Cavenee R., W. & W. (1995). The Genetic Basis of Cancer. *Scientific American*, 272 (3), 72–79.
- Chial, H. (2008). Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer. *Nature Education* , 1(1):33.
- Chiba, T., Marusawa, H., Seno, H., & Watanabe, N. (2008). Mechanism for gastric cancer development by Helicobacter pylori infection. *J Gastroenterol Hepatol*, 23(8 Pt 1), 1175–1181. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05472.x>
- Churin, Y., Al-Ghoul, L., Kepp, O., Meyer, T. F., Birchmeier, W., & Naumann, M. (2003). Helicobacter pylori CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *The Journal of Cell Biology*, 161(2), 249–255. <https://doi.org/10.1083/jcb.200208039>
- Correa, P. (1988). A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res*, 48(13), 3554–3560. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3288329>
- Correa, P., & Houghton, J. (2007). Carcinogenesis of Helicobacter pylori. *Gastroenterology*, 133(2), 659–672. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.06.026>
- Cover, T. L., & Blaser, M. J. (2009). Helicobacter pylori in health and disease. *Gastroenterology*, 136(6), 1863–1873. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.073>
- Crew, K. D., & Neugut, A. I. (2006). Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 12(3), 354–362. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16489633>

- Daibata, M., Humphreys, R. E., Takada, K., & Sairenji, T. (1990). Activation of latent EBV via anti-IgG-triggered, second messenger pathways in the Burkitt's lymphoma cell line Akata. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *144*(12), 4788–4793. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2161880>
- Daibata, M., & Sairenji, T. (1993). Epstein-Barr Virus (EBV) Replication and Expressions of EA-D (BMRF1 Gene Product), Virus-Specific Deoxyribonuclease, and DNA Polymerase in EBV-Activated Akata Cells. *Virology*, *196*(2), 900–904. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1993.1555>
- Davenport, M. G., & Pagano, J. S. (1999). Expression of EBNA-1 mRNA is regulated by cell cycle during Epstein-Barr virus type I latency. *Journal of Virology*, *73*(4), 3154–3161. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10074167>
- Dawson, C. W., Eliopoulos, A. G., Dawson, J., & Young, L. S. (1995). BHRF1, a viral homologue of the Bcl-2 oncogene, disturbs epithelial cell differentiation. *Oncogene*, *10*(1), 69–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7824280>
- Dawson, C. W., Tramontanis, G., Eliopoulos, A. G., & Young, L. S. (2003). Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Activates the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway to Promote Cell Survival and Induce Actin Filament Remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(6), 3694–3704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209840200>
- De Flora, S., & Bonanni, P. (2011). The prevention of infection-associated cancers. *Carcinogenesis*, *32*(6), 787–795. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr054>
- Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K. M., Kaye, K. M., Kleijnen, M. F., Kieff, E., & Mosialos, G. (1996). Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(12), 7098–7108. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943365>
- Engel, L. S., Chow, W. H., Vaughan, T. L., Gammon, M. D., Risch, H. A., Stanford, J. L., ... Fraumeni Jr., J. F. (2003). Population attributable risks of esophageal and gastric cancers. *J Natl Cancer Inst*, *95*(18), 1404–1413. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13130116>
- Epstein, M. ., Achong, B. ., & Barr, Y. . (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblast From Burkitt's Lymphoma. *The Lancet*, *283*(7335), 702–703. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(64\)91524-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(64)91524-7)
- Fields, B. N., Knipe, D. M. (David M., & Howley, P. M. (2007). *Fields virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Fingerroth, J. D., Weis, J. J., Tedder, T. F., Strominger, J. L., Biro, P. A., & Fearon, D. T. (1984). Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(14), 4510–4514. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6087328>
- Global Burden of Disease Cancer, C., Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R. M., Barregard, L., Bhutta, Z. A., ... Naghavi, M. (2017). Global, Regional, and National Cancer Incidence,



- Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*, 3(4), 524–548.  
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5688>
- GLOBOCAN. (2018). Cancer incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base. Retrieved from <http://globocan.iarc.fr>
- Goldstein, D. B., & Hirschhorn, J. N. (2004). In genetic control of disease, does “race” matter? *Nat Genet*, 36(12), 1243–1244. <https://doi.org/10.1038/ng1204-1243>
- Grandjouan, S., & Henry, I. (1988). Genomic changes and oncogenesis. Present functional theories. Anti-oncogenes. *Annales de Medecine Interne*, 139(4), 258–264. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2847618>
- Greenspan, J. S., Greenspan, D., Lennette, E. T., Abrams, D. I., Conant, M. A., Petersen, V., & Freese, U. K. (1985). Replication of Epstein–Barr Virus within the Epithelial Cells of Oral Hairy Leukoplakia, an AIDS-Associated Lesion. *New England Journal of Medicine*, 313(25), 1564–1571. <https://doi.org/10.1056/NEJM198512193132502>
- Gregory, C. D., Rowe, M., & Rickinson, A. B. (1990). Different Epstein–Barr virus–B cell interactions in phenotypically distinct clones of a Burkitt’s lymphoma cell line. *Journal of General Virology*, 71(7), 1481–1495. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-7-1481>
- Grejfer, A. E., Ramayanti, O., Verkuijlen, S. A., Novalic, Z., Juwana, H., & Middeldorp, J. M. (2017). Quantitative multi-target RNA profiling in Epstein-Barr virus infected tumor cells. *J Virol Methods*, 241, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.12.007>
- Greim, H., & Snyder, R. (2008). *Toxicology and Risk Assessment: A Comprehensive Introduction*. Wiley. Retrieved from [https://books.google.com.mx/books?id=jRG6CjddH\\_wC](https://books.google.com.mx/books?id=jRG6CjddH_wC)
- Guilford, P., Hopkins, J., Harraway, J., McLeod, M., McLeod, N., Harawira, P., ... Reeve, A. E. (1998). E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*, 392(6674), 402–405. <https://doi.org/10.1038/32918>
- Gulig, P. a. (1993). Use of isogenic mutants to study bacterial virulence factors. *Journal of Microbiological Methods*, 18(3), 275–287. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(93\)90042-G](https://doi.org/10.1016/0167-7012(93)90042-G)
- Haan, K. M., Aiyar, A., & Longnecker, R. (2001). Establishment of latent Epstein-Barr virus infection and stable episomal maintenance in murine B-cell lines. *Journal of Virology*, 75(6), 3016–3020. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.6.3016-3020.2001>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Hatakeyama, M. (2004). Oncogenic mechanisms of the Helicobacter pylori CagA protein. *Nature Reviews Cancer*, 4(9), 688–694. <https://doi.org/10.1038/nrc1433>
- Hatakeyama, M. (2009). Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol*, 44(4), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s00535-009-0014-1>
- Henderson, A., Ripley, S., Heller, M., & Kieff, E. (1983). Chromosome site for Epstein-Barr

- virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(7), 1987–1991. <https://doi.org/10.1073/PNAS.80.7.1987>
- Henle, G., Henle, W., & Diehl, V. (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 59(1), 94–101. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5242134>
- Henle, W., Hummeler, K., & Henle, G. (1966). Antibody coating and agglutination of virus particles separated from the EB3 line of Burkitt lymphoma cells. *Journal of Bacteriology*, 92(1), 269–271. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5328752>
- Herbst, H., Stein, H., & Niedobitek, G. (1993). Epstein-Barr virus and CD30+ malignant lymphomas. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 4(2), 191–239. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380546>
- Higashi, H., Nakaya, A., Tsutsumi, R., Yokoyama, K., Fujii, Y., Ishikawa, S., ... Hatakeyama, M. (2004). Helicobacter pylori CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J Biol Chem*, 279(17), 17205–17216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309964200>
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., & Hatakeyama, M. (2002). SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein. *Science*, 295(5555), 683–686. <https://doi.org/10.1126/science.1067147>
- Howe, H. L., Wu, X., Ries, L. A., Cokkinides, V., Ahmed, F., Jemal, A., ... Edwards, B. K. (2006). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2003, featuring cancer among U.S. Hispanic/Latino populations. *Cancer*, 107(8), 1711–1742. <https://doi.org/10.1002/cncr.22193>
- IARC. (1994). Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7–14 June 1994. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 61, 1–241. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7715068>
- IARC. (1997). Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma herpesvirus/ human herpesvirus 8. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 70(Pt B), 347–373. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23189750>
- IARC. (2011). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 100. A review of carcinogen: Biological agents. *Lyon, France*.
- Iizasa, H., Nanbo, A., Nishikawa, J., Jinushi, M., & Yoshiyama, H. (2012). Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma. *Viruses*, 4(12), 3420–3439. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23342366>
- Ilyas, M., & Tomlinson, I. P. (1997). The interactions of APC, E-cadherin and beta-catenin in tumour development and progression. *J Pathol*, 182(2), 128–137. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199706\)182:2<128::AID-PATH839>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199706)182:2<128::AID-PATH839>3.0.CO;2-Q)
- Imai, S., Koizumi, S., Sugiura, M., Tokunaga, M., Uemura, Y., Yamamoto, N., ... Osato, T.

- (1994). Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(19), 9131–9135. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8090780>
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, *61*(2), 69–90. <https://doi.org/10.3322/caac.20107>
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., & Thun, M. J. (2009). Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, *59*(4), 225–249. <https://doi.org/10.3322/caac.20006>
- Kaneda, A., Matsusaka, K., Aburatani, H., & Fukayama, M. (2012). Epstein-Barr Virus Infection as an Epigenetic Driver of Tumorigenesis. *Cancer Research*, *72*(14), 3445–3450. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3919>
- Kang, M. S., & Kieff, E. (2015). Epstein-Barr virus latent genes. *Exp Mol Med*, *47*, e131. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.84>
- Karimi, P., Islami, F., Anandasabapathy, S., Freedman, N. D., & Kamangar, F. (2014). Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *23*(5), 700–713. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-1057>
- Kelly, G. L., Milner, A. E., Baldwin, G. S., Bell, A. I., & Rickinson, A. B. (2006). Three restricted forms of Epstein-Barr virus latency counteracting apoptosis in c-myc-expressing Burkitt lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(40), 14935–14940. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509988103>
- Kelly, G. L., Milner, A. E., Tierney, R. J., Croom-Carter, D. S. G., Altmann, M., Hammerschmidt, W., ... Rickinson, A. B. (2005). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) gene deletion is consistently linked with EBNA3A, -3B, and -3C expression in Burkitt's lymphoma cells and with increased resistance to apoptosis. *Journal of Virology*, *79*(16), 10709–10717. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10709-10717.2005>
- Kenney, S., Kamine, J., Holley-Guthrie, E., Lin, J. C., Mar, E. C., & Pagano, J. (1989). The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1 immediate-early gene product differentially affects latent versus productive EBV promoters. *Journal of Virology*, *63*(4), 1729–1736. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2538653>
- Kieser, A., & Sterz, K. R. (2015). The Latent Membrane Protein 1 (LMP1). In *Current topics in microbiology and immunology* (Vol. 391, pp. 119–149). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_4)
- Kimura, H., Morita, M., Yabuta, Y., Kuzushima, K., Kato, K., Kojima, S., ... Morishima, T. (1999). Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(1), 132–136. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9854077>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 108. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Krisch, L. M., Posselt, G., Hammerl, P., & Wessler, S. (2016). CagA Phosphorylation in

- Helicobacter pylori-Infected B Cells Is Mediated by the Nonreceptor Tyrosine Kinases of the Src and Abl Families. *Infect Immun*, 84(9), 2671–2680.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.00349-16>
- Ladeiras-Lopes, R., Pereira, A. K., Nogueira, A., Pinheiro-Torres, T., Pinto, I., Santos-Pereira, R., & Lunet, N. (2008). Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer Causes Control*, 19(7), 689–701.  
<https://doi.org/10.1007/s10552-008-9132-y>
- Lauren, P. (1965). The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 64, 31–49. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14320675>
- Levine, P. H., Stemmermann, G., Lennette, E. T., Hildesheim, A., Shibata, D., & Nomura, A. (1995). Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus prior to the diagnosis of Epstein-Barr-virus-associated gastric adenocarcinoma. *International Journal of Cancer*, 60(5), 642–644. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7860138>
- Li, H., Liu, S., Hu, J., Luo, X., Li, N., M Bode, A., & Cao, Y. (2016). Epstein-Barr virus lytic reactivation regulation and its pathogenic role in carcinogenesis. *International Journal of Biological Sciences*, 12(11), 1309–1318. <https://doi.org/10.7150/ijbs.16564>
- Lin, W.-C., Tsai, H.-F., Kuo, S.-H., Wu, M.-S., Lin, C.-W., Hsu, P.-I., ... Hsu, P.-N. (2010a). Translocation of Helicobacter pylori CagA into Human B Lymphocytes, the Origin of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Cancer Research*, 70(14), 5740–5748. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4690>
- Lin, W.-C., Tsai, H.-F., Kuo, S.-H., Wu, M.-S., Lin, C.-W., Hsu, P.-I., ... Hsu, P.-N. (2010b). Translocation of Helicobacter pylori CagA into Human B Lymphocytes, the Origin of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Cancer Research*, 70(14), 5740–5748. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4690>
- Ling Yong, C. L., Siak-Wei Ow, D., Tandiono, T., Mei Heng, L. L., Kwok-Keung Chan, K., Ohl, C.-D., ... Boon-Hwa Choo, A. (2014). Microbubble-mediated sonoporation for highly efficient transfection of recalcitrant human B- cell lines. *Biotechnology Journal*, 9(8), 1081–1087. <https://doi.org/10.1002/biot.201300507>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408.  
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luo, B., Wang, Y., Wang, X.-F., Liang, H., Yan, L.-P., Huang, B.-H., & Zhao, P. (2005). Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinomas. *World Journal of Gastroenterology*, 11(5), 629–633. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15655811>
- Marshall, B. J., & Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1(8390), 1311–1315. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6145023>
- Martínez-López, J. L. E., Torres, J., Camorlinga-Ponce, M., Mantilla, A., Leal, Y. A., &

- Fuentes-Pananá, E. M. (2014). Evidence of Epstein-Barr virus association with gastric cancer and non-atrophic gastritis. *Viruses*, 6(1), 301–318. <https://doi.org/10.3390/v6010301>
- Martínez-López, J., Torres, J., Camorlinga-Ponce, M., Mantilla, A., Leal, Y., & Fuentes-Pananá, E. (2014). Evidence of Epstein-Barr Virus Association with Gastric Cancer and Non-Atrophic Gastritis. *Viruses*, 6(1), 301–318. <https://doi.org/10.3390/v6010301>
- McKie, A. B., Filipe, M. I., & Lemoine, N. R. (1993). Abnormalities affecting the APC and MCC tumour suppressor gene loci on chromosome 5q occur frequently in gastric cancer but not in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 55(4), 598–603. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8406987>
- Mikrostoker. (n.d.). No Title. Retrieved from <https://mx.depositphotos.com/vector-images/mucosa-gástrica.html?qview=115972898>
- Miles, L. M. (2005). Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective – the WCRF/AICR second report. *Nutrition Bulletin*, 30(2), 168–172. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1467-3010.2005.00470.x>
- Minoura-Etoh, J., Gotoh, K., Sato, R., Ogata, M., Kaku, N., Fujioka, T., & Nishizono, A. (2006). Helicobacter pylori-associated oxidant monochloramine induces reactivation of Epstein-Barr virus (EBV) in gastric epithelial cells latently infected with EBV. *Journal of Medical Microbiology*, 55(7), 905–911. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46580-0>
- Murata, T. (2014). Regulation of Epstein-Barr virus reactivation from latency. *Microbiol Immunol*, 58(6), 307–317. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12155>
- Nagini, S. (2012). Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol*, 4(7), 156–169. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v4.i7.156>
- Newton, A. C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(2), 161–167. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80058-0](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80058-0)
- Niedobitek, G., & Young, L. S. (1994). Epstein-Barr virus persistence and virus-associated tumours. *The Lancet*, 343(8893), 333–335. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)91167-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)91167-3)
- NovaliA, Z., & van Rossen, T. M. (2016). Agents and Approaches for Lytic Induction Therapy of Epstein-Barr Virus Associated Malignancies. *Medicinal Chemistry*, 6(7). <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000384>
- Nutter, L. M., Grill, S. P., Li, J. S., Tan, R. S., & Cheng, Y. C. (1987). Induction of virus enzymes by phorbol esters and n-butyrate in Epstein-Barr virus genome-carrying Raji cells. *Cancer Research*, 47(16), 4407–4412. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3038311>
- Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., ... Hatakeyama, M. (2008). Transgenic expression of Helicobacter pylori CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(3), 1003–1008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711183105>
- Oliveira, C., Seruca, R., & Carneiro, F. (2006). Genetics, Pathology, and Clinics of Familial

- Gastric Cancer. *International Journal of Surgical Pathology*, 14(1), 21–33.  
<https://doi.org/10.1177/106689690601400105>
- Pamudurti, N. R., Bartok, O., Jens, M., Ashwal-Fluss, R., Stottmeister, C., Ruhe, L., ... Kadener, S. (2017). Translation of CircRNAs. *Molecular Cell*, 66(1), 9–21.e7.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.021>
- Pandey, S., Jha, H. C., Shukla, S. K., Shirley, M. K., & Robertson, E. S. (2018). Epigenetic Regulation of Tumor Suppressors by Helicobacter pylori Enhances EBV-Induced Proliferation of Gastric Epithelial Cells. *MBio*, 9(2), e00649-18.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.00649-18>
- Parkin, D. M. (2004). International variation. *Oncogene*, 23(38), 6329–6340.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207726>
- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer*, 118(12), 3030–3044.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.21731>
- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*, 118(12), 3030–3044. <https://doi.org/10.1002/ijc.21731>
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Orentreich, N., & Vogelman, H. (1997). Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection. *Gut*, 40(3), 297–301. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9135515>
- Peek, R. M. (2008). Helicobacter pylori infection and disease: from humans to animal models. *Disease Models & Mechanisms*, 1(1), 50–55. <https://doi.org/10.1242/dmm.000364>
- Piazuelo, M. B., Epplein, M., & Correa, P. (2010). Gastric Cancer: An Infectious Disease. *Infectious Disease Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.07.010>
- Pope, J. H., Horne, M. K., & Scott, W. (1968). Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *International Journal of Cancer*, 3(6), 857–866. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910030619>
- Potter, H., & Heller, R. (2003). Transfection by electroporation. *Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 9, Unit 9.3*. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0903s62>
- Price, A. M., & Luftig, M. A. (2015). To be or not IIb: a multi-step process for Epstein-Barr virus latency establishment and consequences for B cell tumorigenesis. *PLoS Pathog*, 11(3), e1004656. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004656>
- QIAGEN. (2006). Critical Factors for Successful Real-Time PCR, 64. Retrieved from [http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Critical\\_factors\\_successful\\_real\\_time\\_PCR.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Critical_factors_successful_real_time_PCR.pdf)
- Raven, P. (2014). *Biology*. McGraw-Hill Education. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=GQoEswEACAAJ>
- Reinhard Zeidler. (n.d.). Research Group Prevention and Immunomodulation. Retrieved May 15, 2018, from <https://www.helmholtz-muenchen.de/agv/research/research-groups/prevention-and-immunomodulation/projects/index.html>
- Repic, A. M., Shi, M., Scott, R. S., & Sixbey, J. W. (2010). Augmented latent membrane protein 1 expression from Epstein-Barr virus episomes with minimal terminal repeats.

- Journal of Virology*, 84(5), 2236–2244. <https://doi.org/10.1128/JVI.01972-09>
- Rhyu, M. G., Park, W. S., Jung, Y. J., Choi, S. W., & Meltzer, S. J. (1994). Allelic deletions of MCC/APC and p53 are frequent late events in human gastric carcinogenesis. *Gastroenterology*, 106(6), 1584–1588. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8194705>
- Rickinson, A. B. (2014). Co-infections, inflammation and oncogenesis: future directions for EBV research. *Semin Cancer Biol*, 26, 99–115. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.004>
- Rickinson, A. B., Rowe, M., Hart, I. J., Yao, Q. Y., Henderson, L. E., Rabin, H., & Epstein, M. A. (1984). T-cell-mediated regression of “spontaneous” and of Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation in vitro: studies with cyclosporin A. *Cellular Immunology*, 87(2), 646–658. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6088089>
- Robertson, E. S. (2005). *Epstein-Barr virus*. Caister Academic Press. Retrieved from <https://www.caister.com/ebv>
- Robertson, E. V., & Jankowski, J. A. (2008). Genetics of gastroesophageal cancer: paradigms, paradoxes, and prognostic utility. *Am J Gastroenterol*, 103(2), 443–449. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01574.x>
- Rowe, M., Rowe, D. T., Gregory, C. D., Young, L. S., Farrell, P. J., Rupani, H., & Rickinson, A. B. (1987). Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt’s lymphoma cells. *The EMBO Journal*, 6(9), 2743–2751. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2824192>
- Rundhaug, J. E., Fischer, S. M., Rundhaug, J. E., & Fischer, S. M. (2010). Molecular Mechanisms of Mouse Skin Tumor Promotion. *Cancers*, 2(2), 436–482. <https://doi.org/10.3390/cancers2020436>
- Ryan, J. L., Morgan, D. R., Dominguez, R. L., Thorne, L. B., Elmore, S. H., Mino-Kenudson, M., ... Gulley, M. L. (2009). High levels of Epstein–Barr virus DNA in latently infected gastric adenocarcinoma. *Laboratory Investigation*, 89(1), 80–90. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.103>
- Sanchez-Barriga, J. J. (2016). Mortality trends and years of potential life lost from gastric cancer in Mexico, 2000-2012. *Rev Gastroenterol Mex*, 81(2), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2016.01.002>
- Satoh, T., Fukuda, M., & Sairenji, T. (2002). Distinct patterns of mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Epstein-Barr virus gene expression in Burkitt’s lymphoma cell lines versus B lymphoblastoid cell lines. *Virus Genes*, 25(1), 15–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12206304>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18546601>
- Segal, E. D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., & Tompkins, L. S. (1999). Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by Helicobacter

- pylori. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(25), 14559–14564. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10588744>
- Shannon-Lowe, C., Adland, E., Bell, A. I., Delecluse, H.-J., Rickinson, A. B., & Rowe, M. (2009). Features Distinguishing Epstein-Barr Virus Infections of Epithelial Cells and B Cells: Viral Genome Expression, Genome Maintenance, and Genome Amplification. *Journal of Virology*, 83(15), 7749–7760. <https://doi.org/10.1128/JVI.00108-09>
- Shibata, D., & Weiss, L. M. (1992). Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *The American Journal of Pathology*, 140(4), 769–774. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1314023>
- Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2008). Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. *Semin Cancer Biol*, 18(5), 372–377. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.012>
- Sousa, H., Pinto-Correia, A. L., Medeiros, R., & Dinis-Ribeiro, M. (2008). Epstein-Barr virus is associated with gastric carcinoma: The question is what is the significance? *World Journal of Gastroenterology*, 14(27), 4347. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.4347>
- Speck, S. H., Chatila, T., & Flemington, E. (1997). Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. *Trends Microbiol*, 5(10), 399–405. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01129-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01129-3)
- Stalnikowicz, R., & Benbassat, J. (1990). Risk of gastric cancer after gastric surgery for benign disorders. *Arch Intern Med*, 150(10), 2022–2026. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2222087>
- Straus, S. E., Cohen, J. I., Tosato, G., & Meier, J. (1993). Epstein-Barr Virus Infections: Biology, Pathogenesis, and Management. *Annals of Internal Medicine*, 118(1), 45. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-118-1-199301010-00009>
- Strong, M. J., Xu, G., Coco, J., Baribault, C., Vinay, D. S., Lacey, M. R., ... Flemington, E. K. (2013). Differences in Gastric Carcinoma Microenvironment Stratify According to EBV Infection Intensity: Implications for Possible Immune Adjuvant Therapy. *PLoS Pathogens*, 9(5), e1003341. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003341>
- Sun, J., & Stetler-Stevenson, W. G. (2009). Overexpression of tissue inhibitors of metalloproteinase 2 up-regulates NF-kappaB activity in melanoma cells. *Journal of Molecular Signaling*, 4, 4. <https://doi.org/10.1186/1750-2187-4-4>
- Suzuki, M., Mimuro, H., Kiga, K., Fukumatsu, M., Ishijima, N., Morikawa, H., ... Sasakawa, C. (2009). Helicobacter pylori CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host Microbe*, 5(1), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.11.010>
- Thorley-Lawson, D. A., Hawkins, J. B., Tracy, S. I., & Shapiro, M. (2013). The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. *Curr Opin Virol*, 3(3), 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.04.005>
- Tierney, R. J., Shannon-Lowe, C. D., Fitzsimmons, L., Bell, A. I., & Rowe, M. (2015). Unexpected patterns of Epstein-Barr virus transcription revealed by a high throughput PCR array for absolute quantification of viral mRNA. *Virology*, 474, 117–130. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.10.030>



- Torres, J., Pérez-Pérez, G. I., Leal-Herrera, Y., & Muñoz, O. (1998). Infection with CagA+*Helicobacter pylori* strains as a possible predictor of risk in the development of gastric adenocarcinoma in Mexico. *International Journal of Cancer*, 78(3), 298–300. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19981029\)78:3<298::aid-ijc6>3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19981029)78:3<298::aid-ijc6>3.0.co;2-q)
- Tsurumi, T., Daikoku, T., Kurachi, R., & Nishiyama, Y. (1993). Functional interaction between Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and its accessory subunit in vitro. *Journal of Virology*, 67(12), 7648–7653. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8230484>
- Tsurumi, T., Fujita, M., & Kudoh, A. (2005). Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Reviews in Medical Virology*, 15(1), 3–15. <https://doi.org/10.1002/rmv.441>
- Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N., & Kikutani, H. (1999). Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5438), 300–303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10514374>
- Ungerleider, N., Concha, M., Lin, Z., Roberts, C., Wang, X., Cao, S., ... Flemington, E. K. (2018). The Epstein Barr virus circRNAome. *PLOS Pathogens*, 14(8), e1007206. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007206>
- Valenzuela E, J. (2004). *Helicobacter pylori*: 20 años después. *Revista Médica de Chile*, 132(11), 1339–1344. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872004001100001>
- van den Brandt, P. A., Botterweck, A. A., & Goldbohm, R. A. (2003). Salt intake, cured meat consumption, refrigerator use and stomach cancer incidence: a prospective cohort study (Netherlands). *Cancer Causes Control*, 14(5), 427–438. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12946037>
- Vockerodt, M., Yap, L.-F., Shannon-Lowe, C., Curley, H., Wei, W., Vrzalikova, K., & Murray, P. G. (2015). The Epstein–Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. *Journal of Pathology J Pathol*, 235, 312–322. <https://doi.org/10.1002/path.4459>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 10(8), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nm1087>
- Volgelstein Sur,S. & Prives, C, B. (2010). p53: The Most Frequently Altered Gene in Huan Cancer. *Nature Education*. 3(9):6.
- Wang, K., Yuen, S. T., Xu, J., Lee, S. P., Yan, H. H. N., Shi, S. T., ... Leung, S. Y. (2014). Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nature Genetics*, 46(6), 573–582. <https://doi.org/10.1038/ng.2983>
- Wang, Q., Tsao, S. W., Ooka, T., Nicholls, J. M., Cheung, H. W., Fu, S., ... Wang, X. (2006). Anti-apoptotic role of BARF1 in gastric cancer cells. *Cancer Letters*, 238(1), 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.06.023>
- Xu, H., Zhang, G.-X., Ciric, B., & Rostami, A. (2008). IDO: A double-edged sword for TH1/TH2 regulation. *Immunology Letters*, 121(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.08.008>
- Yu, X., McCarthy, P. J., Wang, Z., Gorlen, D. A., & Mertz, J. E. (2012). Shutoff of BZLF1

- gene expression is necessary for immortalization of primary B cells by Epstein-Barr virus. *Journal of Virology*, 86(15), 8086–8096. <https://doi.org/10.1128/JVI.00234-12>
- Zhao, J., Liang, Q., Cheung, K.-F., Kang, W., Lung, R. W. M., Tong, J. H. M., ... Yu, J. (2013). Genome-wide identification of Epstein-Barr virus-driven promoter methylation profiles of human genes in gastric cancer cells. *Cancer*, 119(2), 304–312. <https://doi.org/10.1002/cncr.27724>
- zur Hausen, A., Brink, A. A., Craanen, M. E., Middeldorp, J. M., Meijer, C. J., & van den Brule, A. J. (2000). Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: expression of the transforming BARTF1 gene. *Cancer Res*, 60(10), 2745–2748. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10825150>