

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVIDENCIA DE UNA POSIBLE COOPERACIÓN ENTRE LA BACTERIA
HELICOBACTER PYLORI Y EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR**
Trabajo Monográfico de Actualización

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

PRESENTA
Julián Torres Morales

Ciudad de México

2019



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Martha Patricia Coello Coutiño
VOCAL: Beatriz Ruiz Villafán
SECRETARIO: Ezequiel Moisés Fuentes Pananá
1er. SUPLENTE: Octavio Castro Escamilla
2º SUPLENTE: Genaro Jiménez Reyes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN VIROLOGÍA Y CÁNCER, HOSPITAL INFANTIL DE
MÉXICO “FEDERICO GÓMEZ”**

ASESOR DEL TEMA
Dr. Ezequiel M. Fuentes Pananá

SUPERVISOR TÉCNICO:
Dra. María Isabel Tussié Luna

SUSTENTANTE:
Julián Torres Morales

ÍNDICE

1. Epidemiología	1
2. Cáncer asociado a agentes infecciosos	2
3. Biología del cáncer	4
4. El cáncer gástrico	8
4.1. Factores de riesgo del cáncer gástrico	11
5. Generalidades de <i>Helicobacter pylori</i>	12
6. Mecanismos oncogénicos de <i>Helicobacter pylori</i>	13
7. El Virus de Epstein-Barr	16
8. Mecanismos oncogénicos de EBV	25
9. Evidencia de cooperación entre <i>Helicobacter pylori</i> y EBV en la generación de cáncer gástrico	26
10. Conclusiones	30
11. Referencias	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características generales del cáncer	7
Figura 2. Secuencia de Correa	9
Figura 3. Anatomía del estómago y localización principal del cáncer asociado a <i>Helicobacter pylori</i> y a EBV	11
Figura 4. Proceso de infección y persistencia de EBV	19
Figura 5. Análisis pangénomico de 109 genomas de EBV	22
Figura 6. Análisis filogenómico de 15 genes <i>core</i> de 109 genomas de EBV	24
Figura 7. EBV y <i>Helicobacter pylori</i> inducen lesiones una inflamación más severa	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer a nivel internacional	1
Tabla 2. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en México	2
Tabla 3. Resumen de agentes infecciosos asociados con cáncer	4
Tabla 4. Comparación de la clasificación de Lauren y de la OMS para cáncer gástrico .	10
Tabla 5. Clasificación de <i>Helicobacter pylori</i> en función de la isla de patogenicidad que presentan	14

ABREVIATURAS

CG, cáncer gástrico

EBV, Virus de Epstein-Barr

CGaEBV, cáncer gástrico asociado al Virus de Epstein-Barr

CGaHp, cáncer gástrico asociado a *Helicobacter pylori*

T4SS, sistema de secreción tipo 4

1. Epidemiología

El cáncer es un problema de salud público a nivel mundial. De acuerdo con el organismo encargado de generar recursos estadísticos sobre el cáncer (GLOBOCAN), en 2018 se registraron 18.1 millones de casos nuevos de cáncer y 9.6 millones de muertes debido a este padecimiento (ver Tabla 1) ¹⁻³.

Tipo de Cáncer (sitio)	Incidencia (no. casos nuevos)	Mortalidad (no. decesos)	Incidencia (%)	Mortalidad (%)	Posición (Incidencia)	Posición (Mortalidad)
Pulmón	2,093,876	1,761,007	11.6	18.4	1	1
Mama	2,088,849	626,679	11.6	6.6	2	4
Próstata	1,276,106	358,989	7.1	3.8	3	8
Colon	1,096,601	551,269	6.1	5.8	4	5
Piel(no-melanoma)	1,042,056	65,155	5.8	0.7	5	13
Gástrico	1,033,701	782,685	5.7	8.2	6	2
Hígado	841,080	781,631	4.7	8.2	7	3
Recto	704,376	310,394	3.9	3.2	8	10
Esófago	572,034	508,585	3.2	5.3	9	6
Cervico y útero	569,847	311,365	3.2	3.3	10	9
Tiroide	567,233	41,071	3.1	0.4	11	14
Vejiga	549,393	199,922	3.0	2.1	12	12
Linfomas (no Hodgkin)	509,590	248,724	2.8	2.6	13	11
Páncreas	458,918	432,242	2.5	4.5	14	7
Otros	4,675,297	2,575,309	25.9	27.0	NA	NA
Todos	18,078,957	9,555,027	100.0	100.0	NA	NA

Tabla 1. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer a nivel internacional. Tomado de Bray Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *Cancer Journal for Clinicians*, 2018; 0:1-3

De todos los tipos de cáncer, 14 sitios anatómicos engloban ~75 % de los nuevos casos de cáncer registrados (Tabla 1.). Dentro de éstos destacan: pulmón (11.6%), mama (11.6%), próstata (7.1%), colon (6.1%), piel (5.8%), gástrico (5.7%) e hígado (4.7%). Por otro lado, cuando se considera la mortalidad (número de decesos), las neoplasias con mayor número de decesos son: pulmón (18.4%), gástrico (8.2%), hígado (8.2%), mama (6.6%), colon (5.8%) y esófago (5.3%). En México, el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia seguido por páncreas, cervicouterino, colorectal, pulmón, gástrico e hígado. Los de mayor mortalidad son: pulmón, páncreas, gástrico e hígado (Tabla 2) ¹⁻³.

Tipo de Cáncer (sitio)	Incidencia (%)	Mortalidad (%)	Incidencia (Posición)	Mortalidad (Posición)
Mama	13.8	7.2	1	5
Páncreas	9.5	8.1	2	2
Cervicouterino	9.4	6.1	3	6
Colorecto	5.8	6	4	7
Pulmón	5.7	9.7	5	1
Gástrico	5.2	8	6	3
Hígado	4.3	7.7	7	4
Otros	46.3	47.2	NA	NA

Tabla 2. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en México. Tomado de Gómez-Dantés H et al. The burden of cancer in Mexico, 1990-2013. Salud Pública de México 58-2: 2016.

2. Cáncer asociado a agentes infecciosos

Se estima que el cáncer atribuible a agentes infecciosos corresponde a un sexto del total de casos nuevos de cáncer, y dentro de este grupo, se calcula que el 80% provienen de países no desarrollados ⁴.

Dentro de los agentes infecciosos asociados con neoplasias se encuentran los parásitos: *Schistosoma hematobium* y *Opisthorchis viverrini*, cuya infección se asocia a un riesgo

incrementado de adquirir cáncer de vejiga y colangiocarcinoma, respectivamente. La bacteria *Helicobacter pylori* se ha asociado con cáncer gástrico (CG). El grupo más diverso está conformado por los virus, donde se encuentra el virus del papiloma humano o HPV, asociado a cáncer cervicouterino; los virus de la hepatitis humana B (HBV) y C (HCV), asociados a cáncer hepático; el virus linfotrópico de células T humanas o HTLV-1, asociado a leucemias/linfoma de células T; el poliomavirus de células de Merkel o MCPyV, asociado a Sarcoma de células de Merkel; el herpesvirus humano 8 (HHV8), también conocido como virus del sarcoma de Kaposi (KSV), asociado a sarcoma de Kaposi, y el herpesvirus humano 4 (HHV4) o virus de Epstein-Barr (EBV), asociado a Linfoma de Burkitt, Linfoma de Hodgkin, cáncer nasofaríngeo y CG ^{5,6}. Se estima que más del 90% de los casos de cáncer por infecciones se deben a los siguientes agentes infecciosos: HBV, HCV, HPV y *H. pylori* (Tabla 3.).

Agente infeccioso	Neoplasia asociada
<i>Helicobacter pylori</i>	Cáncer gástrico
Virus del papiloma Humano (HPV) tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Cáncer cervicouterino orofaríngeo, vaginal, vulvar, y de pene
Virus de hepatitis B y C (HBV y HCV)	Cáncer hepático
Herpesvirus humano 4 ó virus de Epstein Barr (HHV-4 ó EBV)	Linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgking, cáncer nasofaríngeo y cáncer gástrico
Herpesvirus humano 8 ó virus de sarcoma de Kaposi (HHV-8 ó KSV)	Sarcoma de Kaposi
<i>Schistosoma hematobium</i>	Cáncer de vejiga
Virus linfotrópico de células T humano (HTLV) tipo 1	Leucemias y linfomas de células T
<i>Clonorchis sinensis</i> y <i>Opisthorchis viverrini</i>	Colangiocarcinoma
Poliomavirus de células de Merkel (MCPyV)	Sarcoma de células de Merkel
Virus de inmunodeficiencia humana (HIV) tipo 1	Sarcoma de Kaposi, linfomas, cáncer cervicouterino, hepático, pulmonar, y anal.

Tabla 3. Resumen de agentes infecciosos asociados con cáncer (ordenado por importancia). La mayoría de estos agentes infecciosos no cuentan con una vacuna; su transmisión es muy eficiente y el órgano blanco es de difícil acceso. Tomada de *National Institute of Cancer* de Estados Unidos de América.

3. Biología del cáncer

El cáncer es un conjunto de patrones genéticos, moleculares y celulares anormales que se manifiestan como una proliferación celular descontrolada. De acuerdo con el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos de América (NIC) existen más de 100 tipos de cáncer ⁷.

Desde el punto de vista fisiológico, todas las células cumplen con el ciclo celular manteniendo un equilibrio entre el número de células vivas y muertas. En organismos eucariotas pluricelulares, como los seres humanos, este proceso se encuentra estrictamente regulado por mecanismos intra- y extra- celulares, que se ven desregulados en el cáncer (Figura 1.).

Existen genes que codifican para proteínas que controlan el ciclo celular; dependiendo de su función se les denomina genes supresores de tumores u oncogenes. Los primeros codifican para proteínas que, cuando son traducidas, inhiben el ciclo celular; por el contrario, los oncogenes codifican para proteínas que activan el ciclo celular. De manera importante, para inactivar a genes supresores de tumores se requieren mutar, silenciar o eliminar ambos alelos del gen, mientras que, los oncogenes requieren solamente la mutación de uno de sus alelos. Algunos ejemplos clásicos de genes supresores de tumores son *TP53* y *RB*. Y, algunos ejemplos de oncogenes son *HRAS* y *KRAS* que codifican para GTPasa c-Ras, *c-MYC* que codifica para el factor de transcripción c-Myc, y *ErbB* que codifica para el receptor de tirosina cinasa ErbB. Mutaciones en estos genes han sido asociadas con diversos tipos de cáncer, por ejemplo, retinoblastoma la inactivación de los alelos de *RB* con retinoblastoma o mutaciones en *KRAS* con cáncer de pulmón ^{8,9}.

Cuando hay daño en el ADN, éste es reconocido por diversos mecanismos que detienen el ciclo celular activando mecanismos de reparación. Las más conocidas son: reversión (mediada por la O⁶-metilguaninil-ADN metiltransferasa – MGMT – que revierte la alquilación del ADN), la escisión de bases (por lo general repara bases oxidadas), reparación por *mismatch* (remueve bases oxidadas, metiladas, deaminadas o introducidas por error durante la replicación), reparación del rompimiento de las dos

cadena de ADN (recombinación homóloga o recombinación por unión de extremos no homólogos ^{10,11}).

El sistema inmunológico tiene un papel preponderante en la identificación y destrucción de las células tumorales. Una de sus funciones es destruir células que hayan sufrido algún daño a través de la inducción de apoptosis. La apoptosis puede ser inducida por la misma célula cuando hay desacoplamiento de la cadena respiratoria en la mitocondria o por la inducción del sistema inmunológico (interacción ligando-receptor; Fas-FasL ó $TNF\alpha$ – receptor $TNF\alpha$). Ambos casos convergen en una serie de eventos proteolíticos realizados por proteasas llamadas caspasas; su nombre se debe a que tiene una actividad de cisteína-proteasa ¹².

Las células constantemente degradan las proteínas que sintetizan mediante el proteosoma, los péptidos resultantes son expuestos al sistema inmune para que sean reconocidos como propios. Cuando hay una infección o cuando se sintetizan péptidos que no deberían ser producidos por ese tipo de célula, los péptidos generados son identificados como no propios y la célula es destruida. Algunos virus han logrado contrarrestar la destrucción de la célula hospedero; por ejemplo, EBV modifica la expresión de genes pasando de aquellos asociados a un estado lítico a los asociados con un estado de latencia. Uno de los genes que interfiere con la respuesta inmune innata es BZLF1, cuya expresión inhibe a NF- κ B (factor transcripcional que desencadena una respuesta inflamatoria) durante el estado lítico. Por otro lado, en el estado de latencia de EBV BZLF1 se expresa poco permitiendo que NF- κ B induzca una respuesta inflamatoria. EBV induce una potente respuesta adaptativa, para contender con ella, se oculta en linfocitos B de memoria apagando la expresión de sus genes. Durante el estado lítico induce la degradación del ARNm de HLA-1 mediante la expresión de BGLF5 ¹³.

Además, el sistema inmune es el encargado de regular la inflamación. Una inflamación crónica es considerada patogénica y es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de algunos tipos de cáncer como el gástrico.

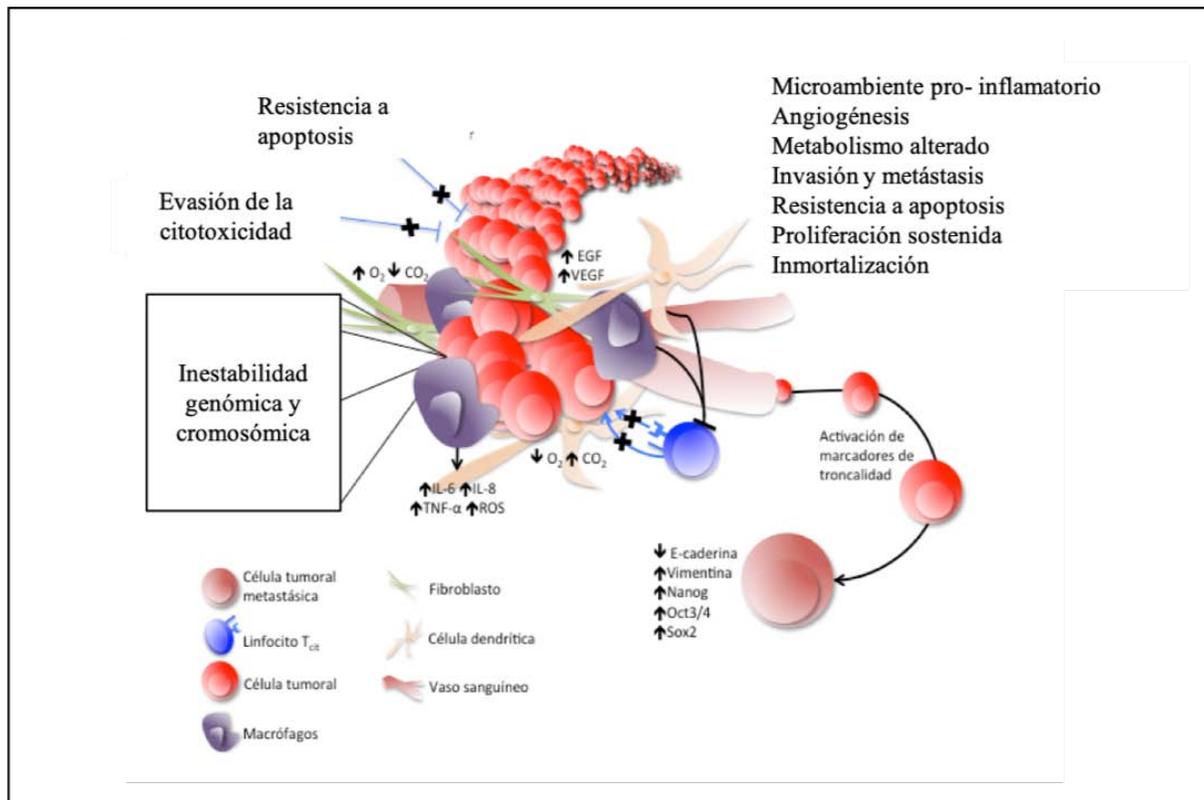


Figura 1. Características generales del cáncer. Resumen de las características más importantes del cáncer: Resistencia a apoptosis, evasión de la citotoxicidad, microambiente proinflamatorio, transición epitelio-mesénquimo; se incluyen células que son utilizadas por el tumor para su mantenimiento, persistencia y /o metástasis como los macrófagos.

Información tomada de: Hanahan D and Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. Cell: 144: 646–674, 2011

La transición epitelio-mesénquima es el proceso por el cual una célula epitelial polarizada que interactúa con una membrana basal pierde estas propiedades y se comporta como célula mesenquimal. Las células que han pasado por este proceso adquieren la capacidad de migrar, invadir, resistir a la apoptosis, producir componentes de la matriz extracelular y producir proteasas de la matriz extracelular ^{14,15}.

4. El cáncer gástrico

En 2018, el CG ocupó el sexto lugar en incidencia y segundo en mortalidad a nivel mundial; 1,033,701 (5.7%) y 782,685 (8.2%), respectivamente. En México el CG ocupa el sexto (Tabla 2) lugar en incidencia y el tercero en mortalidad y se estima que en nuestro país más de 6000 personas mueren anualmente debido a este padecimiento ^{1,2,16}.

El CG es un tipo de neoplasia que se presenta en el estómago, entre el 90-95% de éstos son adenocarcinomas, es decir, provienen de las estructuras glandulares de células epiteliales. Los otros tipos de CG son: el linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (linfoma tipo MALT), el tumor gástrico de la célula del estroma, el tumor de tipo carcinoide, y el leiomiosarcoma que surge de tejidos blandos como el músculo liso, entre otros. Con fines prácticos y debido a su alta representatividad, cuando se habla de CG se refiere al adenocarcinoma y los otros tipos se mencionan por su tipo específico ¹⁷.

Existen múltiples clasificaciones del CG, la más utilizada es la histológica ó de Lauren (Tabla 4). En esta clasificación el CG se divide en 3 tipos: intestinal, difuso e indeterminado ¹⁸. El CG-intestinal se presenta en las glándulas del estómago y se caracteriza por un engrosamiento de la pared del estómago y es asociado a la presencia de *H. pylori*. Se ha propuesto que el CG de tipo intestinal sigue una serie de cambios histopatológicos denominadas en su conjunto como la secuencia de Correa. Las etapas de la secuencia de Correa son las siguientes: gastritis superficial, gastritis atrófica, gastritis multifocal atrófica, metaplasia intestinal, displasia y cáncer (Figura. 2)¹⁹. Por otro lado, el CG-difuso se caracteriza porque las células epiteliales pierden cohesión y estimulan el crecimiento de tejido conectivo. El CG-difuso puede ser hereditario o esporádico. El CG tipo difuso-esporádico ocurre de manera espontánea y se desconoce su etiología. El CG-difuso hereditario ha sido asociado a mutaciones que regulan negativamente al gen *CDH1*. Este gen codifica para la proteína transmembranal de adhesión dependiente de calcio, E-Cadherina, la cual es un supresor de tumores encargado de inhibir la proliferación celular mediante contacto célula-célula y regular la

polarización celular. La pérdida de heterocigocidad (LOH) en ambos alelos o la pérdida de un alelo y la metilación del promotor del otro alelo o la regulación negativa por micro RNA's (miRNAs), son los mecanismos asociados a la pérdida de función de *CDH1*. Además, en pacientes con CG-difuso hereditario no asociado a mutaciones en *CDH1*, se han identificado mutaciones en genes involucrados en la reparación al ADN por recombinación: *PALB2*, *BRCA1*, y *RAD51C* ²⁰⁻²².

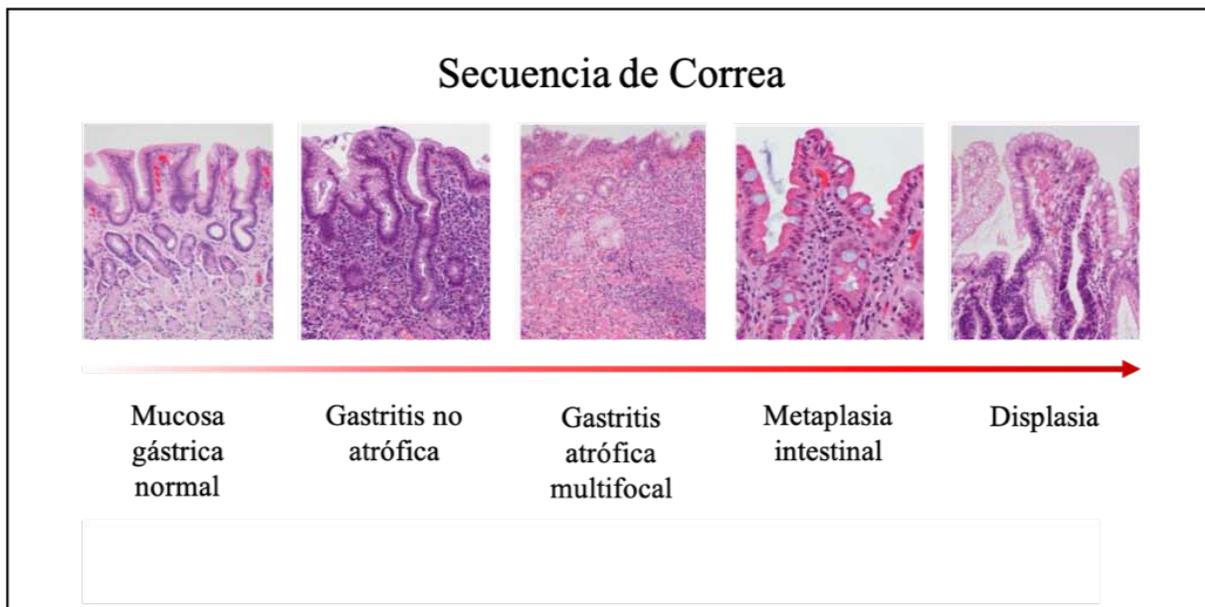


Figura 2. Secuencia de Correa. Representación de la evolución histológica del cáncer gástrico de tipo intestinal conocida como secuencia de Correa. La flecha roja indica que con el paso del tiempo la gravedad de la lesión incrementa.

Modificado de: Piazzuelo M and Correa P: Gastric cancer: overview. Colomb Med 44: 192-201, 2013.

Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica al CG en 5 grupos en función del patrón histológico: tubular, papilar, mucinoso, poco cohesivo (carcinoma de células en forma de anillo) y mixto (otros tipos de CG) (Tabla 4.). Los primero tres corresponden al CG-intestinal de la clasificación de Lauren, el poco cohesivo al CG-difuso y el mixto al indeterminado, respectivamente ²³. Esto muestra la complejidad y la necesidad de una homogeneizar la clasificación del CG.

Lauren	OMS
Intestinal	Papilar Tubular Mucinoso
Difuso	Carcinoma de células en forma de anillo
Indeterminado	Mixto

Tabla 4. Comparación de la clasificación de Lauren y de la OMS para cáncer gástrico. A pesar de que existe una clasificación por parte de la OMS, en muchos estudios se sigue utilizando la clasificación de Lauren principalmente.

La región anatómica también es empleada para clasificar al CG ¹⁸. Por ejemplo, el CG asociado a *H. pylori* (CGaHp) prevalece en la región del antro (zona precedente al píloro) y del cuerpo; aunque esta región también está ligada a un componente hereditario. Mientras que, la región de la cardia está asociada con EBV (EBVaCG) (Figura 3.). La presencia de *H. pylori* en el antro ha sido relacionada con el ambiente ácido (pH ~2) de esta región y una potente ureasa que le permite sobrevivir en esas condiciones, además, su crecimiento se ve mermado en condiciones alcalinas pH > 8. ²⁴⁻²⁶.

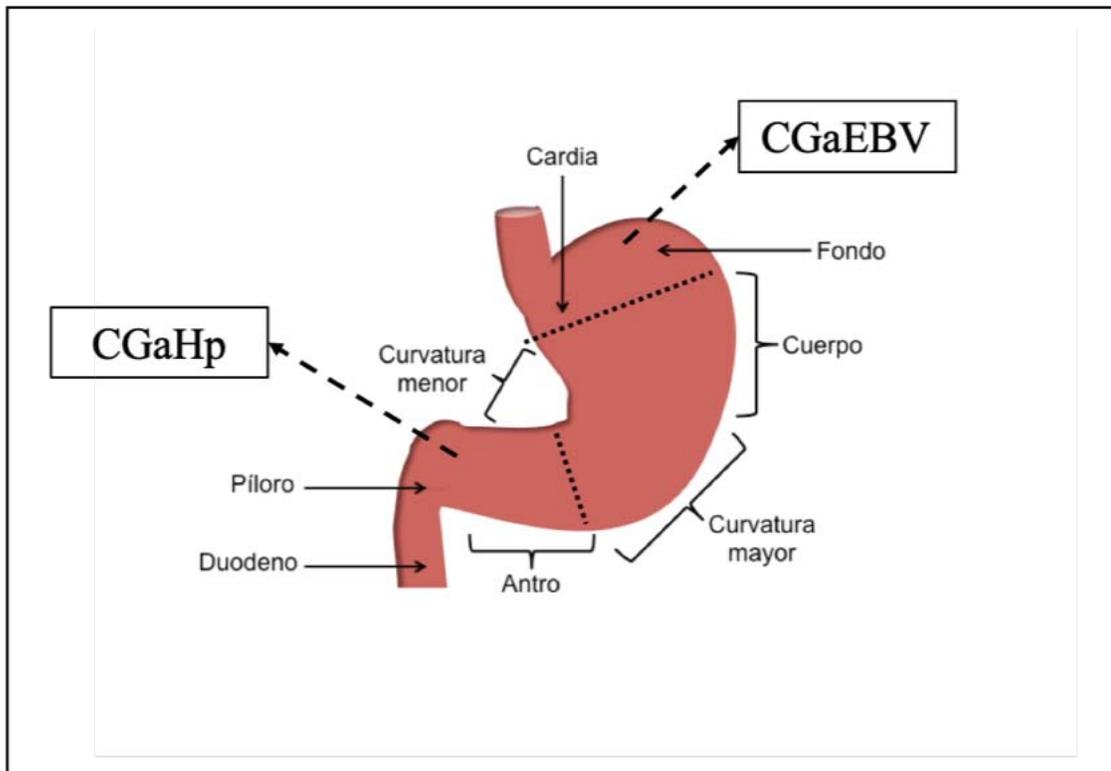


Figura 3. Anatomía del estómago y localización principal del cáncer asociado a *Helicobacter pylori* y a EBV. El cáncer gástrico asociado a EBV es más frecuente en la región de la cardia, mientras que, el asociado a *Helicobacter pylori* tiene mayor frecuencia en la curvatura menor y cerca del píloro.

Información tomada de: Bing Hu et al.: Gastric cancer: classification, histology and application of molecular pathology. *Journal of Gastrointestinal Oncology*: 3, 241- 247, 2012.

4.1 Factores de riesgo del cáncer gástrico

Se han descrito múltiples factores de riesgo para desarrollar CG ²⁷. Éstos pueden clasificarse en:

- a) Distribución geográfica: Vivir en lugares hacinados, propio de países en vías de desarrollo, al igual que, vivir en países o regiones donde el CG es endémico. Por ejemplo, en general los lugares donde hay hacinamiento presentan una mala calidad de higiene facilitando la transmisión de *H. pylori* por vía oro-fecal. El

endemismo de CG puede estar relacionado con factores genéticos de *H. pylori*, EBV, del hospedero o de otros factores como la altitud de la zona ²⁸.

- b) Ambientales asociados al estilo de vida. Como son tener una dieta alta en sales y baja en frutas y verduras. El consumo de alcohol y fumar son considerados factores de riesgo moderados. El impacto que tienen estos factores solo ha sido medido epidemiológicamente y han sido asociados con distintos tipos de cáncer, pero no se ha encontrado una relación directa en la promoción del CG, es probable que los vegetales contribuyan con antioxidantes previniendo el daño al ADN ²⁹.
- c) Propios del hospedero. El riesgo incrementa con la edad. El sexo; es más prevalente en hombres que en mujeres. Ciertas poblaciones presentan un mayor riesgo, como la asiática. Mutaciones en ciertos genes como *CDH1* o en sus reguladores son biomarcadores, al igual que algunos miRNAs. De llamar la atención, es la muy baja frecuencia (menos del 5%) a nivel mundial de CG hereditario; caso contrario al de otros tipos de cáncer. Sugiriendo que, en el caso particular de CG, los componentes ambientales e infecciosos tienen un mayor impacto ^{20-22,30}.
- d) Agentes Infecciosos. De acuerdo con la OMS, el CG tiene como principal agente etiológico la inflamación inducida por la bacteria *H. pylori*. Además, EBV ha sido asociado con el 9-10% de todos los casos de CG ⁵.

5. Generalidades de *Helicobacter pylori*

Desde 1899, Pieter Klazes Pel, describió la presencia de una “*bacteria espiral*” (espiroqueta) en cortes de estómago. Fue hasta 1982 que Warren y Marshall identifican y asocian a *H. pylori* en pacientes con gastritis y úlcera gástrica. Posteriormente se convertiría en la primera bacteria reconocida como carcinógeno tipo I por la IARC. Algunos estudios han estimado que el 50% de la población mundial está colonizada por *H. pylori* y el 1-3% de las personas infectadas desarrollaran CG ³¹⁻³³.

H. pylori es una bacteria flagelada Gram negativa que coloniza el estómago. La capacidad para soportar el pH ácido del estómago se le atribuye a una potente ureasa, la cual, cataliza la producción de dióxido de carbono y amoníaco a partir de urea. Los protones presentes en el estómago son acoplados al amoníaco produciendo amonio y aumentando el pH. Asimismo, el amonio actúa como agente reductor de la viscosidad permitiendo una mejor movilidad de la bacteria a través del moco gástrico. Una vez que *H. pylori* atraviesa el moco gástrico, se une a células epiteliales a través de sus adhesinas SabA y BabA, las cuales se unen fuertemente al antígeno A del grupo sanguíneo y al ácido siálico, respectivamente, presentes en las células epiteliales. Otros factores de virulencia son una citotoxina vacuolizante (Vac), lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano, así como una tasa de mutación alta que le permite evadir al sistema inmunológico³⁴⁻³⁶.

6. Mecanismos oncogénicos de *Helicobacter pylori*

Existen diversas cepas de *H. pylori* caracterizadas por la presencia o ausencia de toda o una fracción de una isla de patogenicidad, denominada isla de patogenicidad de Cag (HpcagPAI+ / HpcagPAI-). Esta isla de 40 kbs codifica para un sistema de secreción tipo 4 (T4SS) y en algunos casos para una oncoproteína; CagA (proteína citotóxica asociada al gen A). Estas cepas se identifican como “HpcagPAI+CagA+” o “HpcagPAI+ CagA-”. Todas las cepas HpcagPAI+ CagA+ tienen la isla cagPAI, por lo cual, simplemente se identifican como HpcagCagA+ (ver Tabla 5). Estudios epidemiológicos soportan que la presencia de *H. pylori* junto con sus factores de riesgo como el T4SS y CagA incrementan el riesgo de desarrollar CG³⁷⁻⁴⁰.

El T4SS de *H. pylori* es un conjunto de ~30 proteínas que son ensambladas formando una estructura semejante al de una jeringa. Este sistema es homólogo al de *Agrobacterium tumefaciens*. Sin embargo, a diferencia del de *A. tumefaciens*, el T4SS de *H. pylori* pareciera no translocar material genético sino proteínas al interior de la célula hospedera. Una de las proteínas translocadas es la oncoproteína CagA cuya vida media es de 200 minutos, relativamente baja si la comparamos con otras toxinas de bacterias como la de *Vibrio cholera* que tiene una vida media 120 minutos.^{37,41-43}

<i>cagPAI</i>	T4SS	CagA	Identificación	Riesgo CG	Virulencia
Ausente	Ausente	Ausente	Hp <i>cagPAI</i> -	Menor	Inflamación
Presente	Presente	Ausente	Hp <i>cagPAI</i> +CagA-	Intermedio	Inflamación elevada
Presente	Presente	Presente	Hp <i>cagPAI</i> +CagA+	Mayor	Inflamación elevada Oncogenicidad directa

Tabla 5. Clasificación de *Helicobacter pylori* en función de la isla de patogenicidad que presentan. *H. pylori* puede tener o no isla de patogenicidad (*cagPAI*+/-). Cuando tiene la isla puede tener o no al oncogen *CagA* (*CagA*+/-). Las cepas de HpCagA+ son las más virulentas.

Desde una perspectiva molecular, CagA es una proteína de ~120kDa con residuos EPIYA (ácido glutámico-prolina-isoleucina-tirosina-alanina) en el carboxilo terminal. Tiene una vida media de ~2-3 horas y su cristalización fue lograda en 2012. Los residuos EPIYA son susceptibles a fosforilación por las cinasas c-Src y c-Abl (CagA-P) y se han identificado 4 motivos EPIYA (A, B, C y D). Los motivos A y B son genéricos, mientras que el C es más común en cepas occidentales y las D en orientales. El número de motivos puede ser variable y algunos estudios sugieren que a mayor número de motivos D, mayor riesgo con cáncer. CagA-P es reconocida por proteínas con dominios SH2 (Src homology 2) como SHP2, Csk, PI3K, etc. regulando diversas vías celulares involucradas en motilidad y proliferación. Por ejemplo, c-Src es capaz de activar al factor transcripcional pro- inflamatorio NF- κ B a través de la fosforilación de la cinasa- β de I- κ B (IKK β), también puede activar Akt y la vía de las MAPK (mitogen-activated protein kinases) y de ERK (extracelular signaling-regulated kinase) ^{39,44-47}. Sin embargo, esto sigue siendo controversial ^{48,49}.

Además, la oncogenicidad de *H. pylori* ha sido evidenciada por diversos estudios; Watanabe et al. en 1998 infectaron gerbos con *H. pylori* y observaron la aparición de tumores y pólipos gástricos, mientras que, Ohnishi et al. en 2008 generaron ratones

transgénicos que expresaban CagA y observaron los cambios histopatológicos en el estómago del ratón; como el engrosamiento del tejido y una alta proliferación celular^{50,51}. Además, pacientes con metaplasia, infectados por *H. pylori* y tratados con antibióticos mostraron una regresión de la metaplasia indicando que la erradicación de *H. pylori* previene el CG^{52,53}. Se cree que *H. pylori* desaparece conforme avanza el proceso neoplásico y desaparece cuando ya es cáncer. Sin embargo, recientemente, algunos estudios de secuenciación basada en sondas (gen 16S rRNA) sugieren que la carga de *H. pylori* no disminuye, siendo un punto de controversia en los últimos años⁵⁴.

In vitro, en células AGS, se ha observado que la internalización (traslocación) de peptidoglicano de las bacterias a las células AGS es dependiente de HpCagPAI+⁵⁵. El peptidoglicano translocado tiene la capacidad de activar a Nod1 que a su vez quita la represión de NF- κ B induciendo la secreción de la interleucina pro-inflamatoria 8 (IL-8). Además, la infección de HpCagA+ induce un cambio morfológico en el cual las células se alargan, fenómeno llamado fenotipo colibrí. Este cambio morfológico se debe a que CagA-P activa a la fosfatasa SHP2 la cual de-fosforila a FAK (focal adhesión kinase) induciendo el cambio morfológico^{56,57}.

Por otro lado, la CagA no fosforilada se localiza en la pared de la membrana interna de la célula, ahí es capaz de interactuar con proteínas de membrana como E-Cadherina y β -catenina. En resumen, una vez dentro de la célula hospedero (CagA es fosforilada por cinasas de la familia de c-Src y c-Abl en los motivos EPIYA). CagA-P es capaz de señalar a través de diversas vías celulares. Es por todo esto que, la oncogenicidad de *H. pylori* se da a dos niveles; el primero es por la promoción de una fuerte inflamación crónica mantenida por la incapacidad del hospedero de eliminar dicha infección; y la segunda, a través de la desregulación de vías de señalización celulares involucradas en la proliferación, la resistencia a la apoptosis y la motilidad celular⁵⁸⁻⁶⁰.

7. El Virus de Epstein-Barr

El virus de Epstein-Barr ó Herpesvirus Humano 4 (EBV) es un herpesvirus que tiene tropismo por linfocitos B. EBV fue descrito por primera vez por Anthony Epstein e Yvonne Barr en pacientes con linfoma de Burkitt en 1964. La capacidad de transformar a los linfocitos B, su asociación con mononucleosis infecciosa y su presencia en otros linfomas, como el de Hodgkin, llevaron a reconocer a EBV como el primer virus oncogénico por la IARC ⁶¹.

Se estima que más del 90% de la población mundial esta infectada por EBV. Esta infección transcurre durante los primeros años de vida y permanece durante toda la vida del hospedero. La infección ocurre durante los primeros años de vida de las personas; sin embargo, en países desarrollados se ha observado un incremento en la edad a la cual ocurre la infección. Esto ha sido asociado a casos de mononucleosis infecciosa más severa, pues entre mayor edad tenga la persona cuando se infecta por EBV, los síntomas son más severos ⁶².

Similar a *H. pylori*, la infección por EBV permanece asintomática en la mayoría de las personas, sin embargo, en algunos casos EBV se reactiva y puede ocasionar algunas enfermedades. La infección por EBV consta de varias etapas, la primera es la transmisión, ésta se da a través de secreciones corporales, principalmente a través de la saliva. Se propone que EBV atraviesa el epitelio de la cavidad oral, ya sea entre las uniones estrechas, o bien, directamente atravesando las células del epitelio, infectando a los linfocitos B circulantes. Los linfocitos B infectados se dirigen a ciertas zonas llamadas centro germinal que se encuentran dentro de los órganos linfoides secundarios como los nodos linfáticos, en donde ocurren dos procesos: el primero es la expansión clonal de los linfocitos B infectados. La expansión clonal es controlada por linfocitos T CD8+. En el futuro, estos linfocitos T CD8+ serán los encargados de controlar las reactivaciones de EBV (la inducción de ciclo lítico y liberación de partículas virales). El segundo proceso que ocurre en centro germinal es la diferenciación del linfocito B hacia linfocito B de memoria infectado, pero con expresión nula o casi nula de los genes de

EBV (latencia I/0). EBV perdurará toda la vida del hospedero en los linfocitos B de memoria. La inmunosupresión, las señales del receptor de antígeno y algunos agentes químicos como ácidos grasos de cadena corta – como el ac. butírico - son reactivadores de EBV. Se cree que un proceso inflamatorio también puede reactivar a EBV ⁶³.

EBV, como todos los virus tienen dos estados: latencia y lítico. El estado lítico le permite a los virus su propagación a nuevos hospederos, mientras que, el estado de latencia asegura su persistencia en el hospedero. Estos dos estados están altamente regulados en EBV y, en condiciones normales permanece en estado latente durante la vida del hospedero sin causarle daño ¹².

Durante la infección primaria o primera infección, EBV infecta linfocitos B circulantes, donde ocurren dos procesos. El primero es la replicación del virus y su liberación (fase lítica) a torrente sanguíneo infectando más linfocitos B. Esta fase es regularmente controlada por linfocitos T. Durante este control, se activa la respuesta adaptativa generando linfocitos T CD8+ y linfocitos B de memoria. El segundo proceso se da en centro germinal donde se lleva a cabo diferenciación de los linfocitos B en los linfocitos B de memoria. Algunos de estos linfocitos contienen a EBV permitiéndole ocultarse de la respuesta inmune y persistir en el hospedero. Como se mencionó anteriormente, durante la diferenciación del linfocito B, EBV modifica su patrón de expresión génica, disminuyéndola. A la llegada a centro germinal, EBV presenta un patrón de expresión llamado latencia III y conforme se diferencia en linfocito B de memoria llegará a latencia 0, esta última latencia se caracteriza por tener apagado todo el sistema de transcripción. De acuerdo con la teoría del centro germinal, cuando EBV infecta a los linfocitos B naive, el virus es capaz de guiar al linfocito B a la reacción de centro germinal, donde el virus modifica su perfil de expresión dependiendo de si se encuentra en estado de centroblasto o centrocito y dando origen a los diferentes patrones de expresión o latencia. Interesantemente, la latencia es controlada por la metilación de sus promotores y se sabe que es un mecanismo de silenciamiento génico. Esto sugiere que las latencias de EBV y por consecuencia, su oncogenicidad, estarían controladas de manera epigenética ^{12,63,64}. Las expansiones clonales que ocurren post-infección como centroblastos son

controladas por linfocitos T CD8+, estos destruyen a los centroblastos previniendo su duplicación. Finalmente, los linfocitos B infectados emergen como células de memoria, que se cree viven por toda la vida del hospedero (Figura 4.). En individuos inmunosuprimidos o inmunocromprometidos se ha visto que tanto la reactivación viral como la expansión de clonas infectadas se ve aumentada, lo que incrementa el riesgo de que desarrollen linfomas.

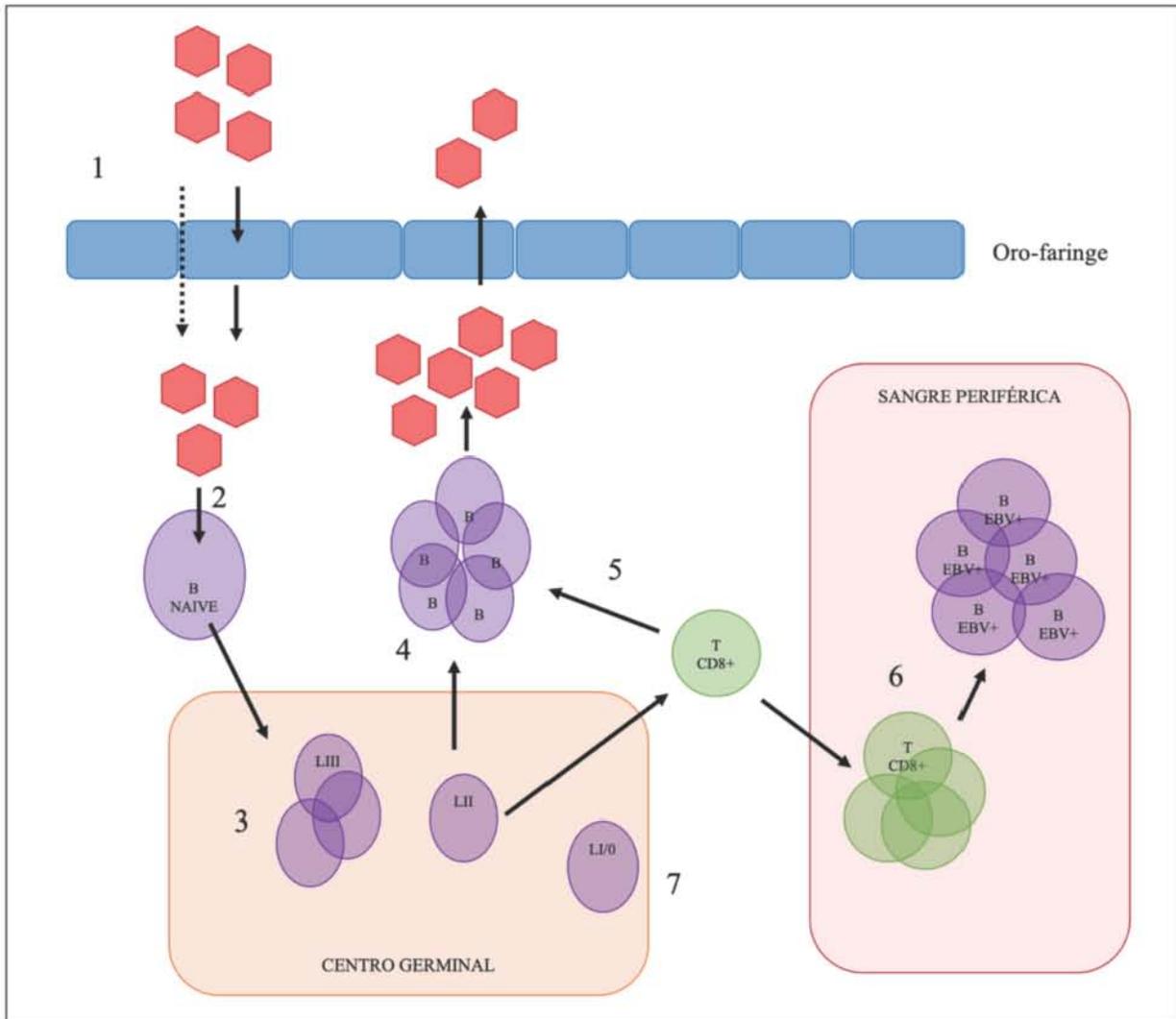


Figura 4. Proceso de infección y persistencia de EBV. 1) EBV ingresa al hospedero a través de las células epiteliales de la oro-faringe, 2) EBV infecta linfocitos B circulantes naive, 3) los linfocitos B infectados se dirigen a centro germinal donde algunos maduran y otros se van a linfocitos B de memoria, 4) algunos linfocitos B se diferencian y sufren expansión clonal activando a EBV y liberando partículas virales, 5) linfocitos T controlan la expansión clonal, 6) linfocitos T se diferencian y controlan la reactivación de EBV 7) EBV persiste en linfocitos B de memoria apagando sus genes (latencia 1/0).

Información tomada de: Tao Q et al.: Epstein-Barr virus (EBV) and its associated human cancers - Genetics, epigenetics, pathobiology and novel therapeutics. Front Biosci 11: 2672 – 2713, 2006.

EBV ha sido asociado a diversas neoplasias, entre ellas están algunos adenocarcinomas como el cáncer nasofaríngeo y el gástrico, además de linfomas. Se desconoce si la presencia de EBV en células epiteliales es parte de su tropismo natural y es un sitio de persistencia viral como en los linfocitos B, o si es exclusivamente un tejido transitorio que le facilita al virus diseminarse entre hospederos ⁶⁵. La ocurrencia de adenocarcinomas asociados al virus apoya la primera idea.

La detección de EBV puede realizarse por distintos métodos. Dentro de los más utilizados están los inmunoquímicos, la cuantificación de partículas virales y, en el caso de neoplasias, la hibridación *in situ* de los ARN pequeños codificados por el virus de Epstein Barr (EBERs), esta última es considerada el estándar de oro para tejidos ⁶⁶⁻⁶⁸.

Existen dos genotipos, EBV-1 y EBV-2 que difieren en la composición de nucleótidos y en la predicción de genes (64 y 53%, respectivamente) del antígeno nuclear de EBV (EBNA-3A, EBNA-3B y EBNA-3C) ⁶⁹.

En cuanto a la diversidad genómica de EBV, existen pocos estudios ya que la mayoría se basan en la comparación de solo algunos genes. En 2014, Santpere G et al. reportaron la identificación de 10 genomas de EBV y la reconstrucción, casi completa de 3, a partir del proyecto de los 1000 genomas. Este trabajo muestra la complejidad y dificultad de obtener genomas virales naturales ⁷⁰. Además, se ha intentado explicar la patogenicidad de EBV mediante estudios de filogeografía. EBV-1 es el de mayor distribución en el mundo. EBV-2 exhibe una filogeografía predominante en África y EBV-1 en Asia, América y Europa. Sin embargo, los estudios realizados son poco robustos o claros, pero ofrecen una buena posibilidad de identificar patrones de evolución moleculares entre EBV y su hospedero ⁷¹.

Debido a esto, se decidió explorar los genomas completos de EBV reportados hasta la fecha y compararlos (usando el *core* o núcleo de genes) y con la finalidad de ver si se formaban los dos grupos filogenómicos (EBV-1 y EBV-2). Se utilizó una plataforma y un *pipeline* robustos, reproducibles y fácil de emplear ^{72,73}. Se descargaron 109 genomas

de EBV reportados en NCBI (condiciones: Assembly, GeneBank, Refseq), el llamado o predicción de genes y la traducción se realizó con prodigal ⁷⁴. Las proteínas hipotéticas fueron anotadas funcionalmente con la base de genes ortólogos de bacterias de NCBI (COGs) para descartar contaminaciones bacterianas. Luego, con *blastp* (E-value = $1e^{-5}$) se compararon los genes de cada genoma y entre todos los genomas y se usó un valor de identidad y similitud de secuencias (minbit) de 0.5 (minbit=0.5 indica que las proteínas tienen al menos el 50% de identidad y el 50% de cobertura). Después, se generaron *clusters* con las proteínas usando TRIBE-MCL con un valor de 8 (TRIBE-*mcl* permite agrupar a las proteínas en familias utilizando la similitud e identidad de las secuencias y está basado en el algoritmo de *clusters* de Markov; un valor de 10 se utiliza para comparar especies del mismo género); y, por último, las proteínas en cada *cluster* fueron alineadas usando MUSCLE (alineamientos múltiples) ^{75,76}.

El análisis pangenómico de 109 genomas de EBV (Figura 5.) muestra que todos los genomas comparten la mayoría de los genes (Figura 5. - recuadro morado y *clusters* del circulograma). También se identificaron 15 genes que representan el *core* de *cluster* de genes de copia única (Figura 5. – *core* gc_1: rojo), esto indica que existe una gran variabilidad entre las secuencias de EBV (a nivel de proteína) ya que el promedio de genes de cada genoma fue ~110. Se anotaron 7 genes con COGs, esto no es de sorprender ya que podrían tratarse de contaminaciones o bien de genes con dominios similares a bacterias. Se obtuvieron 8 *clusters* de genes entre los 109 genomas:

- i) 6 *clusters* compartidos entre los genomas, pero no representados en todos (sahred gc_#).
- ii) 2 *clusters* de genes del *core* dividido en 2 grupos (*core* gc_#):
 - a. Genes presentes en 1 sola copia.
 - b. Genes presentes en +1 copia.

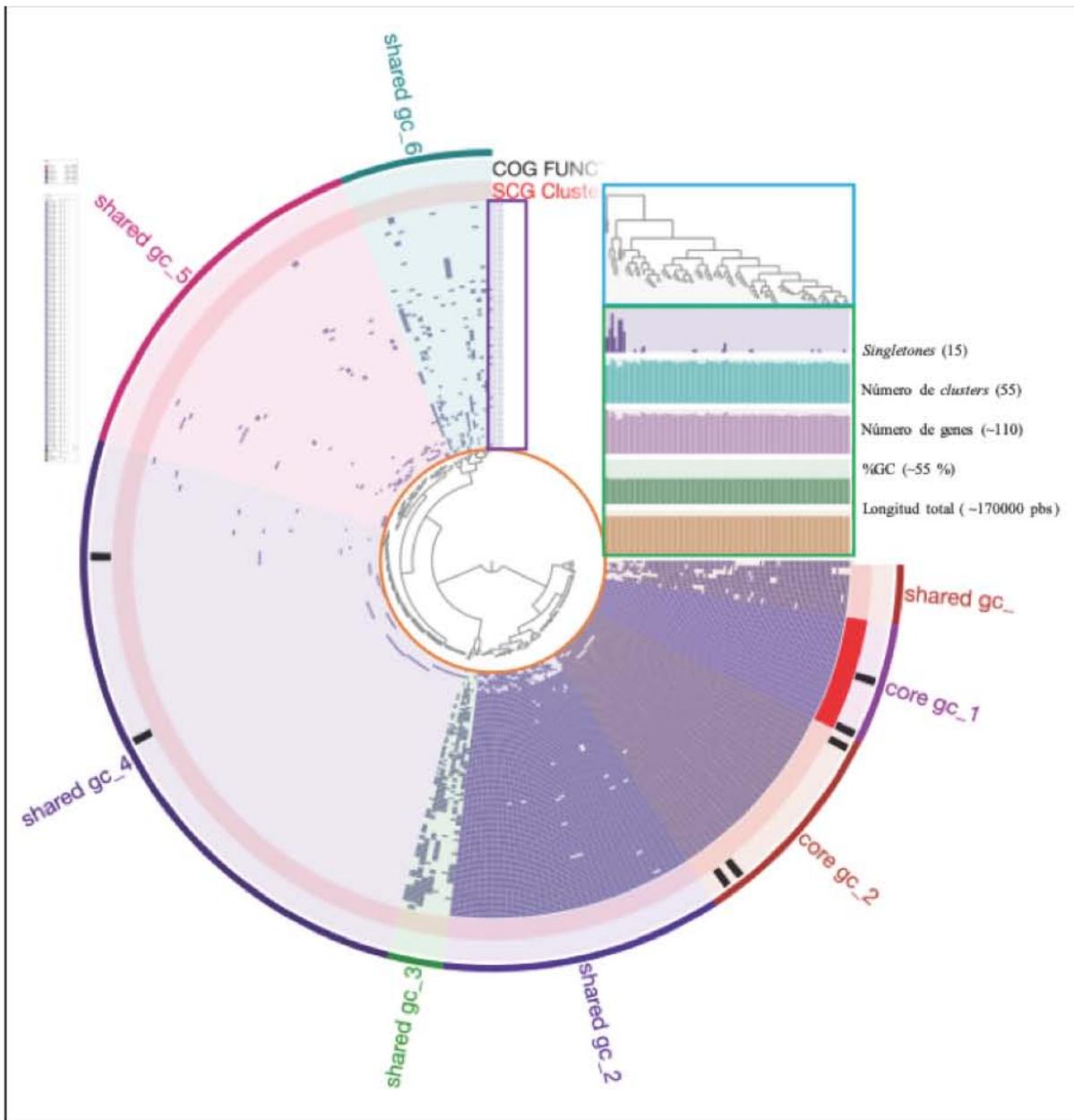


Figura 5. Análisis pangenómico de 109 genomas de EBV. Recuadro azul: distancias entre los genomas por la presencia / ausencia de los *clusters* de proteínas . Recuadro verde: información de cada genoma. Recuadro morado: *clusters* de proteínas de cada genoma (orden – presencia / ausencia). Se generaron 8 *clusters* de proteínas entre los genomas 2 de ellos contienen genes compartidos en todos los genomas (*core gc_1* – *clusters* de genes de copia única; y, *core_gc2* – *clusters* con +1 gene por genoma) y los 6 restantes son *clusters* compartidos entre algunos genomas.

Para saber si se lograban separar los genomas en los dos genotipos de EBV se utilizaron los genes de copia única porque son marcadores filogenéticos robustos ⁷⁷. Se seleccionaron los 15 genes de copia única (Figura 5. – *core gc_1*) para hacer el análisis filogenómico usando las proteínas concatenadas y FastTree (Figura 7.) ⁷⁸. El análisis filogenómico, separa en 3 grandes grupos a EBV y en 10 subgrupos. A pesar de que un grupo es claramente distinto a los demás (Fig. 6 - grupo 1), este análisis no logra separar a EBV, de manera contundente, en los 2 genotipos; y, se sugiere que existen 3 grupos basados en estos 15 genes.

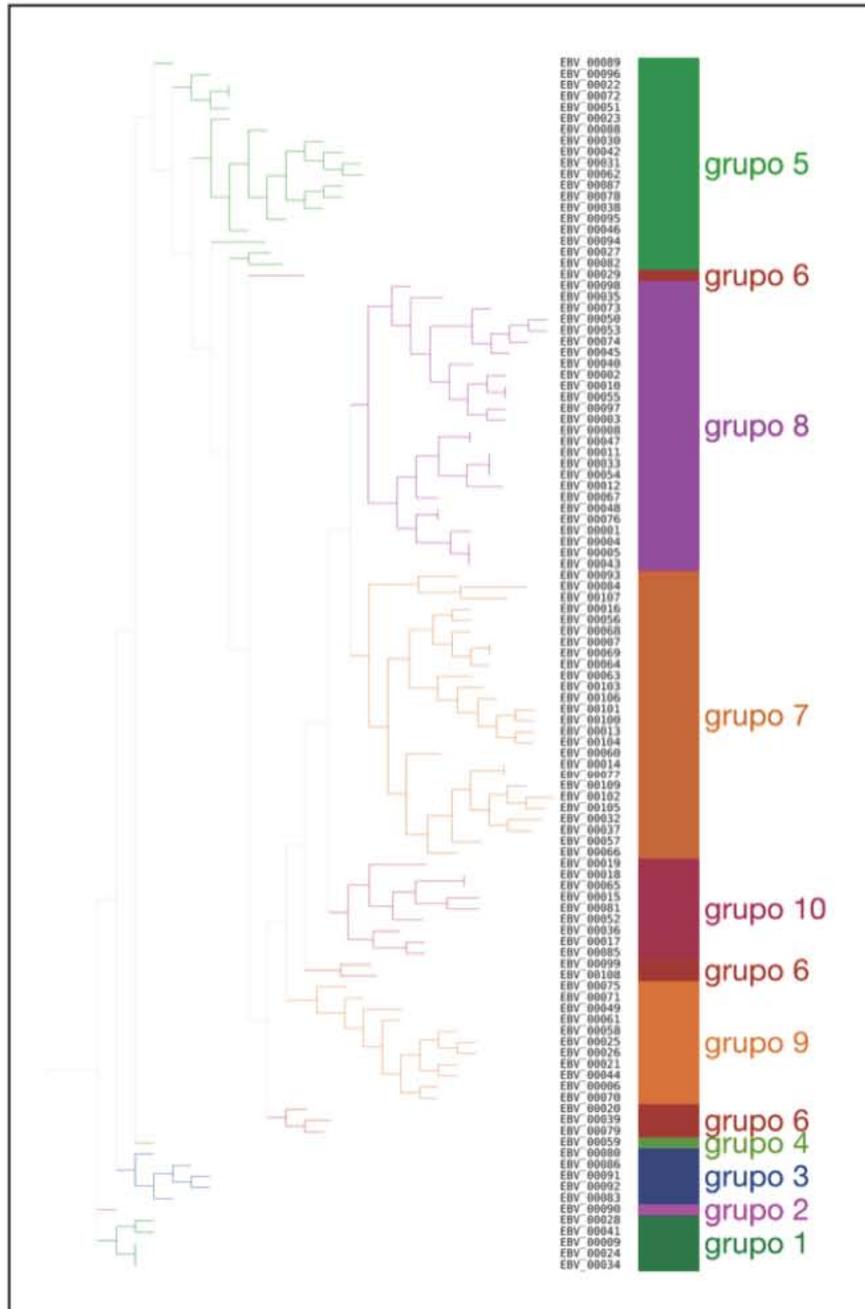


Figura 6. Análisis filogenómico de 15 genes *core* de 109 genomas de EBV. A partir del análisis pangenómico, se seleccionó el *cluster* de genes de copia única presentes en todos los genomas (*core genes*) y se analizó la relación filogenómica de estos. El árbol se construyó con FastTree. Y se siguió el protocolo de Anvi'o (*Phylogenomics*) para el procedimiento bioinformático.

8. Mecanismos oncogénicos de EBV

La capacidad de EBV para transformar linfocitos B ha sido explotada en la generación de hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales; EBNA-2/3C, LMP2A y LMP1 son proteínas de latencia de EBV indispensables para dicho proceso. Otros genes de EBV relacionados con su capacidad de transformación son los *BamHI rightward transcripts* (BARTs), que contienen dos de los tres *clusters* de miRNAs que se encuentran expresados en CG. Por ejemplo, se ha descrito que un miRNA de EBV es capaz de modular la expresión de E-cadherina induciendo despolarización ⁷⁹.

La proteína LMP-1 es reconocida como una oncoproteína viral y se encuentra expresada en diversas neoplasias. Estructuralmente es una proteína transmembranal que cuenta con un extremo N-terminal corto citoplasmático, 6 regiones transmembranales y una región larga C-terminal citoplasmática con dominios activos (CTAR) ⁸⁰. Los dominios CTAR funcionan como sitios de reconocimiento para adaptadores celulares, permitiendo la transducción de señales. LMP-1 en linfocitos B mimetiza la forma constitutivamente activa de CD40 ⁸¹. Los principales blancos de la señalización de LMP-1 son NF- κ B, JNK/AP-1 y la vía de JAK/STAT1, ERK/MAPK, PI3K/Akt y PLC/PKC lo que lleva a la inducción de proliferación, inhibición de apoptosis, sobreexpresión de metalo-proteasas y la producción de citocinas proinflamatorias como IL-8 ⁸².

LMP2A es una proteína transmembranal de EBV que tiene un dominio C-terminal citoplasmático, una región transmembranal y un dominio citoplasmático N-terminal con motivos prolina-tirosina (PY), y un motivo de activación de inmunoreceptor o receptor de antígeno basado en tirosina (ITAM). Los motivos PY pueden unir motivos triptófano-triptófano (WW) presentes en las ubiquitin ligasas, mientras que los residuos conservados de tirosina de la secuencia ITAM son fosforilados por las tirosina-cinasas juxtapuestas en la membrana como las cinasas de la familia de Src. Los residuos fosforilados dentro del ITAM reclutan proteínas con dominios SH2 como las tirosin-cinasas Lyn, Fyn, Syk y Csk, que son fosforiladas y activas. Esto desencadena una serie

de cascadas de señalización, como Ras la cual regula la proliferación, la supervivencia y la activación del linfocito B. Por otro lado, Ras puede activar PI3K/Akt para controlar la división celular, la migración y la metástasis. Importantemente, los residuos de tirosina fosforilados del dominio ITAM de LMP2A, interactúan con los componentes de la transducción de señales del BCR y así, mimetiza la señal constitutiva activa del BCR independiente de antígeno, a través de la activación constitutiva de la vía de ERK/MAPK, bloqueando también la señal del BCR dependiente de antígeno. Los motivos PY de LMP2A que interactúan con las E3 ubiquitin ligasas, inician la degradación dependiente del proteasoma de proteínas celulares blanco. Haciendo esto, LMP2A ayuda a establecer y mantener la latencia viral ⁸³⁻⁸⁵.

9. Evidencia de cooperación entre *Helicobacter pylori* y el virus de Epstein barr en la generación de cáncer gástrico

Desde finales de 1980, se comenzaron a reportar lesiones gástricas con la presencia de EBV. Sin embargo, se le había dado menos importancia comparado con el CGaHp. Recientemente, el CGaEBV recobró importancia y representa ~10% de todos los CG. En particular se ha observado la participación de los miRNAs de EBV, codificados por los BARTs, relacionados con CG ⁸⁶⁻⁸⁹.

Con la finalidad de tener una clasificación más homogénea del CG, el *Cancer Genome Atlas Research Network* (CGARN) realizó un estudio en 295 muestras de pacientes con CG y utilizó 6 métodos distintos de análisis: análisis de numero de copias somáticas basado en arreglo, secuenciación de exoma completo, perfil de metilación de ADN basado en arreglo, secuenciación de RNAm, secuenciación de miRNA y arreglo en fase reversa de proteína ⁹⁰. La clasificación que ellos sugieren consiste en 4 grupos:

- a) CG asociado a EBV: caracterizado por la hipermetilación de promotores de ADN
- b) CG con inestabilidad de microsatélites (MSI) – caracterizado por una alta tasa de mutación y metilación
- c) CG cromosómicamente inestable: caracterizado por un alto número de copias de aberraciones somáticas (SCAN's)

- d) CG genómicamente estable: caracterizado por bajo número de copias de aberraciones somáticas

Ellos no reportan alguna relación entre el tipo de mutaciones observadas y la presencia de *H. pylori*. Probablemente esto se deba a que la presencia de *H. pylori* en tejido canceroso es muy baja o nula. Por otro lado, aunque el CGaEBV es ~10%, éste sí muestra una firma clara de mutaciones. Interesantemente, el ácido valpróico inhibe la expresión de genes líticos de EBV a través de antagonizar con desacetilasas de histonas, reforzando la importancia de la metilación en mantener al virus en estado latente ⁹¹.

La co-infección y cooperación de EBV y *H. pylori* en el desarrollo de CG ha sido tema de debate. Los patrones de expresión de EBV en CG observados por el TCGA son distintos a los de cáncer nasofaríngeo. En el CGaEBV ellos observan que los genes de EBV más expresados pertenecen a la región *Bam*HI-A (región compleja de varios transcritos y transcritos con *splicing*) y no observan casi expresión de EBNA-1, LMP2A y LMP1. Y, siendo la metilación de islas CpG, la característica más destacada junto con la expresión de miRNA's de BARTs y una baja expresión de EBNA-1, LMP2A y LMP1 como sucede en otras neoplasias asociadas a este virus sugiriendo que no requiere de sus oncogenes clásicos o que *H. pylori* podría estar colaborando en la promoción de CG ⁹².

EBV fue identificado en CG y en lesiones pre-neoplásicas mediante PCR e hibridación *in situ* del gen EBER ⁹³. Y, más adelante, en pacientes pediátricos de México se asoció la co-infección de HpCagA+ y EBV con lesiones gástricas más severas y con mayor infiltrado inflamatorio (Figura 8.) ⁹⁴. Siendo uno de los primeros reportes de una posible co-infección entre EBV y *H. pylori* en CG.

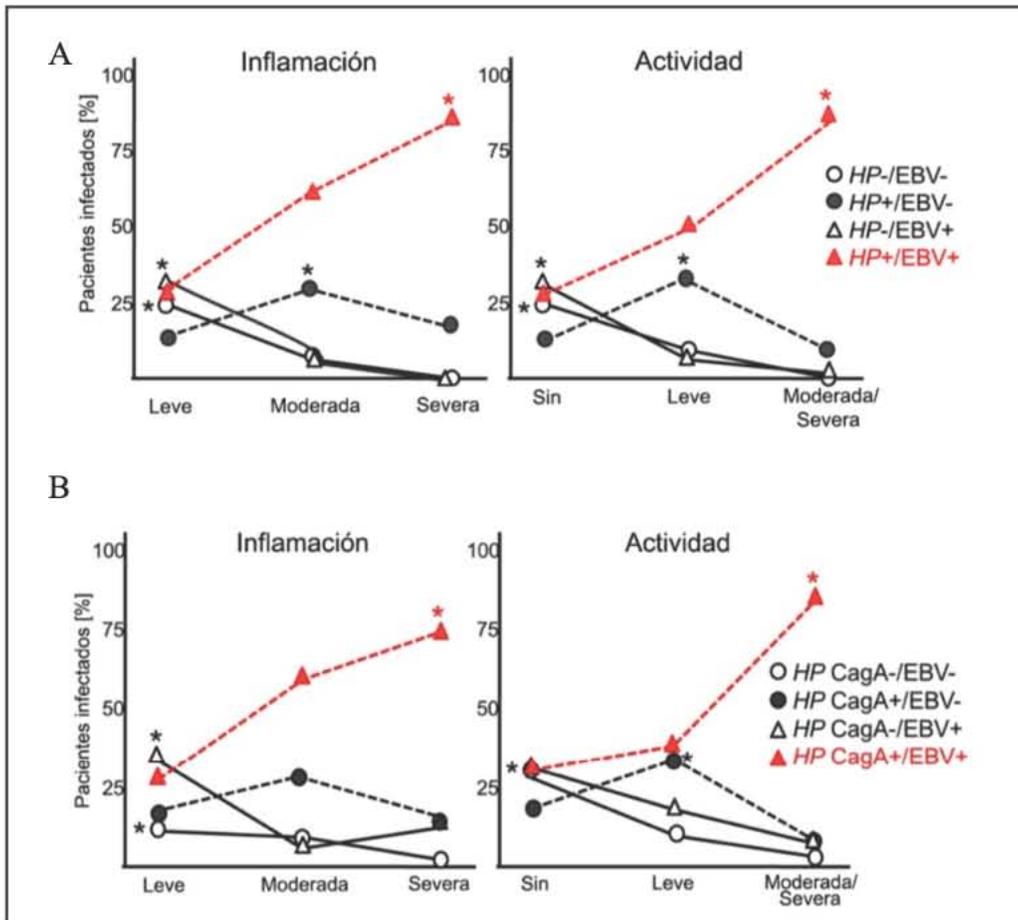


Figura 7. EBV y *Helicobacter pylori* inducen una inflamación más severa. A) frecuencia de infección por EBV y Hp en pacientes pediátricos en función de la severidad de la lesión gástrica (inflamación y actividad). B) frecuencia de infección por EBV y HpCagA+ en pacientes pediátricos en función de la severidad de la lesión gástrica (inflamación y actividad). La inflamación definida como el grado de infiltración de células mononucleares. La actividad fue definida como el grado de infiltración de células polimorfonucleares.

Modificada de: Cárdenas-Mondragón et al. Epstein Barr virus and *Helicobacter pylori* co-infection are positively associated with severe gastritis in pediatric patients. PLOS ONE; 8(11):2013

Además, un reporte reciente muestra una asociación entre algunos marcadores proinflamatorios (CCL20, CXCL9, PD-L1, IL-10, CCL19, CCL11, IL-17 y CCL8) y el CG

EBV positivo comparado con CG EBV negativo. Fortaleciendo la relevancia del proceso inflamatorio como eje central de una cooperación entre EBV y *H. pylori*⁹⁵. En México, un estudio reciente en 127 pacientes adultos con CG y basado en anticuerpos contra el antígeno de reactivación de EBV (VCA), *H. pylori* y CagA de *H. pylori* mostró que las moléculas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , TGF- β , MCP-1, correlacionaban negativamente con los niveles de VCA en suero, mientras que, IFN- γ correlacionaba positivamente. Aunque ninguna correlacionó con *H. pylori* o CagA. Los autores argumentan que la falta de asociación entre la coinfección *H. pylori* / EBV y marcadores inflamatorios podría deberse al pequeño número de pacientes analizados, y que la asociación entre coinfección y CG volvió a sugerir mecanismos de cooperación⁹⁶.

Además, en un estudio multi-céntrico en países con una prevalencia similar de *H. pylori* y riesgo de CG (México y Paraguay) se analizó la asociación entre EBV / *H. pylori* con el tipo de lesión gástrica y el nivel de inflamación en 525 pacientes con alguna enfermedad gástrica. En dicho trabajo se utilizaron anticuerpos contra el antígeno de la cápside viral (VCA) de EBV y la oncoproteína CagA de *H. pylori*. EBV se asoció positivamente con lesiones pre-neoplásicas y con CG de tipo intestinal. *H. pylori* ó CagA+ se asociaron con las lesiones pre-neoplásicas y disminuyó en el tipo intestinal, pero no así en el CG tipo difuso. Cuando analizaron el riesgo debido a la presencia de ambos patógenos y por el tipo de lesión, los pacientes EBV+ / *H. pylori* + presentaron mayor riesgo comparado con los infectados solo por *H. pylori* (OR = 8.4). Los pacientes con CG intestinal eran 100% EBV+, y en CG-difuso no observaron diferencia significativa. Cuando analizaron el nivel de inflamación en función del tipo de infección; encontraron que los pacientes co-infectados tenían mayor riesgo de inflamación (infiltración de células mononucleares y polimorfonucleares) con respecto a infecciones únicas en lesiones pre-malignas. Este trabajo demuestra, serológicamente, que la co-infección de EBV / *H. pylori* incrementa el riesgo de CG tipo intestinal y de las lesiones pre-neoplásicas⁹⁷.

Entender la cooperación de EBV y *H. pylori* desde un punto de vista genómico implica muchos retos, ya que, se habla de agentes infecciosos muy distantes, filogenéticamente (virus y bacteria, respectivamente). Pesa a ello, comparten ciertas características como:

la oncogenicidad, la promoción de la inflamación, su universalidad y que solo una fracción de las personas infectadas desarrollan algún tipo de problema. Por lo cual, las interacciones entre ellos podrían evidenciarse de mejor manera mediante estudios *in vitro*.

En 2016, Saju P et al. mostraron que la interacción entre CagA y SHP1 (homólogo de SHP2- fosfatasa) disminuye los niveles de CagA-P y que EBV induce la hipermetilación del promotor de SHP1. Esto sugiere dos cosas, la primera es que EBV puede potenciar la actividad de CagA-P y la segunda, que SHP1 es un antagonista de CagA-P ⁹⁸.

Utilizando un modelo de co-infección en células humanas gástricas, Pandey S et al. en 2018, demostraron que EBV infecta mejor cuando las células han sido pre-infectadas con HpCagA+ o con sobrenadante de células infectadas con HpCagA+. Además, observaron que el estado post-infección de EBV era preferencialmente lítico cuando *H. pylori* había estado presente y no con los sobrenadantes y que los viriones producidos eran más infectivos. Además, observaron que la co-infección de *H. pylori* y EBV inducía la expresión de metil-transferasas de ADN que hipermetilan islas CpG de genes asociados con ciclo celular, reparación del ADN, apoptosis y genes supresores de tumores ⁹⁹.

Por último, se ha demostrado que HpCagA+ es capaz de infectar los linfocitos B, translocar CagA e inducir la expresión de moléculas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-X) ¹⁰⁰. Sin embargo, no se ha explorado la capacidad de inducir la producción de viriones infectivos mediado por la infección de *H. pylori* en linfocitos B.

10. Conclusiones

La interacción entre EBV y *H. pylori* en la promoción de CG es, cada vez, más aceptada y soportada por diversos estudios, principalmente, epidemiológicos y algunos moleculares; y, probablemente en el futuro, alguno genómico. Sin embargo, a pesar de la alta incidencia y prevalencia de CG en el mundo, estos estudios son realizados en

pocos laboratorios, probablemente, debido al costo y complejidad de trabajar con estos agentes. Las multi-infecciones son reconocidas ampliamente por su importancia médica, en particular, entre miembros de los mismos dominios taxonómicos (bacteria-bacteria y virus-virus). Aunque, otras co-infecciones bacteria-virus se han identificado, como es el caso de la fibrosis quística ¹⁰¹.

Este trabajo resume los avances más importantes de *H. pylori* y EBV como agentes carcinogénicos, los cuales son responsables de un porcentaje importante del CG. Se realizó un análisis pan- y filogenómico con 109 genomas de EBV, con el cual, se demostró la formación de 3 grupos filogenómicos distintos en lugar de los 2 con los que es clasificado el virus sugiriendo la necesidad de revisar esta clasificación. Además, se presentan las observaciones epidemiológicas y moleculares que sugieren una sinergia y/o cooperación entre ambos agentes infecciosos en el desarrollo de esta neoplasia. Hasta la fecha existen 4 evidencias claras de esta cooperación: i) la presencia de ambos microorganismos en pacientes pediátricos está asociado con un estado inflamatorio más severo que la infección individual, ii) *H. pylori* puede infectar linfocitos B, iii) EBV aumenta su capacidad de infección de células gástricas humanas previa infección por *H. pylori*, iv) la co-infección genera una hipermetilación en células gástricas humanas. Por último, se busca evidenciar la complejidad y necesidad de buscar nuevos modelos para estudiar las interacciones bacterias-virus-células humanas, en el contexto de la promoción del CG.

11. Referencias

1. Gómez-Dantés H, Lamadrid-Figueroa H, Cahuana-Hurtado L, et al. The burden of cancer in Mexico, 1990-2013. *Salud Publica Mex.* 2016;58(2):118-131.
doi:10.21149/spm.v58i2.7780
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
doi:10.3322/caac.21492

3. Asia S, Asia S, Hdi H. Source: Globocan 2018. 2019;876:2018-2019.
4. De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 2012;13(6):607-615. doi:10.1016/S1470-2045(12)70137-7
5. National Institute of Cancer. Infectious Agents. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents>. Published 2019. Accessed April 1, 2019.
6. IARC. List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans, Volumes 1 to 123. *IARC Monographs.* 2018:1-9. <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/Table4.pdf>.
7. National Cancer Institute. Cancer Types. <https://www.cancer.gov/types>. Published 2019. Accessed April 1, 2019.
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
9. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol.* 2001;2(4):293-299. doi:10.1038/86297
10. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K WP. *Molecular Biology of the Cell.* Vol 36. 5th ed. New York: Garland Sciences; 2008. doi:10.1002/bmb.20192
11. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: An update. *Toxicology.* 2003;193(1-2):3-34. doi:10.1016/S0300-483X(03)00287-7
12. Igney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack TUMORS AND THE IMMUNE SYSTEM. 2002;71(June):907-920.
13. Rowe M, Zuo J. Immune responses to Epstein-Barr virus: molecular interactions in the virus evasion of CD8+T cell immunity. *Microbes Infect.* 2010;12(3):173-181. doi:10.1016/j.micinf.2009.12.001
14. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2011;119(November):1420-1428. doi:10.1172/JCI39104.1420
15. Anything A, Online B, Fast G, et al. Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells.

- 2016;4(Varmus 1983):4-7.
16. Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, et al. A Community-Based Seroepidemiologic Study of Helicobacter pylori Infection in Mexico. *J Infect Dis.* 1988;178(4):1089-1094 Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor.
 17. Correa P, Piazuelo MB. The gastric cancer. *Colomb Med.* 2013;44(3):192-201.
 18. Hu B, Hajj N El, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3(3):251-261. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.021
 19. Correa P, Piazuelo MB, Camargo MC. Etiopathogenesis of gastric cancer. *Scand J Surg.* 2006;95(4):218-224.
 20. Ferreira P, Machado J, Mateus R, et al. Genetic Screening for Familial Gastric Cancer. *Hered Cancer Clin Pract.* 2010;2(2):51. doi:10.1186/1897-4287-2-2-51
 21. Oliveira C, Berx G, Machado JC, et al. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene.* 2002;20(12):1525-1528. doi:10.1038/sj.onc.1204234
 22. Sahasrabudhe R, Lott P, Bohorquez M, et al. Germline Mutations in PALB2, BRCA1, and RAD51C, Which Regulate DNA Recombination Repair, in Patients With Gastric Cancer. *Gastroenterology.* 2017;152(5):983-986.e6. doi:10.1053/j.gastro.2016.12.010
 23. Organization WH. WHO histological classification of gastric tumours. Chapter3: Tumors of the Stomach. doi:S0928-8244(96)00090-9 [pii]
 24. Genta RM, Graham DY. Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of Helicobacter pylori: a topographic study of H. pylori density and distribution. *Gastrointest Endosc.* 1994;40(3):342-345. doi:10.1016/S0016-5107(94)70067-2
 25. Scott DR, Marcus EA, Wen Y, Oh J, Sachs G. Gene expression in vivo shows that Helicobacter pylori colonizes an acidic niche on the gastric surface. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(17):7235-7240. doi:10.1073/pnas.0702300104
 26. Clyne M, Labigne A, Drumm B. Helicobacter pylori requires an acidic environment to survive in the presence of urea. *Infect Immun.* 1995;63(5):1669-1673. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7729871> <http://www.pubmedcentral.nih>.

- gov/articlerender.fcgi?artid=PMC173208.
27. American Cancer Society. Stomach Cancer Risk Factors. Stomach Cancer, Causes, risk Factors and prevention. <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>. Published 2019. Accessed April 1, 2019.
 28. Torres J, Correa P, Ferreccio C, et al. Gastric cancer incidence and mortality is associated with altitude in the mountainous regions of Pacific Latin America. *Cancer Causes Control*. 2013;24(2):249-256. doi:10.1007/s10552-012-0114-8
 29. Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol*. 2003;56(1):1-9. doi:10.1016/S0895-4356(02)00534-6
 30. Park S, Gaur A, ... EL-G&, 2008 undefined. Park (Lengyel) 2008 The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2.pdf. *GenesdevCshlpOrg*. 2008:894-907. doi:10.1101/gad.1640608.duction
 31. Marshall BJ, Warren JR, Graevenitz A Von. 80 Microbiology: A Centenary Perspective 1984 Unidentified Curved Bacilli in the Stomach of Patients with Gastritis and Peptic Ulceration. 1984:1311-1315.
 32. International Agency for Research on Cancer. Helicobacter pylori. *Monogr Eval Carcinog Risks to Humans - 100B IARC*. 2007;100(B):385-436.
 33. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of Helicobacter pylori Infection. *Helicobacter*. 2014;19(S1):1-5. doi:10.1111/hel.12165
 34. Salama NR, Hartung ML, Müller A. Life in the human stomach: Persistence strategies of the bacterial pathogen Helicobacter pylori. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(6):385-399. doi:10.1038/nrmicro3016
 35. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, et al. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*. 2001;345Trends(11):784-789.
 36. Torres J, Lopez L, Lazcano E, Camorlinga M, Flores L, Muñoz O. Trends in Helicobacter pylori infection and gastric cancer in Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(8):1874-1877. doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0113
 37. Backert S, Tegtmeyer N, Fischer W. Composition, structure and function of the Helicobacter pylori cag pathogenicity island encoded type IV secretion system.

- Future Microbiol.* 2015;10(6):955-965. doi:10.2217/fmb.15.32
38. Forman D, Newell DG, Fullerton F, et al. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ.* 1991;302(6788):1302-1305. doi:10.1136/bmj.302.6788.1302
 39. Thomas RJ, Atherton JC, Limb MC, Owen RJ, Argent RH, Kidd M. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 2004;127(2):514-523. doi:10.1053/j.gastro.2004.06.006
 40. Stein M, Rappuoli R, Covacci A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;97(3):1263-1268. doi:10.1073/pnas.97.3.1263
 41. Wallden K, Rivera-Calzada A, Waksman G. Type IV secretion systems: Versatility and diversity in function. *Cell Microbiol.* 2010;12(9):1203-1212. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01499.x
 42. Ishikawa S, Ohta T, Hatakeyama M. Stability of *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein in human gastric epithelial cells. *FEBS Lett.* 2009;583(14):2414-2418. doi:10.1016/j.febslet.2009.06.043
 43. Fishman PH. Internalization and degradation of cholera toxin by cultured cells: Relationship to toxin action. *J Cell Biol.* 1982;93(3):860-865. doi:10.1083/jcb.93.3.860
 44. Covacci A, Rappuoli R, Bagnoli F, Stein M, Fantl WJ, Halenbeck R. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol.* 2003;43(4):971-980. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02781.x
 45. Mueller D, Tegtmeyer N, Brandt amaoka Y, et al. c-Src and c-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Investig insights into Helicobacter pylori oncoprotein CagA Interact with β 1 integrin .pdf.* 2012;122(4):1553-1566. doi:10.1172/JCI61143.although
 46. Tegtmeyer N, Traube L, Perez-Perez G, et al. A Specific A/T Polymorphism in Western Tyrosine Phosphorylation B-Motifs Regulates *Helicobacter pylori* CagA

- Epithelial Cell Interactions. *PLOS Pathog.* 2015;11(2):e1004621.
doi:10.1371/journal.ppat.1004621
47. Ertl C, Haas R, Tosi T, et al. Structural insights into Helicobacter pylori oncoprotein CagA interaction with $\alpha 1$ integrin. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(36):14640-14645. doi:10.1073/pnas.1206098109
 48. Miura M, Ohnishi N, Tanaka S, Yanagiya K, Hatakeyama M. Differential oncogenic potential of geographically distinct Helicobacter pylori CagA isoforms in mice. *Int J Cancer.* 2009;125(11):2497-2504. doi:10.1002/ijc.24740
 49. Correa P, Fox J, Fontham E, et al. Helicobacter pylori and gastric carcinoma. *Cancer.* 1990;66(12):2569-2574. <http://www.gastroscan.ru/literature/219/>.
 50. Watanabe T, Tada M, Nagi H, Sasaki S, Nakao M. Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology.* 1998;115(3):642-648. doi:10.1016/S0016-5085(98)70143-X
 51. Higashi H, Matsui A, Ohnishi N, et al. Transgenic expression of Helicobacter pylori CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(3):1003-1008. doi:10.1073/pnas.0711183105
 52. Montalban C, Santon A, Boixeda D, Bellas C. Regression of gastric high grade mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma after Helicobacter pylori eradication. *Gut.* 2001;49(4):584-587. doi:10.1136/gut.49.4.584
 53. Talley NJ, Zinsmeister AR, Weaveer A, et al. Gastric adenocarcinoma and Helicobacter pylori infection. *J Natl Cancer Inst.* 1991;83(23):1734-1739.
 54. Wang L, Herrera-Goepfert R, Yu G, et al. Molecular Characterization of the Human Stomach Microbiota in Gastric Cancer Patients. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7(July):1-11. doi:10.3389/fcimb.2017.00302
 55. DiStefano PS, Cardona A, Viala J, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. *Nat Immunol.* 2004;5(11):1166-1174. doi:10.1038/ni1131
 56. Segal ED, Falkow S, Covacci A, Lange C, Tompkins LS. Induction of host signal transduction pathways by Helicobacter pylori. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;94(14):7595-7599. doi:10.1073/pnas.94.14.7595
 57. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M. SHP-2 Tyrosine

- phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori*. *Science* (80-). 2002;295(January):683-687. doi:10.1126/science.1067147
58. Tegtmeyer N, Neddermann M, Asche CI, Backert S. Subversion of host kinases: a key network in cellular signaling hijacked by *Helicobacter pylori* CagA. *Mol Microbiol.* 2017;105(3):358-372. doi:10.1111/mmi.13707
 59. Buti L, Amieva MR, Covacci A, Bagnoli F, Tompkins L. *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(45):16339-16344. doi:10.1073/pnas.0502598102
 60. Vallejo-Flores G, Meza I, Legorreta-Haquet MV, et al. *Helicobacter pylori* CagA Suppresses Apoptosis through Activation of AKT in a Nontransformed Epithelial Cell Model of Glandular Acini Formation . *Biomed Res Int.* 2015;2015:1-12. doi:10.1155/2015/761501
 61. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 Years on. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(10):757-768. doi:10.1038/nrc1452
 62. Ali NH, Abou-Saleh H, Smatti MK, Al-Sadeq DW, Pintus G, Nasrallah GK. Epstein–Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front Oncol.* 2018;8(June). doi:10.3389/fonc.2018.00211
 63. Scott RS. Epstein-Barr Virus: A Master Epigenetic Manipulator. *Curr Opin Virol.* 26:74-80. doi:10.1007/s11065-015-9294-9.Functional
 64. Hsu JL, Glaser SL. Epstein-Barr virus-associated malignancies: Epidemiologic patterns and etiologic implications. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000;34(1):27-53. doi:10.1016/S1040-8428(00)00046-9
 65. Faulkner GC, Burrows SR, Khanna R, et al. X-Linked Agammaglobulinemia Patients Are Not Infected with Epstein-Barr Virus : Implications for the Biology of the Virus X-Linked Agammaglobulinemia Patients Are Not Infected with Epstein-Barr Virus : Implications for the Biology of the Virus. *Blood.* 1999;73(2)(Feb):1555.
 66. Thorley-Lawson DA, Gross A. Persistence of the Epstein–Barr Virus and the Origins of Associated Lymphomas. *N Engl J Med.* 2004;350(13):1328-1337. doi:10.1056/nejmra032015
 67. Thompson MP. Epstein-Barr Virus and Cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(3):803-

821. doi:10.1158/1078-0432.CCR-0670-3
68. Morales-Sánchez A, Fuentes-Pananá EM. Human viruses and cancer. *Viruses*. 2014;6(10):4047-4079. doi:10.3390/v6104047
69. Sample J, Young L, Martin B, et al. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol*. 1990;64(9):4084-4092. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2166806><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC247870>.
70. Arrand JR, Kellam P, Corton C, et al. Genome Diversity of Epstein-Barr Virus from Multiple Tumor Types and Normal Infection. *J Virol*. 2015;89(10):5222-5237. doi:10.1128/jvi.03614-14
71. Corvalán A, Ruedlinger J, de Mayo T, Polakovicova I, Gonzalez-Hormazabal P, Aguayo F. The Phylogeographic Diversity of EBV and Admixed Ancestry in the Americas—Another Model of Disrupted Human-Pathogen Co-Evolution. *Cancers (Basel)*. 2019;11(2):217. doi:10.3390/cancers11020217
72. Eren AM, Esen ÖC, Sogin ML, et al. Anvi'o: an advanced analysis and visualization platform for 'omics data. *PeerJ*. 2015;3:e1319. doi:10.7717/peerj.1319
73. Delmont TO, Eren AM. Linking pangenomes and metagenomes: the Prochlorococcus metapangenome . *PeerJ*. 2018;6:e4320. doi:10.7717/peerj.4320
74. Hyatt D, Chen GL, LoCascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*. 2010;11. doi:10.1186/1471-2105-11-119
75. Edgar RC. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(5):1792-1797. doi:10.1093/nar/gkh340
76. Enright AJ. An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(7):1575-1584. doi:10.1093/nar/30.7.1575
77. Chiapello H, Rodolphe F, Aguilera G, et al. Assessing the Performance of Single-Copy Genes for Recovering Robust Phylogenies. *Syst Biol*. 2008;57(4):613-627. doi:10.1080/10635150802306527
78. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. Fasttree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol Biol Evol*. 2009;26(7):1641-

1650. doi:10.1093/molbev/msp077
79. Young LS, Murray PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: From latent genes to tumours. *Oncogene*. 2003;22(33 REV. ISS. 2):5108-5121.
doi:10.1038/sj.onc.1206556
 80. Eliopoulos AG, Young LS. LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol*. 2001;11(6):435-444. doi:10.1006/scbi.2001.0410
 81. Uchida J, Yasui T, Takaoka-shichijo Y, Muraoka M, Kulwichit W, Raab-traub N. Mimicry of CD40 Signals by Epstein-Barr Virus LMP1 in B Lymphocyte Response. *Science (80-)*. 1999;286(5438):300-303.
 82. Schaefer BC, Yin Q, Lacey M, et al. Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Induces Cellular MicroRNA miR-146a, a Modulator of Lymphocyte Signaling Pathways. *J Virol*. 2007;82(4):1946-1958. doi:10.1128/jvi.02136-07
 83. Caldwell RG, Wilson JB, Anderson SJ, Longnecker R. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity*. 1998;9(3):405-411. doi:10.1016/S1074-7613(00)80623-8
 84. Scholle F, Bendt KM, Raab-Traub N. Epstein-Barr Virus LMP2A Transforms Epithelial Cells, Inhibits Cell Differentiation, and Activates Akt. *J Virol*. 2002;74(22):10681-10689. doi:10.1128/jvi.74.22.10681-10689.2000
 85. Kang MS, Kieff E. Epstein-Barr virus latent genes. *Exp Mol Med*. 2015;47(1):e131-16. doi:10.1038/emm.2014.84
 86. Edwards RH, Marquitz AR, Raab-Traub N. Epstein-Barr Virus BART MicroRNAs Are Produced from a Large Intron prior to Splicing. *J Virol*. 2008;82(18):9094-9106. doi:10.1128/jvi.00785-08
 87. Qiu J, Cosmopoulos K, Pegtel M, et al. A novel persistence associated EBV miRNA expression profile is disrupted in neoplasia. *PLoS Pathog*. 2011;7(8). doi:10.1371/journal.ppat.1002193
 88. Tsai CY, Liu YY, Liu KH, et al. Comprehensive profiling of virus microRNAs of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: highlighting the interactions of ebv-Bart9 and host tumor cells. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017;32(1):82-91. doi:10.1111/jgh.13432
 89. Hsu CY, Yi YH, Chang KP, Chang YS, Chen SJ, Chen HC. The Epstein-Barr

- Virus-Encoded MicroRNA MiR-BART9 Promotes Tumor Metastasis by Targeting E-Cadherin in Nasopharyngeal Carcinoma. *PLoS Pathog.* 2014;10(2). doi:10.1371/journal.ppat.1003974
90. Mallery D, Yang L, Rabeno B, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014;513(7517):202-209. doi:10.1038/nature13480
 91. Tuck D, Gradoville L, Daigle D, et al. Valproic Acid Antagonizes the Capacity of Other Histone Deacetylase Inhibitors To Activate the Epstein-Barr Virus Lytic Cycle. *J Virol.* 2011;85(11):5628-5643. doi:10.1128/jvi.02659-10
 92. Morales-Sanchez A, Fuentes-Panana EM. Epstein-Barr Virus-associated Gastric Cancer and Potential Mechanisms of Oncogenesis. *Curr Cancer Drug Targets.* 2016;17(6):1-28. doi:10.2174/1568009616666160926124923
 93. Leal Y, Torres J, Mantilla A, Fuentes-Pananá E, Martínez-López J, Camorlinga-Ponce M. Evidence of Epstein-Barr Virus Association with Gastric Cancer and Non-Atrophic Gastritis. *Viruses.* 2014;6(1):301-318. doi:10.3390/v6010301
 94. Cárdenas-Mondragón MG, Carreón-Talavera R, Camorlinga-Ponce M, Gomez-Delgado A, Torres J, Fuentes-Pananá EM. Epstein Barr Virus and Helicobacter pylori Co-Infection Are Positively Associated with Severe Gastritis in Pediatric Patients. *PLoS One.* 2013;8(4). doi:10.1371/journal.pone.0062850
 95. Camargo MC, Sivins A, Isajevs S, et al. Associations of epstein-barr virus-positive gastric adenocarcinoma with circulating mediators of inflammation and immune response. *Cancers (Basel).* 2018;10(9):1-7. doi:10.3390/cancers10090284
 96. Fuentes-Pananá EM, Camorlinga-Ponce M, Gómez-Delgado A, et al. Elevated Levels of Interferon- γ Are Associated with High Levels of Epstein-Barr Virus Reactivation in Patients with the Intestinal Type of Gastric Cancer . *J Immunol Res.* 2017;2017:1-10. doi:10.1155/2017/7069242
 97. Cárdenas-Mondragón MG, Torres J, Flores-Luna L, et al. Case-control study of Epstein-Barr virus and Helicobacter pylori serology in Latin American patients with gastric disease. *Br J Cancer.* 2015;112(12):1866-1873. doi:10.1038/bjc.2015.175
 98. Saju P, Murata-Kamiya N, Hayashi T, et al. Host SHP1 phosphatase antagonizes Helicobacter pylori CagA and can be downregulated by Epstein-Barr virus. *Nat*

- Microbiol.* 2016;1:16026. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.26
99. Pandey S, Jha HC, Shukla SK, Shirley MK, Robertson ES. Epigenetic Regulation of Tumor Suppressors by *Helicobacter pylori* Enhances EBV-Induced Proliferation of Gastric Epithelial Cells. 2018;9(2):1-15.
 100. Lin WC, Tsai HF, Kuo SH, et al. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into human B lymphocytes, the origin of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer Res.* 2010;70(14):5740-5748. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4690
 101. Kiedrowski MR, Bomberger JM. Viral-Bacterial Co-infections in the Cystic Fibrosis Respiratory Tract. *Front Immunol.* 2018;9(December):3067. doi:10.3389/fimmu.2018.03067