

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***Rol de la proteína viral BamHI-A rightward frame 1 de virus  
Epstein-Barr en la oncogénesis del cáncer de pulmón de  
células no pequeñas***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado  
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en  
Bioquímica Clínica y Memoria para optar al Título de  
Bioquímico por:**

***ÁLVARO IGNACIO ARMIJO CRUZ***

**Director de Tesis: Dr. Francisco Aguayo González**

**Dra. Carmen Romero Osses**

**Santiago-CHILE**

**Julio 2023**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**ÁLVARO IGNACIO ARMIJO CRUZ**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Clínica y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día \_\_\_\_\_

**Director de Tesis:**

**Dr. Francisco Aguayo G.**

\_\_\_\_\_

**Dra. Carmen Romero O.**

\_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Dante Miranda W.**

\_\_\_\_\_

**Dra. Vivian Luchsinger F.**

\_\_\_\_\_

**Dr. Javier Puente P.**

\_\_\_\_\_

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis, por haberme dado la oportunidad. Por abrir las puertas de sus laboratorios cuando todo era aún nuevo para mí, muchas gracias.

Al personal del Laboratorio de Endocrinología del hospital, por cada celebración compartida y cada conversación que más de una sonrisa nos dejaba. Agradecimientos particulares al gran equipo que formamos en investigación, compartir los días con Ignacio, Allison y la Dra. Maritza siempre fue un agrado y siempre atesoraré su gran compañía, incluso en los días en que las cosas no salían del todo bien. Agregar también a Julio Osorio, importante mentor en el trabajo realizado.

A toda la hermosa gente que conocí por el paso de mi vida universitaria, nunca olvidaré a ninguna de las personas que me acompañó en este proceso, sobre todo a amigos que me acompañaron hasta el final Ignacio, Joaco y Diego, gracias por el apoyo y la preocupación constante.

Especiales gracias a mi madre, que siempre fue el pilar que mantenía posible mi oportunidad de estudiar en la Universidad y siempre estuvo para mí, día a día aguantando mi cansancio y apoyándome para salir adelante, mi Mamá Ferrero. También a mis hermanos, que siempre han estado para apoyarme en lo que necesite y constantemente me animan a salir adelante.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS</b>	IV
<b>ÍNDICE DE ILUSTRACIONES</b>	VII
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	VIII
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	IX
<b>FINANCIAMIENTO</b>	X
<b>RESUMEN</b>	XI
<b>ABSTRACT</b>	XIII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. Cáncer de pulmón	1
1.2. Fisiopatología del NSCLC	4
1.3. Transición epitelio mesénquima	5
1.4.1 Virus Epstein-Barr y su ciclo replicativo	6
1.4.2 Ciclo lítico abortivo del EBV	9
1.5. Detección de EBV en carcinomas	10
1.6. EBV y oncogénesis	11
1.7. BARF1 en carcinomas	12
<b>2. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	16
<b>3. METODOLOGÍA</b>	
3.1. Líneas celulares	18
3.2 Transfección estable	19
3.3. Ensayos de proliferación celular	20
3.4. Migración celular	21
3.5. Invasión celular	21
3.6. Western blotting	22
3.7. Detección de EBV en tumores de pulmón	25

3.8. Detección de BARF1 en tejidos de pulmón	26
3.9 RT-PCR de cultivos celulares	26
3.10. Análisis estadístico	27
<b>4. RESULTADOS</b>	
<b>4.1. Resultados del Objetivo N°1</b>	
4.1.1. Ensayo de proliferación	29
<b>4.2. Resultados del Objetivo N°2</b>	
4.2.1. Ensayos de migración	30
4.2.2. Ensayos de invasión	32
4.2.3. Ensayos de western blot	34
<b>4.3. Resultados del Objetivo N°3</b>	
4.3.1. Ensayos de PCR	36
<b>4.4. Resumen de resultados y conclusiones</b>	37
<b>5. DISCUSION</b>	39
<b>6. ANEXOS</b>	52
ANEXO 1: Transfección estable	52
ANEXO 2: Productos de PCR ejemplo de resultados EBV+	53
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	54

## ABREVIATURAS

AdC: Adenocarcinoma pulmonar

ADN: ácido desoxirribunucleico

ADNc: ácido desoxirribunucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ALK: Quinasa de linfoma anaplásico

BARF1: BamHI-A rightward frame 1

BARTs: Bam A rightward transcript

Bcl-2: linfoma de célula B 2

CCK-8: Cell counting kit 8

CLA: Ciclo lítico abortivo

c-Myc: Factor de transcripción oncogénico de la familia básico hélico-lazo-hélice (b-HLH)

CR2: Receptor de complemento 2

DMEM: Medio de águila modificado de Dulbecco (del inglés Dulbecco's modified eagle médium)

dNTP: desoxinucleótidos trifosfato

EBER1: ARN codificado de virus Epstein-Barr 1

EBER2: ARN codificado de virus Epstein-Barr 2

EBNA: antígeno nuclear 1 de virus Epstein-Barr

EBV: Virus Epstein-Barr

ECM: Matrix extracelular (del inglés Extracellular matrix)

EphA2: Receptor 2 de efrina tipo A (del inglés Ephrin type-A receptor 2)

EGFR: receptor de factor de crecimiento epidermal

HRP: enzima peroxidasa de rabanito picante

h-TERT: enzima telomerasa transcriptasa inversa

kDa: kilo daltons

LCC: carcinoma de células grandes

LELC: carcinoma tipo linfocarcinoma

LMP1: proteína latente de membrana 1

LMP2: proteína latente de membrana 2

MMLV: transcriptasa reversa Moloney Murine Leukemia Virus

MMP: Metaloproteasas de matriz extracelular

MSCV: Murine stem cell virus

NSCLC: Cáncer de pulmón de células no pequeñas

OMS: Organización mundial de la salud

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción de polimerasa en cadena

RIPA: tampón de radioinmunoprecipitación

RPMI: Roswell Park Memorial institute

RT-PCR: reacción de polimerasa en cadena con transcriptasa reversa

SCLC: cáncer de pulmón de células pequeñas

SDS: dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal de bovino

SQC: Carcinoma de células escamosas

TBS: Solución salina de tris

TEM: transición epitelio mesénquima

TNM: Tumor-nodo-metastasis

ZEB1: zinc finger E-box-binding homeobox1

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

---

<b>Ilustración 1</b>	Resumen gráfico	15
----------------------	-----------------	----

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Ensayo de proliferación de células pulmonares	30
<b>Figura 2</b>	Ensayos de migración en células pulmonares	31
<b>Figura 3</b>	Ensayos de invasión en células pulmonares	33
<b>Figura 4</b>	Análisis de Western blot	35

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Anticuerpos utilizados para western blotting	24
<b>Tabla 2</b>	Partidores PCR	25
<b>Tabla 3</b>	Partidores RT-PCR	28
<b>Tabla 4</b>	Presencia de genoma viral y transcritos de BАРF1 en tejidos de cáncer de pulmón	37

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo de investigación fue financiado a través de los siguientes proyectos:

- Proyecto Fondecyt 1221033 (Francisco Aguayo)
- Proyecto Fondecyt 1220479 (Carmen Romero)

## RESUMEN

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte asociada a cáncer en el mundo. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) representa el 85% de los casos, comprendiendo diversos subtipos, tales como el adenocarcinoma (AdC) y carcinoma de células escamosas (SQC). Se ha reportado la presencia del virus Epstein-Barr (EBV) en NSCLCs, el cual es un herpesvirus con un rol en el desarrollo de carcinoma nasofaríngeo, cáncer gástrico y linfomas. Esto se debe a la capacidad del virus de permanecer en estado de latencia en esos tipos celulares. Además, el EBV puede establecer un ciclo lítico abortivo (CLA), en el cual el virus expresa ciertas proteínas pertenecientes a su ciclo lítico que pueden ejercer funciones oncogénicas. BamHI-A rightward frame 1 (BARF1) es una proteína lítica temprana que promueve progresión del ciclo celular, inhibición de apoptosis, evasión de la respuesta inmune e inmortalización celular. Esta proteína se ha encontrado expresada en carcinomas asociados a la infección por EBV. En esta tesis se plantea que BARF1 promueve cambios fenotípicos y propiedades tumorales de células epiteliales pulmonares. El objetivo es caracterizar los cambios fenotípicos promovidos por BARF1 en células de pulmón normales y tumorales. Se usaron las líneas celulares pulmonares A549 y BEAS-2B, las cuales fueron transfectadas establemente con un constructo codificante para BARF1. Se evaluó proliferación, migración e invasión celular y transición epitelial mesenquimal (TEM). Finalmente, se analizó la presencia de EBV en NSCLCs de pacientes chilenos y transcritos de BARF1. Se encontró que la expresión de BARF1 correlaciona con una mayor proliferación, capacidad migratoria e invasiva de células de pulmón. Finalmente, esta tesis confirma la presencia de EBV y BARF1 en algunos casos de NSCLCs de pacientes chilenos. Se concluye que EBV y BARF1 podrían estar involucrados en el desarrollo de ciertos casos de

cáncer pulmonar. Se necesitan estudios adicionales para confirmar estos hallazgos.

## ABSTRACT

Lung cancer is the first cause of cancer-related deaths worldwide. Non-small cell lung cancer represents 85% of all lung cancer diagnosed worldwide, including a plethora of subtypes of cancer, namely adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, among many others. Lately, several studies have confirmed the presence of Epstein-Barr virus in NSCLC cases. EBV is a herpesvirus associated with the development of many types of cancer in the human body, such as nasopharyngeal and gastric carcinoma and lymphomas. This have been related to the EBV capacity of developing a persistent infection and the establishment of a latency state in the human cells. In the context of a viral latency, it has been proved that EBV can undergo an abortive-lytic cycle, where the EBV expresses lytic cycle proteins but does not achieve cellular lysis. Among these lytic proteins, arises BamHI-A rightward frame 1 (BARF1), an early lytic protein with many notable properties, such as cell cycle promotion, apoptosis inhibition, cellular immortalization, and immune evasion. This protein has been exclusively found in EBV-related carcinomas. The hypothesis of this work establishes BARF1 as a protein that can promote phenotypical changes and oncogenesis in epithelial lung cells. The main goal of this work is to characterize those phenotypical changes *in vitro*, using healthy and cancerous lung cell models. Thereby, we transfected A549 and BEAS-2B cell lines to make them express BARF1 consistently, to study changes in cellular proliferation, migration and invasion, along with epithelial-mesenchymal transition. Finally, we studied the presence of EBV in Chilean NSCLC cases and their expression of BARF1. In this work we found that BARF1 expression correlated with increased cell proliferation, migration and invasion *in vitro*. Finally, we confirmed the presence of EBV and transcripts of BARF1 in Chilean NSCLC cases.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es una enfermedad neoplásica heterogénea desarrollada a partir de distintos tipos de células epiteliales del pulmón. Esta patología corresponde al segundo tipo de cáncer más diagnosticado en el mundo, con 2.206.771 casos reportados mundialmente el año 2020 (1). Además, representa la primera causa de muerte asociada a cáncer con 1.796.144 defunciones asociadas a él en 2020 (1). En el contexto nacional, los estudios de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) para el 2020 posicionaron al cáncer de pulmón como el quinto tipo de cáncer más diagnosticado en Chile, con 3.969 nuevos casos; lo cual se asocia a la importante cifra de fallecidos a causa de cáncer de pulmón, correspondiente a 3.550 y posiciona al cáncer de pulmón en el primer puesto de muertes asociadas a cáncer en Chile en 2020, seguido por cáncer de estómago y cáncer de próstata (2). Dentro de los factores de riesgo asociados al cáncer de pulmón, podemos destacar al hábito de fumar cigarrillos como el más importante (3–5). Sin embargo, también existen otros factores, tales como el humo del tabaco ambiental, la exposición a radón y diversos carcinógenos ocupacionales a los que se ha asociado riesgo de cáncer de

pulmón, entre los que se puede destacar arsénico, asbesto y níquel (revisado en (5)).

Un estudio en pacientes de cáncer de pulmón destaca al dolor abdominal, la tos, pérdida del aliento y presencia de hemoptisis (tos con sangre) como los síntomas más comunes en la aparición de cáncer de pulmón (6). Una detección temprana puede facilitar un tratamiento a través de remoción del tumor, puesto que el rango de supervivencia a 5 años en NSCLCs cuando el tumor es removible es 50 a 70%, mientras que en pacientes en los cuales el tumor ya se ha diseminado, esta sobrevida disminuye a un rango entre 2 y 5% (7).

El cáncer de pulmón es un tipo de cáncer con gran diversidad y heterogeneidad, presentando una gran gama de clasificaciones en comparación con otros tipos de cáncer. El sistema de clasificación Tumor-nodo-metástasis (TNM) para cáncer de pulmón, se encarga de clasificar la etapa en la que se encuentra el tumor. El 2017, la octava edición publicada por el comité de la *International association for the Study of Lung Cancer* clasificó todas las etapas en las que puede encontrarse el cáncer de pulmón (8) (revalidado en 2020 (9)). Esta clasificación sirve para determinar de manera más rigurosa la enfermedad que enfrentan los pacientes, entregando así diferentes pronósticos y tratamientos para cada una de sus etapas (10). Paralelamente, existen 2 grandes grupos de cáncer de pulmón: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). En primer lugar, los SCLC

representan cerca del 15% de los casos nuevos de cáncer de pulmón, mientras que el 85% restante se atribuye a casos de NSCLC (11). De esta forma, los SCLC representan un tipo de cáncer menos común, el cual se caracteriza por una alta tasa de proliferación, predilección por una metástasis temprana, mal pronóstico y generalmente con mayor incidencia en población fumadora (12). Por otra parte, los NSCLC son un tipo de cáncer más común y comprenden una gran variedad de subtipos de cáncer de pulmón, entre los que se puede destacar: AdC, SQC y carcinoma de célula grande (LCC) (13). Los NSCLCs suelen ser ampliamente metastásicos y altamente agresivos, se ha visto que más de un 40% de los pacientes con NSCLC son diagnosticados cuando ya presentan una metástasis; siendo los huesos, pulmón adyacente, cerebro, glándulas adrenales e hígado los lugares metastásicos más comunes (14,15). En concordancia con lo anterior, NSCLC es una enfermedad altamente heterogénea, lo cual se traduce en un distinto tratamiento para la correspondiente etapa del cáncer, de esta forma, los tumores se clasifican en 3 categorías: tumor resecable, tumor localmente avanzado y NSCLC avanzado.

## 1.2 Fisiopatología del NSCLC

Con respecto a la fisiopatología del NSCLC, se destacan ciertos oncogenes involucrados en su desarrollo, como por ejemplo, ciertas mutaciones activantes del gen codificante para el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), traslocaciones en el gen para la quinasa de linfoma anaplásico (ALK) y KRAS, siendo este último encontrado en distintas etapas de la progresión del tumor, lo cual puede atribuirse a acciones oncogénicas primarias (16). Además, la presencia de la mutación en el gen KRAS ocurre mayoritariamente en AdC, mientras que en tumores escamosos es menos frecuente y completamente ausente en SCLC (13). Por otra parte, mutaciones en genes como TP53 se detectan con mayor frecuencia a medida que progresa la enfermedad, lo cual puede sugerir un rol más asociado al avance del cáncer, pero destacando que la aparición de esta mutación se asocia fuertemente a un peor pronóstico (17).

Hay evidencia que el cáncer pulmonar de personas fumadoras presenta menor cantidad de mutaciones en estos genes, en comparación con muestras de tumorales de pulmón de personas no fumadoras (18). Dentro de estas mutaciones es importante destacar que la sobreexpresión de Ciclina D1 (19) y c-Myc (20) son elementos principales en la carcinogénesis de NSCLC; junto a eso, se ha descrito que en la mayoría de los tejidos de NSCLC se encuentra una gran expresión y actividad de la proteína telomerasa (h-TERT), lo cual está

asociado a etapas más tempranas de la tumorigénesis (21,22). Las anomalías *driver* de genes EGFR y ALK ocurren en un 10 a 60% de los AdC (siendo esto más frecuente en personas no fumadoras y con mayor incidencia en personas de ascendencia asiática) (18). También, cabe destacar que ambos genes TP53 y RB1 se pierden tanto en NSCLC como en SCLC (13).

### **1.3 Transición epitelio mesénquima**

Un importante precedente para la agresividad asociada a los distintos tipos de cáncer de pulmón es el proceso de TEM. La TEM corresponde a un proceso natural del organismo, el cual ocurre dentro del desarrollo embrionario para la formación de distintos órganos (23). Este proceso está asociado a una reprogramación genética que permite el paso desde un fenotipo celular epitelial hacia un fenotipo mesenquimal; las células epiteliales se caracterizan por tener una polaridad apical y basal definidas, además de ser células con crecimiento laminar y ordenado, con uniones celulares estrechas, desmosomas y uniones adherentes, lo cual permite que las células crezcan firmemente unidas entre sí; por otra parte, el fenotipo mesenquimal corresponde a células sin polaridad celular, con forma más alargada e inespecífica, carente de uniones celulares y una mayor expresión en enzimas proteolíticas que permiten la destrucción de la matriz extracelular (ECM) (24). Todas estas características les confieren a

las células mesenquimales un fenotipo más invasivo, el cual se ha asociado al proceso de metástasis en cáncer, aquí las células tumorales migran desde el tumor primario hacia distintos órganos, en donde logran asentarse y diseminar la enfermedad en el organismo.

### **1.3 Virus Epstein-Barr y su ciclo replicativo**

El virus Epstein-Barr (EBV) es un virus persistente latente perteneciente a la familia *Herpesviridae* con genoma de ADN de doble hebra lineal. Este virus está presente en cerca de un 90% de la población mundial (25) lo cual se relaciona al modelo de infección que establece, infectando tanto a células epiteliales como linfocitos. El EBV puede establecer dos distintos estados en la célula infectada: ciclo de latencia y ciclo lítico. En el caso del ciclo de latencia, este se observa principalmente cuando el virus infecta linfocitos B (26). El virus entra a los linfocitos gracias a sus proteínas de membrana gp350 para el reconocimiento de las proteínas CD21 (Receptor de complemento 2 (CR2)) linfocitarias, las cuales interactúan para permitir el ingreso del EBV a la célula (27,28). Una vez al interior del núcleo, el genoma de EBV se comporta como un plásmido circular cerrado, el cual es anclado al genoma celular gracias a la proteína viral antígeno nuclear 1 de EBV (EBNA1) para mantenerse en el ADN de su hospedero. La secuencia viral *oriP*, permite la interacción de EBNA1 con el ADN del hospedero y la replicación

del virus (29,30). Esto le permitiría a EBV iniciar ambos ciclos lítico y latente; sin embargo, durante el ciclo latente, el virus se mantiene expresando un limitado número de proteínas, las cuales no son suficientes para generar partículas virales infectivas y le permite al virus persistir en el hospedero sin ser reconocido por células del sistema inmune. Con respecto a los genes virales expresados en el ciclo de latencia, se pueden diferenciar 4 distintos grupos de expresión génica, los cuales se han asociado a distintos tipos de ciclos de latencia viral: Latencia tipo 0, caracterizada por no expresar proteínas y expresar la menor cantidad de genes virales, correspondientes a: EBER1, EBER2, RPMS1 y microRNAs; lo cual está más asociado a linfocitos B. Además, podemos encontrar latencias de tipo I, II y III, las cuales se caracterizan por expresar los mismos productos que la latencia 0, más EBNA1 y un cada vez mayor número de productos virales. La latencia tipo III es el estado en el cual se expresa el espectro completo de genes de latencia virales (31). Sin embargo, este espectro de proteínas virales sigue siendo un número muy reducido, de tal forma que esto estaría ayudando a que EBV evada al sistema inmune y así no sea eliminado del organismo (32). Por otra parte, ocurren periodos de reactivación en los cuales EBV comienza a realizar su ciclo lítico. Este cambio implica la expresión de los genes inmediatos tempranos BZLF1 y BRLF1, los cuales codifican para las proteínas virales Zta y Rta, respectivamente (33,34). Dichas proteínas actúan como transactivadores de factores virales y celulares, permitiendo así una expresión génica controlada para la replicación de

ADN viral e iniciando así el ciclo lítico para la generación de viriones, principalmente durante la activación de linfocitos B. Esto ayudaría al virus a generar más copias virales para la diseminación viral (31). Junto a eso, EBV es capaz de infectar células epiteliales gracias a proteínas superficiales como gB (para la fusión de membranas) y al complejo de unión a receptores compuesto por las proteínas gH y gL, las cuales pueden reconocer a los receptores celulares  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$  y EphA2 de células epiteliales (35,36). Todo esto permite la entrada del virus en células epiteliales, en las cuales el virus establece automáticamente un ciclo lítico y no uno de latencia (37). De esta forma, el ciclo lítico comprende el proceso replicativo en el cual se expresa la totalidad de genes virales, lo que involucra la generación de viriones que son liberados generando lisis celular. Dicho proceso, ocurre principalmente en células epiteliales y no en linfocitos (35, 36).

El origen de replicación viral en el ciclo lítico inicia en el oriLyt (34), a diferencia del ciclo de latencia (en donde el origen de replicación viral corresponde a OriP). El ciclo lítico es un proceso que requiere con mucha mayor importancia la acción de proteínas virales, siendo que existen 7 genes virales esenciales para la replicación viral lítica de EBV, los cuales corresponden a BZLF1, BALF5, BMRF1, BALF2, BBLF4, BSLF1, BBLF2/3 (39). Dentro de estas, BALF5 corresponde a la subunidad catalítica de la DNA polimerasa viral y BMRF1 corresponde a una subunidad accesoria de la misma polimerasa (33). El modelo propuesto para la

iniciación del ciclo lítico comprende la formación de un complejo macromolecular en el oriLyt, el cual contiene a la proteína BZLF1 y a los factores de transcripción ZBP-89 y Sp1.

#### **1.4 Ciclo lítico abortivo del EBV**

Además, se destaca la existencia del ciclo lítico abortivo (CLA), el cual involucra la expresión de genes de latencia, más un restringido set de genes correspondientes al ciclo lítico, el cual no concluye con maduración viral y una consecuente lisis celular (40,41). Evidencia reciente indica que el CLA tiene una gran relevancia en la génesis de tumores asociados a la infección por EBV (42–44). Esto último ocurre gracias a la capacidad del virus de persistir dentro de las células infectadas, pudiendo expresar un restringido número de proteínas oncogénicas y evadir al sistema inmune. De esta forma, el EBV logra realizar una gran cantidad de acciones que promueven una transformación celular. Concordantemente, existen proteínas oncogénicas provenientes desde el EBV, entre las cuales se pueden destacar la proteína latente de membrana 1 (LMP1) y BamHI-A rightward frame 1 (BARF1). LMP1 es una proteína viral de latencia, la cual se ha descrito como oncogénica y corresponde a una de las principales proteínas requeridas para la immortalización de linfocitos B inducida por EBV (45,46). Además, se le atribuyen diversas funciones oncogénicas, tales como la

sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como BCL-2 y A20, a través de la vía de señalización NF-kB (47,48). En efecto, LMP1 funciona como un análogo viral de CD40, lo cual estimula vías de señalización que promueven señales de proliferación celular (47). De esta forma, LMP1 es reconocida como una de las proteínas claves para la aparición del cáncer asociado a EBV.

### **1.5 Detección EBV en distintos tipos de carcinomas**

El EBV ha sido detectado en una gran variedad de carcinomas, tales como carcinoma nasofaríngeo (37,49) y un subgrupo de cánceres gástricos (50), en los cuales EBV tiene una participación causal. Además, EBV se ha encontrado en cáncer de mama (51) y cáncer de pulmón (52-57), aunque no se ha establecido un rol etiológico de EBV en estos tumores. Se ha encontrado la presencia de EBV en cáncer pulmonar, lo cual nos habla de la existencia de cierto tropismo del virus por este tipo celular. En este contexto, se ha descrito que EBV está mayormente asociado a subtipos correspondientes a NSCLC, tales como: carcinoma tipo linfoepitelioma (LELC), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de pulmón de célula escamosa (53,54). Actualmente, en la literatura se destaca la gran variabilidad de la detección de EBV en cáncer de pulmón en los distintos reportes. Existen diversas causas metodológicas que pueden explicar este hecho, tales como el tipo de técnica utilizada o el tipo de muestra empleada (52). Como se mencionó previamente, EBV es más característico en ciertos subtipos de

NSCLCs, considerando esto, datos epidemiológicos en China de presencia de EBV en LELC dan cuenta de importantes cifras, en donde se ha reportado un 93.8% de LELCs presentan EBV a través de ensayos de hibridación *in situ* para EBERs de EBV (53), mientras que otros estudios en China y Taiwán encontraron positivities del 100% (54,55), en donde se destaca que 91 muestras de LELC presentaban alteraciones en vías de señalización correspondientes a proliferación celular (54). Finalmente, considerando otros subtipos de NSCLCs, un estudio en España reportó presencia de EBV en 12 de 19 casos (63.2%) de Adc y SQC (56); mientras que otro estudio en Italia reportó presencia de EBV en 21 de 65 muestras de NSCLCs (26%) a través de PCR en tiempo real (57). Sin embargo, también existe data diametralmente opuesta; en un estudio en Francia examinando 122 casos de NSCLC, no encontraron presencia de EBV en ninguno de ellos (58), otro estudio con aproximación transcriptómica, en el cual 3 casos fueron positivos para transcritos de EBV de un total de 1017 NSCLCs analizados (59). Todo esto da cuenta de la incertidumbre que existe con respecto a un posible rol de EBV en la etiología de los NSCLCs.

## **1.6 EBV y oncogénesis**

Considerando todo lo anterior, es importante mencionar que el EBV está asociado a la aparición de distintos tipos de cánceres, tales como: linfomas de Burkitt, linfoma de Hodgkin, carcinoma gástrico y carcinoma nasofaríngeo (44, 49, 50, 52–58).

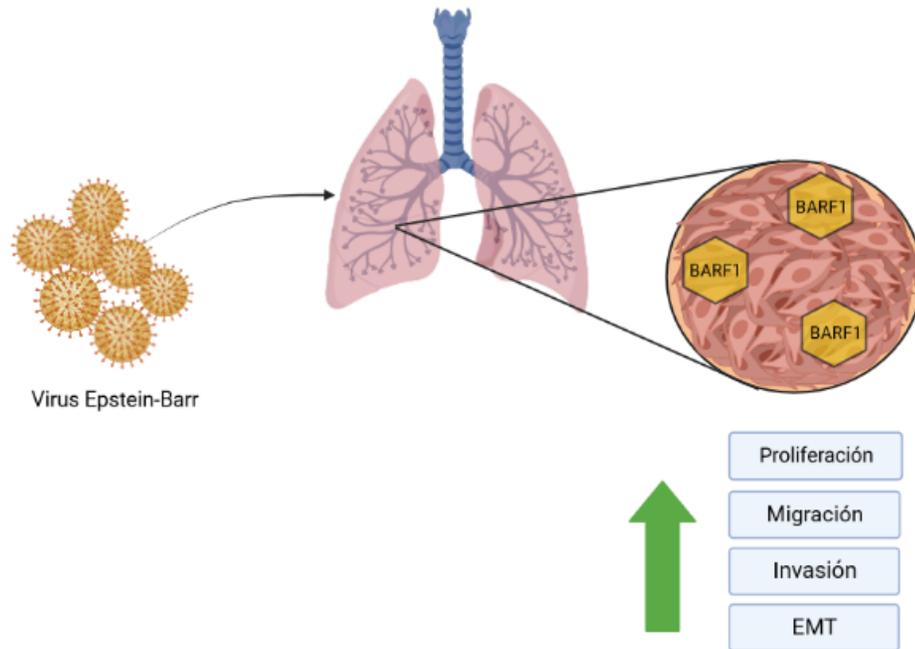
Como se mencionó previamente, el EBV predominantemente establece un ciclo lítico en células epiteliales; sin embargo, el grupo de Tsang y colaboradores demostraron que las células de faringe podían presentar una infección estable con EBV tras la afección de células con mutaciones oncogénicas previas (37), tales como sobreexpresión de ciclina D1 y Bmi-1 en conjunto con una supresión de la activación de p16, los cuales son procesos importantes para la oncogénesis del carcinoma nasofaríngeo. Una vez dentro de la célula, el EBV es capaz de expresar una gran cantidad de proteínas con acciones oncogénicas en células epiteliales, tales como EBNA1, EBER1/2, LMP1, LMP2, BARTs y BARF1 (60), las cuales se han asociado a inmortalización celular, resistencia a apoptosis, aumento de proliferación celular y disminución de la actividad del sistema inmune (55). De esta forma, el EBV se ha asociado a la oncogénesis de linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma gástrico y a la fecha se sigue estudiando el rol que podría tener en una diversa cantidad de distintos carcinomas.

## 1.7 BARF1 en carcinomas

BARF1 es una proteína viral lítica, cuya expresión está subordinada a la actividad de las proteínas inmediatas tempranas Zta y Rta (61), la cual también posee gran potencial oncogénico asociado a las distintas funciones que se han podido caracterizar de ella, tales como: capacidad de inmortalización celular, aumento de proliferación celular, incremento de señales anti apoptóticas, disminución de señales pro apoptóticas y evasión del sistema inmune (revisadas en (62)). Con más detalle, se ha descrito que BARF1 es capaz de aumentar los niveles de la ciclina D1 tanto a niveles de transcrito como de proteína, lo cual se relaciona directamente con una mayor progresión del ciclo celular desde fase G1 a S (63,64); junto con eso, en experimentos con líneas celulares EBV (-) se ha visto que la presencia de BARF1 se asocia a una menor expresión del supresor de tumores p21<sup>WAF1</sup>, un importante regulador del ciclo celular (64). Además de todo esto, BARF1 está asociado a diversas actividad antiapoptóticas, para las cuales se han definido ciertos blancos de acción de la proteína; de entre los cuales se puede destacar la acción que realiza BARF1 sobre la proteína caspasa 3, una proteína clásicamente proapoptótica, la cual se ha visto reducida significativamente en líneas celulares de cáncer gástrico que expresan ectópicamente BARF1 (65); además, BARF1 ejerce una acción sobre la enzima telomerasa (hTERT), aumentando su actividad con el fin de generar una inmortalidad replicativa en las células, lo cual es acompañado con un aumento de

c-Myc para fomentar la expresión de la telomerasa y de Bcl-2 para reducir la apoptosis (66). Finalmente, otro antecedente importante a destacar, es la especificidad que BARF1 podría tener en la oncogénesis sobre carcinomas, ya que se ha visto que BARF1 se expresa constitutivamente en ciclo lítico de tumores epiteliales asociados a EBV, sin embargo, no en linfomas EBV (+) (66,67); en adición a esto, en carcinoma gástrico asociado a EBV, se ha encontrado que existe efectivamente expresión de BARF1 en ausencia de LMP1, por lo cual, el rol oncogénico de BARF1 podría ser mayor que el de LMP1 en ese contexto (68). Todo esto nos permite pensar que el rol de la proteína viral BARF1 podría ser un motivo de gran interés en la génesis de diversos cánceres epiteliales.

El objetivo de esta tesis es estudiar la capacidad de la expresión del ARNm de la proteína BARF1 de EBV para promover cambios fenotípicos tumorales en células epiteliales de tejidos de pulmón normal y cancerígeno. Para esto, se realizó un estudio epidemiológico de incidencia de EBV en 50 muestras de tejido de pulmón de pacientes con NSCLC en Chile, más específicamente “carcinoma de célula escamosa” y “adenocarcinoma pulmonar”, con el fin de caracterizar la presencia del virus en ellas. Adicionalmente, se evaluaron características fenotípicas en líneas celulares de pulmón, las cuales fueron transfectadas para la expresión estable de la proteína viral BARF1, con el fin de caracterizar la importancia de esta proteína en la promoción de características tumorales de pulmón *in vitro*.



**Ilustración 1. Resumen gráfico.** El Virus Epstein-Barr sería capaz de establecerse de manera no lítica en células epiteliales pulmonares, pudiendo ahí expresar la proteína oncogénica BARF1, la cual sería capaz de promover un fenotipo celular cancerígeno en células de pulmón, aumentando así su capacidad de proliferar, migrar, invadir y promoviendo la transición epitelial-mesenquimal

## 2. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Considerando la presencia del EBV en distintos casos de cáncer de pulmón y el rol de EBV en carcinomas en los cuales se ha establecido su rol en oncogénesis, destacando particularmente la proteína lítica temprana BARF1, con sus distintas funciones y presencia en carcinomas, la hipótesis planteada es:

***“La expresión del ARNm de la proteína BamHI-A rightward frame 1 (BARF1) de virus Epstein-Barr promueve cambios fenotípicos y propiedades tumorales de células epiteliales pulmonares”.***

**Objetivo General:** Caracterizar cambios fenotípicos y propiedades tumorales promovidos por la expresión del ARNm de la proteína BamHI-A rightward frame 1 (BARF1) de virus Epstein-Barr en células epiteliales pulmonares normales y cancerígenas.

**Objetivos específicos:**

1. Determinar cambios en la tasa de proliferación de líneas celulares pulmonares que expresan ectópicamente la proteína BARF1.

2. Evaluar transición epitelial mesenquimal (TEM) a través de marcadores moleculares y la capacidad migratoria de células de pulmón que expresan ectópicamente la proteína BARF1.
3. Comprobar la presencia de infección por EBV y expresión de BARF1 en muestras clínicas de carcinoma de célula escamosa y adenocarcinoma pulmonar.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Líneas celulares**

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron líneas celulares de pulmón A549 y BEAS-2B. La línea celular A549 corresponde a un modelo de AdC, obtenida a partir de epitelio alveolar basal de un paciente masculino de 58 años; por otra parte, las células BEAS-2B corresponden a un modelo de células epiteliales bronquiales, obtenidas a partir de una persona que no cursaba un cáncer de pulmón.

##### **3.1.1 Cultivo celular**

Las células A549 y BEAS-2B fueron mantenidas y subcultivadas en diferentes medios de cultivo. Para las células A549 se utilizó medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 y para las células BEAS-2B se utilizó medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Ambos medios de cultivo fueron suplementados en un 10% con suero fetal de bovino (SFB) y con los antibióticos penicilina y estreptomina (1X). Ambas líneas celulares se mantuvieron a una temperatura de 37°C y una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Una vez alcanzado un 80% de confluencia, las células fueron lavadas mediante tampón fosfato salino 1X (PBS) y fueron tratadas con tripsina EDTA 1X por 5 minutos a 37°C para las células A549 y por 4

minutos para las células BEAS-2B. El número de células fue determinado manualmente utilizando una cámara de Neubauer para cada situación experimental.

### **3.2 Transfección estable**

Se sembraron 150.000 células A549 o BEAS-2B en 2 mL de medio de cultivo (RPMI para células A549 y DMEM para las células BEAS-2B) suplementado con 10% de SFB, más penicilina y estreptomina. Este sembrado se realizó por triplicado en placas de 6 pocillos, tanto para generar células que expresen la proteína BARF1, como para generar células transfectadas con vector vacío (como condición control). Además, en cada placa se añadió un control consistente de células “mock”, las cuales no recibieron el vector plasmidial y fueron usadas como control de selección. Para la transfección se utilizó el reactivo Fugene HD (o Fugene 6 para las células BEAS-2B, siguiendo el mismo protocolo), en combinación con 2 vectores MSCV, un vector codificante para la proteína BARF1 conteniendo un gen de selección para conferir resistencia a puromicina; y un vector vacío, el cual solo presenta el gen de resistencia a puromicina. Todas estas células se dejaron crecer durante 24 h hasta un 80% de confluencia el día de la transfección. Al día siguiente: Se prepararon 2 alícuotas de reactivo de transfección, las cuales se reconstituyeron en 300 µL de medio de cultivo durante 5 min. Posteriormente, el reactivo diluido se mezcló con 2 µg de vectores. Esta

mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, se agregó la mezcla de medio + Fugene y vector plasmidial por triplicado en las células sembradas el día anterior. Luego de 24 h, se inició la selección, suplementando el medio de crecimiento con 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de puromicina. Este proceso se realizó durante una semana, hasta que las células “mock” fueron eliminadas y se observara la presencia de colonias en los pocillos con las células transfectadas. Finalmente, se tomaron múltiples colonias y se cultivaron para los experimentos subsecuentes, las cuales fueron suplementadas con puromicina en una concentración de 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante los pasajes posteriores.

### **3.3 Ensayos de proliferación celular**

Para realizar ensayos de proliferación celular se utilizó el reactivo CCK-8. Este reactivo contiene la sal de tetrazolio WST-8, la cual es reducida por deshidrogenasas celulares para formar una coloración amarilla soluble en medios de cultivos, cuya intensidad es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas. En 3 placas de 96 pocillos se cultivaron 3.000 células transfectadas con vector BARF1 y vector vacío para las líneas celulares A549 o BEAS-2B por triplicado en 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo (RPMI para células A549 y DMEM para células BEAS-2B). Luego de 24, 48 y 72 h de cultivo, se adicionó reactivo CCK8 en dilución 1:10 en medio de cultivo. Dichos cultivos se incubaron

a 37°C por 4 h, para luego realizar la medición colorimétrica a 450 nm en un espectrofotómetro. A partir de las mediciones tras 24, 48 y 72 h del experimento, se realizó una curva que muestra el crecimiento de las células.

### **3.4 Migración celular**

La capacidad migratoria de las células pulmonares se estudió a través de ensayos de migración mediante Transwell. Un día previo al ensayo, se recubrió la cámara inferior del inserto con 80 µL de fibronectina 3 µg/mL y se incubó a 4°C durante toda una noche. Posteriormente, se sembraron 1.5x10<sup>5</sup> células A549 o 4x10<sup>5</sup> BEAS-2B en la cámara superior de un inserto de Transwell en 200 µL de medio de cultivo sin SFB. Por otra parte, en la cámara inferior del inserto se añadieron 500 µL de medio de cultivo suplementado con 10% de SFB, como quimioattractante. Las células migraron por 4 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se descartó el medio de cultivo y las células fueron sometidas a tinción mediante cristal violeta 1x (diluido en metanol) durante toda la noche. Al día siguiente, se lavó el exceso de tinción y las células no migrantes fueron removidas con un algodón, para luego contar células al microscopio. Se tomaron fotos de 10 secciones del inserto Transwell utilizando el objetivo de 40X. La capacidad migratoria fue evaluada mediante comparación entre el conteo de células que expresan el vector de BARF1 y las células transfectadas con vector vacío.

### **3.6 Invasión celular**

Para comenzar el experimento, se rehidrataron insertos de Transwell de invasión (los cuales contienen matrigel), a través de la aplicación de medio de cultivo (RPMI para células A549 o DMEM en el caso de células BEAS-2B) a 37°C durante 2 h. Posteriormente, se sembraron  $5 \times 10^4$  células A549 o  $4,5 \times 10^4$  células BEAS-2B (de ambas condiciones BARF1 y vector vacío) en la cámara superior del inserto de Transwell en 200  $\mu$ L de medio de cultivo libre de SFB; por otra parte, en la cámara inferior del inserto se añadieron 500  $\mu$ L de medio de cultivo suplementado con 10% de SFB, como quimioattractante. Las células se dejaron invadir por 24 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 24 h, se retiró el matrigel y se procedió a fijar las células con metanol frío (-20°C), para posteriormente someter a las células a tinción con azul de toluidina durante toda la noche. A continuación, las células no invasoras fueron removidas con un algodón, para luego proceder a contar las células invasoras al microscopio, capturando fotos de 10 secciones del inserto Transwell utilizando el objetivo de 40X. El grado de invasión fue evaluado mediante comparación entre el conteo de células que expresan el vector de BARF1 y células transfectadas con vector vacío.

### 3.6 Western blotting

Para la determinación de los niveles de las proteínas vimentina, E-cadherina y  $\beta$ -actina, se realizó lisis de cultivos de células A549 y BEAS-2B transfectadas con constructo BARF1 y control. Para esto se utilizó buffer RIPA1x e inhibidor de fosfatasa y proteasa 1x. Posteriormente, la concentración de proteína obtenida de la muestra fue cuantificada utilizando el reactivo Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Luego de eso, se desnaturalizaron 50  $\mu$ g de proteína en buffer de carga a 95°C por 5 min; para luego ser cargadas en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) al 1%. Posteriormente, la electroforesis se realizó con una fuente de poder BioRad, PowerPac (Bio-Rad, California, Estados Unidos). Dicha electroforesis se inicia a 50 volts por 30 min, para luego continuar a 100 Volts por 90 min. Luego, la transferencia de proteínas fue realizada mediante electroforesis durante 2 h a 0.35A (con la misma fuente de poder). A continuación, la membrana fue sometida a un bloqueo con leche al 5% en buffer TBS + Tween durante 60 min a temperatura ambiente. Inmediatamente después, se incubó con anticuerpo primario para Vimentina (Santa Cruz sc-6260) en concentración 1:200, o E-cadherina (Santa Cruz sc-21791) en concentración 1:200 (según corresponda), diluido en TBS+Tween al 5% de leche en la membrana de nitrocelulosa, durante toda la noche. Posteriormente, se realizaron tres lavados con TBS-Tween por 5

min, para luego incubar por 1h con anticuerpo secundario (en concentración 1:5000), los anticuerpos secundarios están conjugados con enzima peroxidasa y son anti-Mouse para Vimentina, E-cadherina y  $\beta$ -actina; Jackson Immunoresearch code number: 115-035-003 (Anti-mouse). Los resultados fueron revelados a través de lectura quimioluminiscente utilizando el kit de Westar Sun de Cyanagen siguiendo las recomendaciones del fabricante.

<b>Anticuerpos</b>	<b>Marca y código</b>	<b>Tipo de anticuerpo</b>	<b>MW (kDa)</b>	<b>Dilución</b>
Vimentina	Santa Cruz sc-6260	Monoclonal de ratón	57	1:200
E-cadherina	Santa Cruz sc-21791	Monoclonal de ratón	135	1:200
B-actina	Sigma-Aldrich A5441	Monoclonal de ratón	42	1:10.000
Anti-Mouse	Jackson immunoresearch 115- 035-003	Anticuerpo secundario acoplado a HRP	-	1:5000

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados para Western blotting.** Se especifica el tipo de anticuerpo utilizado, su origen, el peso molecular de revelado y las correspondientes diluciones utilizadas para cada anticuerpo.

### 3.8 Detección de EBV en tumores de pulmón

Los tejidos incluidos en parafina de pulmón fueron utilizados para la obtención de ADN total. Para esto, los tejidos fueron tratados con una solución compuesta por: 50 mM de Tris-Cl a pH 8.0, 1 mM EDTA a pH 8.0, y 0.5% Tween 20 y 200 µg/mL de proteinasa K. Luego, las muestras suspendidas en la solución se incubaron durante toda la noche a 56°C en agitación. Posteriormente, la solución fue incubada a 100°C por 10 minutos, centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos y enfriada rápidamente. El ADN parcialmente purificado fue obtenido desde la interfase y fue directamente usado para PCR. Se amplificó un fragmento del ADN viral (BNRF1), siguiendo un programa consistente en: 5 min de denaturación inicial a 95°C y 40 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s.

PCR		
Objetivo	Partidores	Longitud
BNRF1	Sentido: 5'-TGC TTC GTT ATA GCC GTA GT - 3'  Antisentido: 5' – CCT GGT CAT CCT TTG CCA - 3'	90 pb

**Tabla 2. Partidores PCR.** Se presenta los partidores utilizados para la detección de infección por EBV en muestras de cáncer de pulmón.

### **3.9 Detección de BARF1 en tejidos de pulmón**

Se extrajeron muestras de ARN a partir de tejidos de pulmón, para esto se utilizó el kit "High pure FFPE RNA Isolation kit" (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se desparafinó la muestra del tejido a través de la utilización de xileno y etanol, para luego realizar extracción de ARN purificado mediante elución por columnas. Para la detección de transcritos de BARF1 a partir de muestras de AdC y SQC, el ARN obtenido previamente, fue sometido a una retrotranscripción utilizando 200 U de transcriptasa reversa Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) (Promega), junto con 0.04 µg/µL de random primers (Promega), 0.5 mM dNTP (Promega). Esta mezcla se incubó a 37°C por una hora. El producto ADNc obtenido fue sometido a PCR en tiempo real siguiendo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, seguido por una amplificación de 40 ciclos que comprenden 15 seg a 95°C, 15 seg a 60°C y 15 segundos a 72°C, más un ciclo final de melting consistente de 15 seg a 95°C, 30 seg a 65°C y 15 seg a 95°C.

### **3.10 RT-PCR de cultivos celulares**

Para la detección de transcritos de BARF1 en cultivos celulares, la extracción de ARN se realizó con Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante (incluyendo el uso de 200  $\mu$ L de cloroformo, 500  $\mu$ L de isopropanol y 500  $\mu$ L de etanol al 70% en los pasos siguientes). Posteriormente, el ARN fue tratado con RQ1 RNase-free DNase (Promega) a 37°C por 60 minutos y luego fue incubado con 1  $\mu$ L de solución RQ1 DNasa Stop por 10 minutos. Luego, se preparó ADNc a través de una retrotranscripción, la cual se realizó utilizando una mezcla de reacción de 10  $\mu$ L conteniendo ARN tratado con DNasa, 1 U de inhibidor de RNasa (Promega), 0.04  $\mu$ g/ $\mu$ L de random primers (Promega), 0.5 mM dNTP (Promega) y 200 U de la transcriptasa reversa MMLV (Promega). Esta mezcla se incubó a 37°C por una hora. Posteriormente, el ADN fue usado para PCR convencional bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 33 ciclos consistentes de 45 segundos a 95°C, 40 segundos a 56°C, 45 segundos a 72°C y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

RT-PCR		
Objetivo	Partidores	Longitud
BARF1	Sense: 5'- CTT TCT TGG GTG AGC GAG TC - 3' Antisense: 5' - CCA ATA AGC ACC TGC TCC TC - 3'	110 pb

**Tabla 3. Partidores RT-PCR.** Partidores utilizados para la detección de transcritos de BARF1 en cultivos celulares.

### 3.11. Estadística

Todos los experimentos están acompañados de un análisis estadístico realizado en tres réplicas biológicas, correspondientes a test de Mann-Whitney con  $p < 0.05$ . Para el análisis de casos clínicos se usó el test exacto de Fisher; se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p$  menor o igual a 0.05.

## 4. RESULTADOS

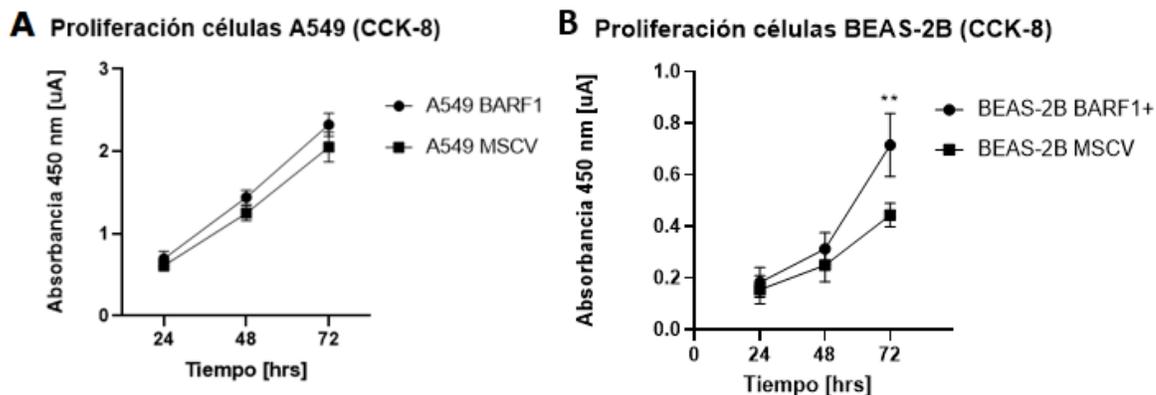
### 4.1. Resultados del Objetivo N°1

**“Determinar cambios en la tasa de proliferación de líneas celulares pulmonares que expresan ectópicamente la proteína BARF1”**

#### **Ensayo de proliferación**

Para estudiar cambios en la tasa de proliferación de las células pulmonares, en presencia de la proteína viral BARF1, se realizaron ensayos de proliferación a través del reactivo CCK-8. En la figura 1 se muestra el resultado de los ensayos realizados en las células A549 (A) y BEAS-2B (B). Las curvas de crecimiento de ambas estirpes celulares permiten demostrar un comportamiento diferencial en su tasa de proliferación en función de la presencia de BARF1. De esta forma, se encontró que la presencia de transcritos de BARF1 se traduce en cambios en la capacidad de proliferación de las células BEAS-2B, puesto que, tras 72 horas de incubación, las células que presentan transcritos de BARF1 tienen una respuesta proliferativa significativamente mayor que en la condición control. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de proliferación de las células A549 en presencia de BARF1 respecto del control. Esto nos permite concluir que BARF1 se correlaciona con un incremento en la tasa de proliferación de células pulmonares *in vitro*, sin embargo, este efecto solo es significativo luego

de 3 días para células no tumorales, destacando en ellas una marcada tendencia al alza.



**Figura 1. Ensayo de proliferación de células pulmonares.** Curva de crecimiento de células A549 (A) y BEAS-2B (B) mediante ensayo con reactivo CCK-8. La curva fue realizada mediante lectura espectrofotométrica realizada a 450 nm luego de 24, 48 y 72 h de incubación de las células pulmonares y exposición durante 4h al reactivo CCK-8 (1:10). Ambos resultados corresponden a n=3. \*\* p ≤0.01.

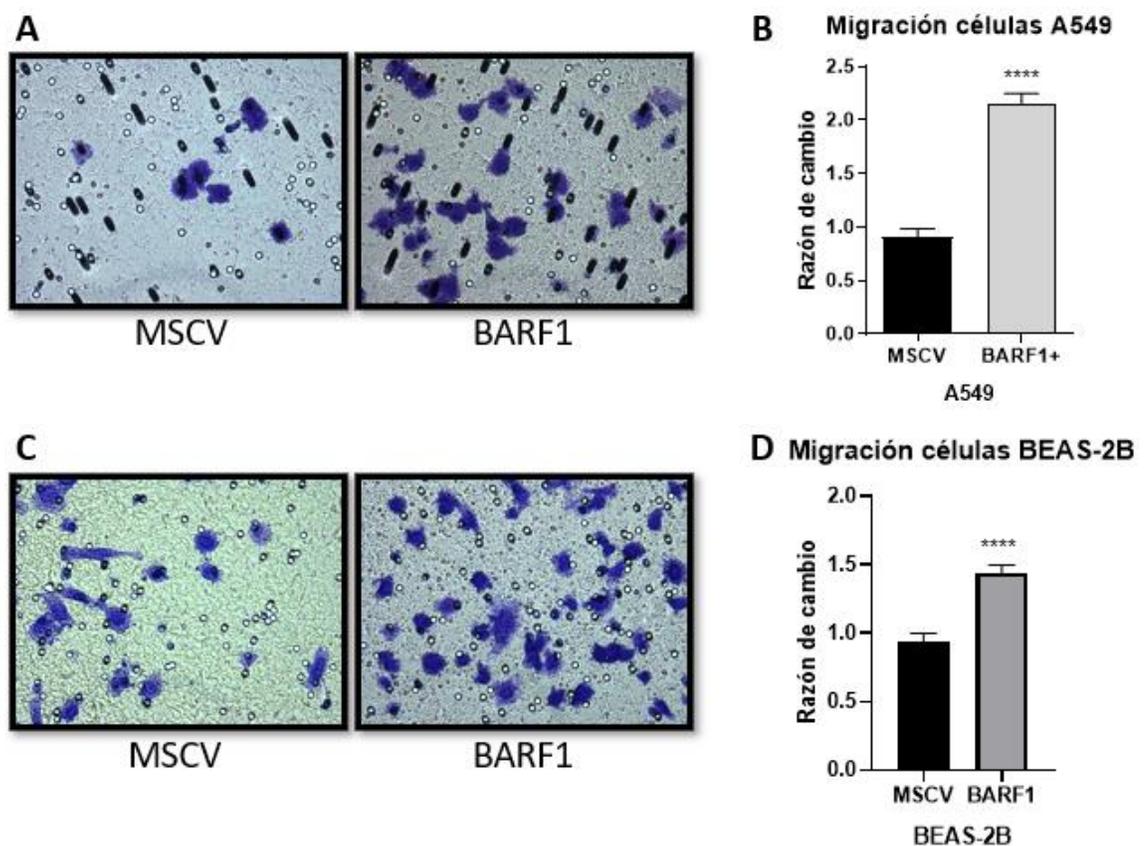
## 4.2. Resultados del Objetivo N°2

**“Evaluar transición epitelial mesenquimal (TEM) a través de marcadores moleculares y la capacidad migratoria de células de pulmón que expresan ectópicamente la proteína BARF1”**

### 4.2.1 Ensayos de migración

Para evaluar la capacidad migratoria de las células de pulmón se realizaron ensayos de migración Transwell. En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos en las células A549. Se observa una mayor densidad celular que se

relaciona directamente con una mayor capacidad de migrar a través del inserto (fig. 2A). La presencia de BARF1 se traduce en un aumento de aproximadamente dos veces en la capacidad de migrar de células A549, (Fig.2B). Es posible concluir que la presencia de BARF1 se correlaciona con un incremento en la capacidad migratoria de células de AdC.



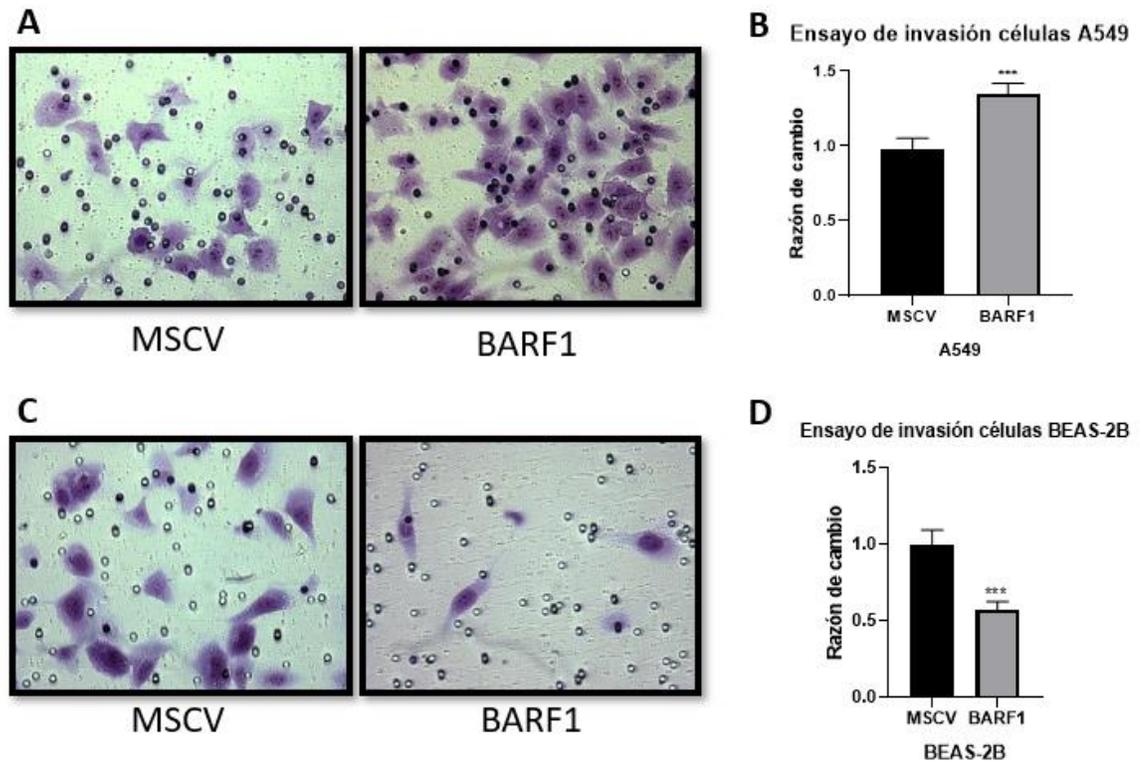
**Figura 2.** Ensayos de migración en células pulmonares mediante insertos de Transwell (A) Células A549 que expresan BARF1 y control migraron durante 4 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> (40X). (B) Cuantificación de resultados del ensayo de migración de células A549. Las células fueron teñidas con cristal violeta durante una la noche. (C) Células BEAS-2B que expresan BARF1 y control migraron durante 4 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> (40X). (D) Cuantificación de resultados del ensayo de migración para las células BEAS-2B. El resultado se presenta como razón de cambio entre las células migrantes de la condición BARF1 sobre el promedio de las células migrantes en condición control MSCV (N=3). Las células fueron teñidas con cristal violeta durante una la noche. La variación en las gráficas en B y D se presenta como error estándar de la

media (SEM). Los resultados se presentan como razón de cambio entre las células migrantes de la condición BARF1 sobre el promedio de las células migrantes en condición control MSCV (N = 3).  $P < 0.0001$

De la misma forma, en la figura 2 se muestra el resultado de ensayos de migración de las células BEAS-2B. En esta figura, concordantemente con lo presentado para las células A549, se puede observar que en presencia de BARF1 existe un aumento del 50% de la capacidad migratoria de las células BEAS-2B respecto del control (Fig. 2D). Estos resultados nos permiten confirmar que BARF1 se correlaciona con un incremento de la migración de células pulmonares *in vitro*.

#### **4.2.2 Ensayos de invasión**

Para determinar cambios en la capacidad invasiva de células de pulmón, se realizaron ensayos de invasión a través de insertos Transwell con matrigel. En la figura 3 se observa el efecto BARF1 en la capacidad invasiva de células A549. En la fig. 3A se observa que la condición BARF1 presenta una mayor cantidad de células invasoras tras el paso por los insertos Transwell, lo que se refleja en un inserto con una mayor densidad celular que en la condición control. Este aumento en la capacidad de invasión es significativamente mayor en células con transcritos de BARF1 (fig. 3B). Se puede concluir que la presencia de BARF1 correlaciona con incremento de la capacidad invasiva de células A549.



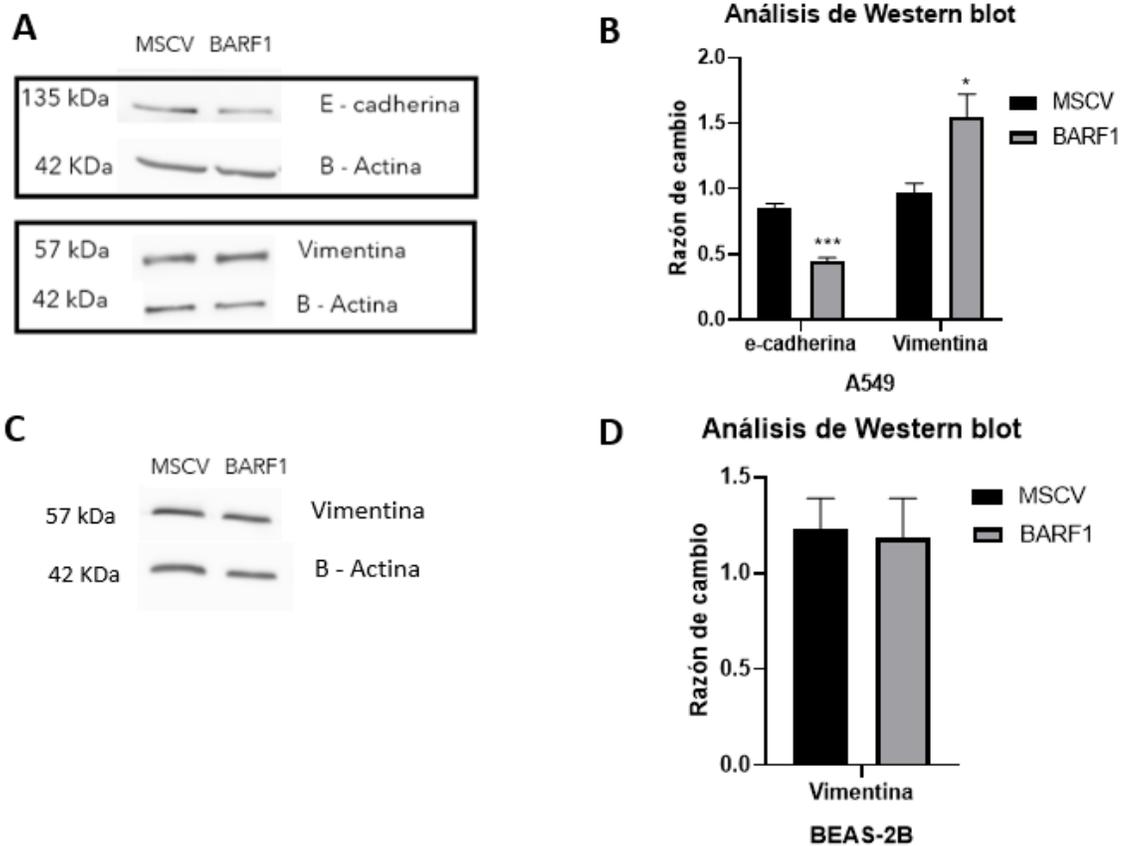
**Figura 3.** Ensayos de invasión en células pulmonares. (A) Células A549 que expresan BARF1 y control invadieron durante 24 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> (40X). (B) Cuantificación de resultados del ensayo de invasión de células A549. Las células fueron teñidas con azul de toluidina durante una noche. (C) Células BEAS-2B que expresan BARF1 y control invadieron durante 4 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> (40X). (D) Cuantificación de resultados del ensayo de invasión para las células BEAS-2B. El resultado se presenta como razón de cambio entre las células migrantes de la condición BARF1 sobre el promedio de las células migrantes en condición control MSCV (N=3). Las células fueron teñidas con cristal violeta durante una la noche. La variación en las gráficas en B y D se presenta como error estándar de la media SEM. P < 0.001

Sorprendentemente, no se observaron los mismos resultados en las células BEAS-2B. Como se puede apreciar en la Fig. 3B, la presencia de BARF1 correlacionó con una disminución en aproximadamente un 50% de la capacidad invasora de las células BEAS-2B. Se puede concluir que la expresión de BARF1

correlaciona con un incremento de la capacidad invasiva en células tumorales de pulmón, pero no en las células no tumorales.

#### **4.2.4 Transición epitelial mesenquimal**

Con el objetivo de analizar si la presencia de la proteína viral BARP1 promovía TEM se analizaron distintos marcadores moleculares de TEM mediante Western blotting. En la figura 4 se muestran resultados para los marcadores E-cadherina y Vimentina en la línea celular A549, y en la figura 5B se muestra su cuantificación mediante análisis densitométrico. Se observa una disminución en los niveles de E-cadherina y un aumento de los niveles de vimentina en células que expresan BARP1 en relación con los controles. El análisis densitométrico ha mostrado que estos cambios son estadísticamente significativos.



**Figura 4.** Ensayos de western blotting. (A) y (C) corresponden a imágenes representativas de los niveles proteicos de e-cadherina (135 kDa), y vimentina (57 kDa) en células A549 (A) y células BEAS-2B (C). Se cargaron 50  $\mu$ g de proteína para vimentinas y 100  $\mu$ g de proteína para E-cadherina. Se utilizó  $\beta$ -actina (42 kDa) como control de carga para cada gel. (B) y (D) corresponden a cuantificación densitométrica de bandas de western blot de células de pulmón. Se utilizó la cuantificación de  $\beta$ -actina como normalizador y esto fue expresado como razón de cambio. Resultados para (B) y (D) corresponden a n=3 y su variación se presenta como error estándar de la media (SEM).

Por otra parte, no se observaron resultados similares en células BEAS-2B. De hecho, células BEAS-2B que expresan ectópicamente BARF1 no muestran un incremento en los niveles de Vimentina (fig. 4). Por otro lado, E-cadherina no fue

detectada en células BEAS-2B que expresan BARF1 y en células transfectadas con vector vacío.

### **4.3 Resultados del objetivo N°3**

**“Comprobar la presencia de infección por EBV y expresión de BARF1 en muestras clínicas de carcinoma de célula escamosa y adenocarcinoma pulmonar”**

#### **4.3.1 Detección de EBV y transcritos de BARF1 en cáncer pulmonar**

Para el siguiente objetivo, se analizaron 50 muestras de cánceres de pulmón de células no pequeñas de pacientes chilenos. Estos casos correspondieron a 24 AdC y 25 SQC. Para la detección viral se utilizó PCR convencional y para la detección de transcritos de BARF1 se utilizó RT-PCR en tiempo real. En la Tabla 4 se puede apreciar que un total de 8 de 45 (18%) cánceres de pulmón correctamente analizados fueron positivos para la presencia de un fragmento del genoma viral. Cabe destacar que 4 casos de adenocarcinoma no presentaron amplificación para  $\beta$ -globina, por lo que no se contabilizaron dentro del total. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la presencia de EBV entre adenocarcinomas y carcinomas escamosos ( $p = 1.0$ ). La tabla 4 muestra un conjunto de casos de cáncer pulmonar positivos y negativos para presencia de un fragmento del genoma viral. Los 8 casos positivos para EBV fueron analizados

para la expresión de transcritos de BARF1, los cuales fueron detectados en 2 de los 8 casos EBV(+) (25%). No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre casos de AdC o SQC tanto para la presencia de EBV como para la detección de transcritos de BARF1 ( $p = 1.00$ ).

Tipo histológico	EBV + (%)	EBV - (%)	Total	p-value
Adenocarcinoma	4 (20)	16 (80)	20	1.00
carcinomas escamosos	4 (16)	21 (84)	25	
<b>Total</b>	<b>8 (18)</b>	<b>41 (82)</b>	<b>45</b>	

Tipo histológico	BARF1 + (%)	BARF1 - (%)	Total	p-value
Adenocarcinoma	1 (25)	3 (75)	4	1.00
Carcinomas escamosos	1 (25)	3 (75)	4	
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	

**Tabla 4. Tabla resumen presencia de genoma viral y transcritos de BARF1 en muestras de tejidos de cáncer de pulmón.** 49 muestras de tejidos pulmonares cancerígenos (24 adenocarcinomas y 25 carcinomas de células escamosas) provenientes de pacientes chilenos fueron estudiados a través de PCR convencional en búsqueda de la secuencia para el gen BRF1 de EBV (confirmados con presencia de beta globina celular). Los tejidos positivos para la presencia viral fueron sometidos a RT-PCR en tiempo real. Los 8 casos positivos fueron estudiados en búsqueda de la proteína BARF1 y los datos fueron confirmados a través de la presencia de transcritos para beta globina celular.

#### 4.4. Resumen de resultados y conclusiones

En primer lugar, los resultados *in vitro* presentan los primeros hallazgos de lo que pudiera ser la acción del vector de la proteína viral BARF1 en el contexto pulmonar. De esta forma, se pudo observar que la presencia de BARF1 se correlacionaba con un aumento significativo de la proliferación celular de células

pulmonares no tumorales, mas no en células tumorales. Además, se encontró que la presencia del transcrito de la proteína BARP1 se correlacionaba con un aumento en la capacidad migratoria de ambas líneas celulares pulmonares; sin embargo, se encontró un distinto comportamiento para el proceso de invasión celular. Cabe destacar, que los resultados de migración e invasión para las células A549 se vieron respaldados por resultados de western blot, en donde se vio un aumento significativo de los niveles de Vimentina y una disminución significativa de los niveles de E-cadherina, lo cual también se asocia con un aumento de la transición epitelial mesenquimal. Es importante mencionar, que no se encontraron los mismos resultados para las células BEAS-2B.

Por otra parte, los resultados *ex vivo* revelan la presencia del virus en un 16% de los casos de cáncer pulmonar de sujetos chilenos. Esto nos permite conocer que el EBV estaría llegando efectivamente al pulmón de pacientes chilenos, pudiendo ahí generar una gran cantidad de efectos. Además, se pudo encontrar 2 muestras con transcritos de BARP1; lo cual nos permite sugerir que la proteína posteriormente sintetizada podría ser detectada en el contexto pulmonar, lo que hace más importante el estudiar los efectos que ella puede tener en células pulmonares.

## 5. Discusión

Estudios previos han determinado que EBV tiene un rol en el desarrollo de ciertos linfomas, carcinoma nasofaríngeo y un subgrupo de cánceres gástricos. Adicionalmente, el virus ha sido detectado en distintos tipos de carcinomas como cáncer pulmonar (69). En efecto, existe diversa evidencia de la presencia de EBV en cánceres de pulmón en distintos lugares del mundo, aunque con bastante heterogeneidad en los porcentajes de detección (52-58). Por esta razón, entre otras, no se ha podido atribuir un rol oncogénico a este virus en el desarrollo de este tipo de cáncer. Bajo ese contexto, esta tesis ha buscado investigar el rol que podría tener el EBV en cáncer pulmonar, al estudiar la acción de una de sus proteínas consideradas oncogénicas y cómo esta puede aportar al cambio en las propiedades fenotípicas involucradas en progresión de cáncer pulmonar.

Como se mencionó previamente, las principales mutaciones que participan en la oncogénesis pulmonar corresponden a aquellas que aumentan los niveles de ciclina D (19) y c-Myc (20) lo cual se traduce en un incremento de la capacidad proliferativa de células pulmonares. Interesantemente y de manera concordante, las actividades asociadas a proliferación de la proteína BARP1 son aumento de los niveles de Ciclina D1 (63), c-Myc (61) y c-Jun (70). Los resultados del primer objetivo de este trabajo (Fig. 1) muestran que la proliferación celular no fue

afectada en células de adenocarcinoma (fig. 1A) que expresan BARF1. Otros estudios han demostrado que BARF1 promueve un incremento en la proliferación usando células SNU601 (64), SNU216 (66), YCCEL1 (71), NP69 (66), GES1 (72). Sin embargo, el hallazgo de esta tesis puede tener diversas interpretaciones. En primer lugar, se puede plantear que los efectos mediados por la expresión de BARF1 en células de adenocarcinoma no promoverían un incremento adicional de la proliferación celular, ya que no se diferencia de aquellos efectos que ya se han producido durante el desarrollo del AdC. Por otra parte, hay evidencia de que BARF1 es capaz de aumentar los niveles de Ciclina D1 (58) y/o c-Myc (61), sin embargo, en el caso de células A549, estos cambios no serían significativos y no se traducirían en una mayor proliferación celular. De la misma forma, BARF1 podría promover cambios en otros marcadores de proliferación celular en el contexto pulmonar, sin embargo, estos tampoco serían elevados significativamente en modelos de AdC y no se traducirían en un incremento de la proliferación celular. Por otra parte, al analizar los resultados de proliferación obtenidos en células no tumorales (fig. 1B), se observa que, tras 72 horas post sembrado, la proliferación celular aumenta significativamente en presencia de BARF1, marcando una importante tendencia al alza de las células transfectadas con el vector codificante para la proteína viral. Este resultado respalda la capacidad de BARF1 para promover proliferación celular, ya sea a través de los mecanismos conocidos previamente (ciclina D1 y cMyc (62, 61)) u otros.

Independientemente del mecanismo, este resultado permite discutir que los efectos de BARF1 son notorios en células no tumorales, lo cual permitiría plantear que esta proteína viral puede ser importante durante la oncogénesis, ya que los efectos del vector o del ARN de la proteína solo se diferencian en el modelo no tumoral, mientras que en las células de adenocarcinoma, el vector de la proteína no generaba ningún cambio considerable. Por lo tanto, BARF1 podría aportar a la promoción del cáncer pulmonar al lograr incrementar la proliferación de células no tumorales, considerando también que deben haber muchos más factores involucrados en este proceso (73).

Se ha reportado previamente la capacidad de BARF1 de promover migración e invasión de células epiteliales (62,68), sin embargo, también existe data contradictoria (64) y los mecanismos mediante los cuales BARF1 puede promover estos cambios aún son desconocidos. Puede plantearse que BARF1 desempeña un rol alterando los niveles de proteínas de arquitectura celular, como el caso de E-cadherina, bajo lo cual la disminución de sus niveles o un reordenamiento de ella puede contribuir a un aumento de la capacidad migratoria (74), o N-cadherina, cuyo aumento promueve la capacidad migratoria de las células.

Interesantemente, al observar los resultados de migración e invasión en células A549 (fig. 2B y 3B), la incrementada capacidad migratoria de las células en presencia del transcrito de BARF1 también se tradujo en una aumentada capacidad invasiva (cerca al 40%). Al respecto, hay evidencia sobre la

capacidad de BARF1 de promover un incremento en la expresión del factor de transcripción c-Jun, afectando así la proliferación, invasión y apoptosis celular (65). Por lo tanto, BARF1 podría promover un incremento de los niveles de factores de transcripción asociados a estos procesos biológicos, aunque esto requiere estudios confirmatorios.

La información aquí presentada permite proponer que la expresión de BARF1 generaría un fenotipo más agresivo de cáncer de pulmón. Por lo tanto, los casos de tumores pulmonares en los cuales se detecta la presencia de EBV y/o BARF1 podrían corresponder a casos más agresivos de cáncer de pulmón, lo cual debe ser confirmado en estudios posteriores. Sorprendentemente, las células BEAS-2B no siguen la misma tendencia en invasión respecto de lo observado en células A-549. En efecto, a pesar de la capacidad del transcrito de BARF1 de promover la migración de células BEAS-2B (fig.2D), esto no se tradujo en un aumento de su capacidad invasiva, por el contrario, la presencia del transcrito de BARF1 redujo esta capacidad en casi un 50% (fig. 3D). Existen distintas posibilidades para explicar este resultado. En primer lugar, es importante destacar la diferencia entre el proceso de migración e invasión. En el proceso de migración celular ocurren una serie de cambios celulares, por ejemplo, ocurre desensamblaje de uniones celulares, lo cual permite a la célula desprenderse de sus células vecinas; posteriormente, ocurre un reordenamiento del citoesqueleto, el cual permite la formación de lamelipodios involucrados en la movilización de la célula hacia una

señal atractiva (75,76). Este proceso está presente normalmente en la vida de los organismos, ya sea durante la formación de órganos o curación de heridas (23,70,71). Por otra parte, la invasión celular es un proceso asociado a células cancerígenas, en el cual un grupo de células tumorales es capaz de migrar y atravesar componentes de matriz extracelular y asentarse en una vecindad celular, nodos linfáticos y posteriormente otros órganos (76). En este contexto, son de gran importancia las distintas enzimas degradadoras de ECM, las cuales permiten llevar a cabo una efectiva invasión celular. Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) están a cargo de distintos procesos fisiológicos del desarrollo, tales como ovulación, desarrollo embrionario (77). Sin embargo, la detección de MMPs en tumores *in vivo* (78,79) sugiere un rol en procesos metastásicos, ya que estas enzimas tienen como sustrato a distintos componentes como fibras de colágeno y componentes de la laminina basal celular (revisado en (80)), lo que les entregaría a las células tumorales una gran capacidad de degradar matriz extracelular e invadir vecindades celulares. Además, distintas enzimas de la familia Rho, también están ligadas a procesos de remodelación del citoesqueleto de actina, adhesión celular y degradación de matriz extracelular y sobre activación asociada a procesos de progresión tumoral e invasión celular (81). Teniendo en cuenta estos factores y diferencias en los procesos, es que se podrían observar resultados diferentes para procesos de invasión y de migración, ya que las células pueden tener una favorecida capacidad de migrar, sin embargo,

podrían no presentar las enzimas necesarias para una correcta invasión. De esta forma, habría que estudiar la acción que pueda ejercer la proteína BARF1 sobre distintas enzimas y efectores en los distintos contextos pulmonares para adjudicarle un rol más categórico en este proceso. En la literatura se ha estudiado el rol de BARF1 en procesos de migración e invasión, en distintos modelos de carcinoma (62,64). En estos estudios se ha encontrado que la proteína BARF1 puede tener dos comportamientos, aumentar la capacidad de migración (59), o ser indiferente a ellos y no provocar cambios (58). Interesantemente, se observa una disminución en la capacidad de invasión en la línea celular BEAS-2B. Este resultado puede corresponder a la primera caracterización de BARF1 como una proteína capaz de proteger contra invasión celular, lo cual jamás ha sido reportado en ningún trabajo previo; por el contrario, existe la posibilidad de que el error sea metodológico y la técnica de invasión no se haya estandarizado correctamente. Como se puede observar en la fig. 3C para las células que expresan el transcrito de BARF1, se puede observar que los poros del inserto de Transwell están completamente blancos, lo que puede significar que las células puedan haber estado mucho tiempo invadiendo y terminaron atravesando el inserto y el experimento no se realizó correctamente. Esta última idea se condice con el resultado de migración celular, en donde se observa que en tan solo 4 horas las células son capaces de migrar en una importante cantidad, por lo que existe la posibilidad de que las 24 horas de invasión haya sido un tiempo excesivo.

Para continuar con la caracterización de la acción de BARF1 en TEM en células pulmonares, se analizó los niveles de dos marcadores moleculares: Vimentina y E-cadherina. La vimentina corresponde a filamentos intermedios de citoesqueleto, la cual se expresa normalmente en células mesenquimales y no epiteliales (82,83). Se ha encontrado que vimentina es capaz de promover la capacidad migratoria de las células epiteliales a través de la estabilización de la proteína Scribble (84) e incremento de los niveles de del receptor Axl (85). Por lo tanto, elevados niveles de vimentina son asociados a una mayor capacidad migratoria. Por otra parte, E-cadherina corresponde a una glicoproteína transmembrana capaz de asociarse a los filamentos de actina, funcionando como pieza clave en la unión de células epiteliales (86). Por lo tanto, la pérdida de E-cadherina se asocia a un fenotipo mesenquimal, ya que su ausencia permite a las células migrar más fácilmente, lo cual favorece procesos como la metástasis.

Adicionalmente, los resultados presentados en la figura 4 permiten observar que BARF1 se correlacionó con un aumento de los niveles de vimentina en células A549. Esto también respalda el aumento en la capacidad migratoria de esta línea celular. Los mecanismos por los cuales la proteína BARF1 estaría aumentando los niveles de vimentina son aún materia de estudio. En distintas publicaciones no se ha encontrado un rol importante de BARF1 sobre vimentina, por lo tanto, los resultados aquí obtenidos para células de adenocarcinoma serían los primeros en reportar una relación entre BARF1 y vimentina. Se puede proponer estudiar cómo

BARF1 estaría afectando distintos factores de transcripción asociados a TEM, tales como ZEB1, Slug o Snail, de tal forma que se pueda evaluar si existe una correlación que estaría promoviendo la TEM. Posteriormente, los resultados obtenidos para el siguiente marcador - E-cadherina – siguen la misma tendencia. En la fig. 4B se puede observar una disminución significativa de E-cadherina en presencia de BARF1. Este resultado está en línea con lo presentado previamente, ya que la disminución de E-cadherina favorecería la capacidad migratoria de la línea celular y, en conjunto con el aumento de vimentina, estarían indicando que la presencia de BARF1 promovería el fenotipo mesenquimal en células A549. El comportamiento de los dos marcadores de TEM indicaría una tendencia al fenotipo mesenquimal para las células A549 en presencia de BARF1. Sin embargo, es aún importante verificar el comportamiento de distintos marcadores, como los factores de transcripción antes mencionados y los niveles de N-cadherina, una proteína prevalente en tejidos no epiteliales, la cual se ve aumentada en fenotipos mesenquimales y está asociada al asentamiento de células cancerígenas en distintas partes del organismo, como ocurre en procesos metastásicos (87). La revisión de todos estos marcadores permitiría revelar concretamente que BARF1 promueve la TEM en células pulmonares cancerígenas.

Por otra parte, las células BEAS-2B no presentaron un incremento de vimentina de la misma forma que la línea celular A549, lo cual puede tener distintas

explicaciones. En la literatura se ha evidenciado que las células BEAS-2B tienen un comportamiento más bien mesenquimal (88,89), haciendo referencia tanto a métodos de cultivo (como la presencia de SFB (85)) o de marcadores superficiales que comparte esta línea celular con distintas células de carácter mesenquimal (84). Esto último se puede reflejar en la condición control, la cual presenta un importante grado de migración e invasión. Además, nos permite discutir que la presencia de SFB afectó los niveles de marcadores de TEM, ya que, por ejemplo, los resultados de vimentina se encuentran elevados incluso por sobre los niveles de  $\beta$ -actina, nuestro gen normalizador, o incluso, la ausencia de E-cadherina al realizar ensayos de western blotting, en el cual no se pudo obtener una correcta determinación de sus niveles, ya que no se pudo detectar. Por lo tanto, se recomienda repetir estos experimentos considerando cambiar las condiciones de cultivo de la línea celular BEAS-2B

A la fecha, no se ha realizado un estudio de la presencia de EBV en el contexto pulmonar chileno. En el extranjero esto se ha realizado con data poco concluyente, ya que los rangos de detección de EBV van desde inexistente hasta una gran prevalencia dependiendo de la zona geográfica en donde se estudia (53-59). Por lo tanto, este estudio representa un primer tamizaje de la presencia de EBV en cáncer pulmonar chileno en un grupo discreto de casos. Para hacer un correcto análisis de los resultados (resumidos en tabla 3) cabe destacar la importancia de la metodología utilizada. Actualmente, el estándar de oro para la detección de EBV

corresponde a la hibridación *in situ*, en la cual se puede encontrar que la presencia del virus está efectivamente en células epiteliales, ya que existe la posibilidad de que se detecte virus en linfocitos adyacentes al tumor y no efectivamente en el tejido de interés. Por lo tanto, el trabajo realizado en esta investigación corresponde a un tamizaje inicial, en donde se estudia un grupo de tejidos con el fin de encontrar presencia viral, la cual luego deberá ser confirmada con la técnica correspondiente. A partir de esta tesis, se obtuvo una positividad del 16% para EBV en los 50 casos estudiados. Esto nos indica, en primer lugar, que se puede detectar presencia de EBV en un contexto de cáncer pulmonar. Esto tiene una gran relevancia, ya que la acción que pueda ejercer el virus dentro del pulmón puede generar una serie de cambios que promueven la oncogénesis. En el contexto de cáncer de pulmón, es importante destacar que un pequeño porcentaje de la población presenta desarrollo de NSCLC, incluso sin ser fumadores (90), lo cual puede atribuirse a la exposición de distintos carcinógenos, como asbesto, aire contaminado, presencia de mutaciones genéticas, antecedentes familiares, consumo de alcohol o distintas infecciones que aún están en estudio (91). Dentro de los factores no asociados al cigarrillo, la presencia del EBV puede aportar a esta discusión, ya que se sabe que EBV es un virus transformante que está asociado a la oncogénesis de distintos carcinomas, por lo tanto, la presencia de EBV en pulmón puede aportar al desarrollo de cáncer, lo cual puede respaldar casos como los presentados en Asia, en donde se ha encontrado que carcinomas

tipo linfocarcinoma tienen alta presencia de EBV (92). Concordantemente, al revisar el primer y segundo objetivo de la tesis, en los cuales se encontró que el transcrito de la proteína BARP1 era capaz de promover la proliferación de células epiteliales no cancerígenas, o promover incluso un fenotipo más mesenquimal en las células pulmonares, puede indicar que el EBV podría promover características oncogénicas en pulmón. Cabe destacar, además, que el cáncer es una enfermedad multifactorial, en donde deben ocurrir una serie de eventos para que se pueda producir un proceso neoplásico. En otras palabras, deben ocurrir una serie de impactos genéticos e inmunológicos (73) que favorezcan el crecimiento descontrolado de las células, de esta forma, se puede plantear que el rol del EBV en desarrollo de cáncer pulmonar no es el de un agente exclusivo, sino que forma parte de una serie de eventos que culminan en el desarrollo tumoral. Por otra parte, transcritos de BARP1 fueron encontrados en una menor escala, lo que podría significar que la proteína podría no tener un rol en dichos casos, no obstante, este resultado también debe considerar que las muestras trabajadas son tejidos obtenidos de pacientes chilenos de aproximadamente de 20 años, no almacenadas en condiciones óptimas para su preservación, por lo que existe una gran probabilidad de que exista degradación de material genético como el ARN, el cual es bastante inestable y requiere de cuidado para su preservación.

Finalmente, los resultados de presencia de EBV en tejido pulmonar aún deben ser sujetos a una confirmación con hibridación *in situ*, con el fin de poder caracterizar

completamente dónde está el virus en los tejidos. Independientemente, este trabajo muestra el primer reporte de EBV en cáncer pulmonar de pacientes chilenos. Se ha encontrado que EBV es detectable en cáncer pulmonar y, a pesar de ser en una baja prevalencia, este podría llegar y provocar una serie de eventos moleculares que podrían alterar el curso de la enfermedad.

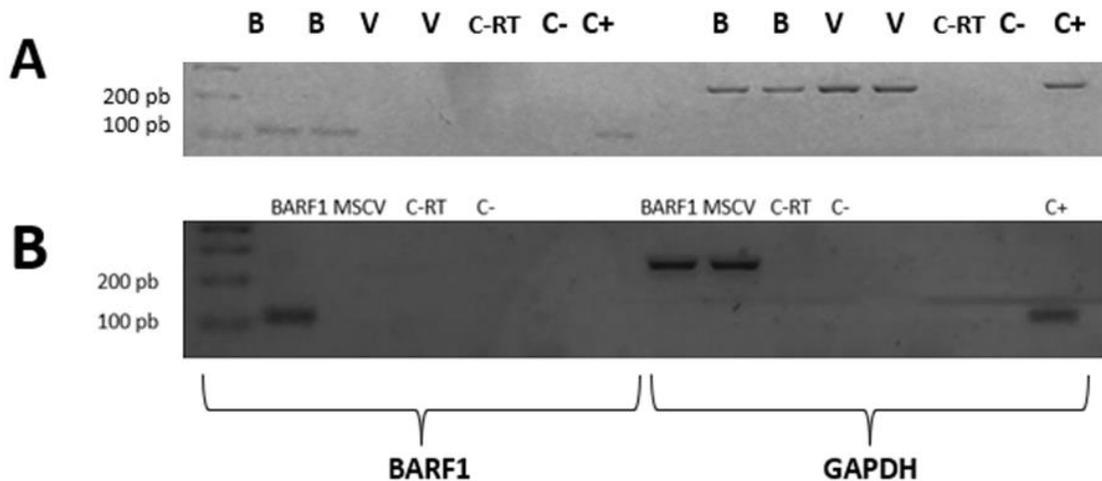
Considerándolo todo en contexto, es importante tomar en cuenta el desarrollo del cáncer como un proceso multifactorial, tal como se mencionó previamente, es necesario que ocurran una gran cantidad de impactos, tanto genéticos como inmunológicos, para que ocurra el desarrollo de un tumor, y, en el caso del cáncer de pulmón, deben incluso considerarse factores además del hábito tabáquico. Se han planteado teorías como las de los impactos múltiples, en donde esta serie de eventos termina provocando la aparición de un tumor. Es en ese contexto en donde puede entrar el EBV para el desarrollo de carcinogénesis pulmonar, ya que si bien, el virus no será el causante del desarrollo de un tumor, sí puede actuar para favorecer la formación de este. Como se encontró en este trabajo, el EBV puede llegar a encontrarse en tejidos pulmonares, en donde existe la posibilidad de que ejerza funciones oncogénicas y, de esta forma, contribuya a la formación de un tumor. Cabe destacar también, que la ausencia de EBV en una gran cantidad de los tejidos, o de transcritos de BART1, puede no necesariamente descartar el rol de EBV en una posible oncogénesis, ya que se ha planteado una teoría denominada “hit and run” (impacto y escape en español) (93-95), en donde

no necesariamente debe detectarse el virus para atribuirle un rol, ya que el virus puede haber estado previamente en esa sección, haber infectado e incluso la infección pudo haber sido resuelta, sin embargo, la acción del virus puede haber provocado un efecto mutagénico que provoca un impacto en el desarrollo de un cáncer (como en el caso de linfoma de Hodgkin EBV- (96) y el efecto encontrado en cáncer de mama (51)). De esta forma, es importante conocer que el EBV puede llegar al pulmón y que eso está ocurriendo en Chile.

Finalmente, el trabajo aquí presentado muestra que la expresión de BARP1 se traduce en un incremento de procesos proliferativos, migratorios, invasivos y de TEM en células pulmonares *in vitro*. Por lo tanto, es importante seguir realizando estudios acerca del rol de EBV en cáncer pulmonar, para poder dilucidar concretamente los efectos del virus en el desarrollo de esta enfermedad.

## 6. Anexos

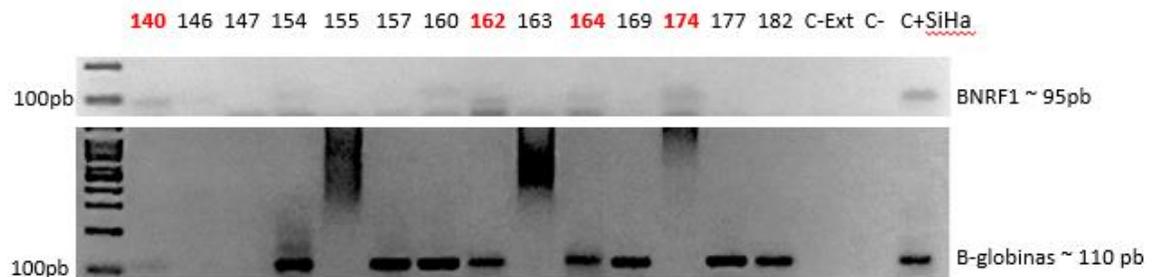
### ANEXO 1: Transfección estable



**Figura anexo 1: RT-PCR de ARN purificado a partir de cultivos celulares.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de producto de RT-PCR, de ARN obtenido a partir de células A549 (A) o BEAS-2B (B) post transfección con vector MSCV de expresión de BARF1. Carriles con letra B representan células transfectadas con vector BARF1 y carriles con letra V (o MSCV) con vector vacío, acompañado de sus respectivos controles de retrotranscripción (C-RT), control negativo (C-) y control positivo (C+). Como control positivo se utilizó ARN obtenido de células SiHa transfectadas previamente con la secuencia para la proteína viral BARF1.

## ANEXO 2: Productos de PCR ejemplo de resultados EBV+

Con el fin de presentar lo que fue considerado como positivo para la presencia de EBV en muestras de tejido pulmonar a través de la electroforesis de productos de PCR se presenta la segunda figura anexa:



**Figura anexo 2: PCR de muestras de cáncer pulmonar.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de producto de PCR a partir de ADN obtenido de tejidos de cáncer pulmonar. Carriles representan número aleatorio de muestras de cáncer pulmonar, junto con controles de extracción de ADN (C-ext), control negativo de PCR (C-) y control positivo (C+ SiHa), el cual corresponde a células SiHa, las cuales presentan infección EBV. Como resultado positivo se tomó a la secuencia viral de BNRF1, la cual presenta un producto de cerca de 95 pb. Como control de expresión genética se utilizó  $\beta$ -globina, la cual presenta una banda en cerca de 110 pb.

### ANEXO 3: Plásmido utilizado para transfección estable

Created with SnapGene®



**Anexo 3. Plásmido MSCV (97).** La figura presenta las secuencias presentes en el plásmido utilizado para la transfección estable de las líneas celulares pulmonares. Esta figura corresponde al esqueleto del vector, el cual se utilizó para la transfección de las condiciones control.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [Internet]. 2021 [citado 29 de diciembre de 2021];71(3):209-49. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21660>
2. Cancer Today (2021) Global Cancer Observatory. Available at: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=0&include\\_nmsc\\_other=0&projection=natural-earth&color\\_palette=default&map\\_scale=quantile&map\\_nb\\_colors=5&continent=0&show\\_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=0&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&show_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D) (Accessed: 05 May 2023).
3. Office of the Surgeon General (US), Office on Smoking and Health (US). *The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General* [Internet]. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2004

[citado 29 de diciembre de 2021]. (Reports of the Surgeon General). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44695/>

4. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung Cancer: Diagnosis and Management. AFP [Internet]. 1 de enero de 2007 [citado 4 de noviembre de 2021];75(1):56-63. Disponible en: <https://www.aafp.org/afp/2007/0101/p56.html>
5. Bilello KS, Murin S, Matthay RA. Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer. Clinics in Chest Medicine [Internet]. marzo de 2002 [citado 4 de noviembre de 2021];23(1):1-25. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272523103000571>
6. Ellis PM, Vandermeer R. Delays in the diagnosis of lung cancer. J Thorac Dis [Internet]. septiembre de 2011 [citado 4 de noviembre de 2021];3(3):183-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3256519/>
7. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification of Malignant Tumours. Journal of Thoracic Oncology [Internet]. 1 de agosto de 2007 [citado 4 de noviembre de 2021];2(8):706-14. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1556086415312983>
8. Rami-Porta R, Bolejack V, Giroux DJ, Chansky K, Crowley J, Asamura H, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: The New Database to Inform the

Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* [Internet]. 1 de noviembre de 2014 [citado 9 de noviembre de 2021];9(11):1618-24. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1556086415307280>

9. Hwang JK, Page BJ, Flynn D, Passmore L, McCaul E, Brady J, et al. Validation of the Eighth Edition TNM Lung Cancer Staging System. *Journal of Thoracic Oncology* [Internet]. 1 de abril de 2020 [citado 9 de noviembre de 2021];15(4):649-54. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1556086419338468>

10. Detterbeck FC. The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street? *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* [Internet]. 1 de enero de 2018 [citado 9 de noviembre de 2021];155(1):356-9. Disponible en: [https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223\(17\)32136-0/fulltext](https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223(17)32136-0/fulltext)

11. Govindan R, Page N, Morgensztern D, Read W, Tierney R, Vlahiotis A, et al. Changing Epidemiology of Small-Cell Lung Cancer in the United States Over the Last 30 Years: Analysis of the Surveillance, Epidemiologic, and End Results Database. *JCO* [Internet]. 1 de octubre de 2006 [citado 29 de diciembre de 2021];24(28):4539-44. Disponible en:

<https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2005.04.4859>

12. Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. diciembre de 2021 [citado 9 de noviembre de 2021];7(1):3. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41572-020-00235-0>
13. Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, et al. Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 21 de mayo de 2015 [citado 29 de diciembre de 2021];1(1):1-16. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrdp20159>
14. TAMURA T, KURISHIMA K, NAKAZAWA K, KAGOHASHI K, ISHIKAWA H, SATOH H, et al. Specific organ metastases and survival in metastatic non-small-cell lung cancer. *Mol Clin Oncol* [Internet]. enero de 2015 [citado 30 de diciembre de 2021];3(1):217-21. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4251107/>
15. Quint LE, Tummala S, Brisson LJ, Francis IR, Krupnick AS, Kazerooni EA, et al. Distribution of distant metastases from newly diagnosed non-small cell lung cancer. *The Annals of Thoracic Surgery* [Internet]. 1 de julio de 1996 [citado 30 de diciembre de 2021];62(1):246-50. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003497596002202>
16. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* [Internet]. enero de 2018 [citado 9 de noviembre

de 2021];553(7689):446-54. Disponible en:

<https://www.nature.com/articles/nature25183>

17. Ahrendt SA, Hu Y, Buta M, McDermott MP, Benoit N, Yang SC, et al. p53 Mutations and Survival in Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer: Results of a Prospective Study. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 2 de julio de 2003 [citado 9 de noviembre de 2021];95(13):961-70. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jnci/95.13.961>

18. Pao W, Miller VA. Epidermal Growth Factor Receptor Mutations, Small-Molecule Kinase Inhibitors, and Non-Small-Cell Lung Cancer: Current Knowledge and Future Directions. *JCO* [Internet]. 10 de abril de 2005 [citado 30 de diciembre de 2021];23(11):2556-68. Disponible en:

<https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2005.07.799>

19. Gautschi O, Ratschiller D, Gugger M, Betticher DC, Heighway J. Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: A key driver of malignant transformation. *Lung Cancer* [Internet]. 1 de enero de 2007 [citado 16 de noviembre de 2021];55(1):1-

14. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169500206005307>

20. Dragoj M, Bankovic J, Podolski-Renic A, Buric SS, Pesic M, Tanic N, et al. Association of Overexpressed MYC Gene with Altered PHACTR3 and E2F4 Genes Contributes to Non-small Cell Lung Carcinoma Pathogenesis. *J Med*

Biochem [Internet]. 3 de marzo de 2019 [citado 12 de junio de 2023];38(2):188-95.

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6410994/>

21. Hsu CP, Miaw J, Hsia JY, Shai SE, Chen CY. Concordant expression of the telomerase-associated genes in non-small cell lung cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* [Internet]. 1 de septiembre de 2003 [citado 18 de noviembre de 2021];29(7):594-9. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0748798303001082>

22. Antoniou KM, Samara KD, Lasithiotaki I, Margaritopoulos GA, Soufla G, Lambiri I, et al. Differential telomerase expression in idiopathic pulmonary fibrosis and non-small cell lung cancer. *Oncology Reports* [Internet]. 1 de diciembre de 2013 [citado 18 de noviembre de 2021];30(6):2617-24. Disponible en:

<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2013.2753>

23. Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* [Internet]. junio de 2002 [citado 2 de mayo de 2023];2(6):442-54.

Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrc822>

24. Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *Journal of Cell Biology* [Internet]. 1 de octubre de 1982 [citado 2 de mayo de 2023];95(1):333-

9. Disponible en: <https://doi.org/10.1083/jcb.95.1.333>

25. Smatti MK, Al-Sadeq DW, Ali NH, Pintus G, Abou-Saleh H, Nasrallah GK. Epstein–Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Frontiers in Oncology* [Internet]. 2018 [citado 31 de diciembre de 2021];8:211. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00211>
26. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. EBV Persistence in Memory B Cells In Vivo. *Immunity* [Internet]. 1 de septiembre de 1998 [citado 29 de diciembre de 2021];9(3):395-404. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761300806226>
27. Lowell Clifford A et al. Mapping of the Epstein-Barr virus and C3dg binding sites to a common domain on complement receptor type 2. *J Exp Med* [Internet]. 1 de diciembre de 1989 [citado 22 de noviembre de 2021];170(6):1931-46. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2189535/>
28. Nemerow GR, Houghten RA, Moore MD, Cooper NR. Identification of an epitope in the major envelope protein of Epstein-Barr virus that mediates viral binding to the B lymphocyte EBV receptor (CR2). *Cell*. 10 de febrero de 1989;56(3):369-77.
29. Yates JL, Warren N, Sugden B. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*. 28 de marzo de 1985;313(6005):812-5.

30. Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B. A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. junio de 1984 [citado 22 de noviembre de 2021];81(12):3806-10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC345309/>
31. Becnel D, Abdelghani R, Nanbo A, Avilala J, Kahn J, Li L, et al. Pathogenic Role of Epstein-Barr Virus in Lung Cancers. *Viruses*. 11 de mayo de 2021;13(5):877.
32. Young LS, Rickinson AB. Epstein–Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* [Internet]. octubre de 2004 [citado 27 de diciembre de 2021];4(10):757-68. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrc1452>
33. Tsurumi T, Kobayashi A, Tamai K, Daikoku T, Kurachi R, Nishiyama Y. Functional expression and characterization of the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit. *J Virol*. agosto de 1993;67(8):4651-8.
34. Murata T, Tsurumi T. Switching of EBV cycles between latent and lytic states. *Reviews in Medical Virology* [Internet]. 2014 [citado 18 de noviembre de 2021];24(3):142-53. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rmv.1780>
35. Chesnokova LS, Nishimura SL, Hutt-Fletcher LM. Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to

integrins alphavbeta6 or alphavbeta8. Proc Natl Acad Sci U S A. 1 de diciembre de 2009;106(48):20464-9.

36. Chesnokova LS, Hutt-Fletcher LM. Fusion of Epstein-Barr virus with epithelial cells can be triggered by  $\alpha v\beta 5$  in addition to  $\alpha v\beta 6$  and  $\alpha v\beta 8$ , and integrin binding triggers a conformational change in glycoproteins gHgL. J Virol. diciembre de 2011;85(24):13214-23.

37. Tsang CM, Deng W, Yip YL, Zeng MS, Lo KW, Tsao SW. Epstein-Barr virus infection and persistence in nasopharyngeal epithelial cells. Chin J Cancer [Internet]. noviembre de 2014 [citado 31 de diciembre de 2021];33(11):549-55. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4244318/>

38. Li QX, Young LS, Niedobitek G, Dawson CW, Birkenbach M, Wang F, et al. Epstein-Barr virus infection and replication in a human epithelial cell system. Nature [Internet]. marzo de 1992 [citado 31 de diciembre de 2021];356(6367):347-50. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/356347a0>

39. Fixman ED, Hayward GS, Hayward SD. Replication of Epstein-Barr virus oriLyt: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays. J Virol [Internet]. mayo de 1995 [citado 22 de noviembre de 2021];69(5):2998-3006. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC188999/>

40. Kalla M, Schmeinck A, Bergbauer M, Pich D, Hammerschmidt W. AP-1 homolog BZLF1 of Epstein–Barr virus has two essential functions dependent on the epigenetic state of the viral genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 12 de enero de 2010 [citado 27 de abril de 2023];107(2):850-5. Disponible en: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0911948107>
41. Wen W, Iwakiri D, Yamamoto K, Maruo S, Kanda T, Takada K. Epstein-Barr Virus BZLF1 Gene, a Switch from Latency to Lytic Infection, Is Expressed as an Immediate-Early Gene after Primary Infection of B Lymphocytes. *Journal of Virology* [Internet]. 15 de enero de 2007 [citado 12 de junio de 2023];81(2):1037-42. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jvi.01416-06>
42. Okuno Y, Murata T, Sato Y, Muramatsu H, Ito Y, Watanabe T, et al. Defective Epstein-Barr virus in chronic active infection and haematological malignancy. *Nat Microbiol.* marzo de 2019;4(3):404-13.
43. Hong GK, Kumar P, Wang L, Damania B, Gulley ML, Delecluse HJ, et al. Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factor vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines. *J Virol.* noviembre de 2005;79(22):13984-92.
44. Morales-Sánchez A, Fuentes-Panana EM. The Immunomodulatory Capacity of an Epstein-Barr Virus Abortive Lytic Cycle: Potential Contribution to Viral Tumorigenesis. *Cancers (Basel)* [Internet]. 30 de marzo de 2018 [citado 30

de diciembre de 2021];10(4):98. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5923353/>

45. Kaye KM, Izumi KM, Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. PNAS [Internet]. 1 de octubre de 1993 [citado 27 de diciembre de 2021];90(19):9150-4. Disponible en: <https://www.pnas.org/content/90/19/9150>

46. Wang D, Liebowitz D, Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. Cell [Internet]. 1 de diciembre de 1985 [citado 27 de diciembre de 2021];43(3, Part 2):831-40. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867485902569>

47. Eliopoulos AG, Stack M, Dawson CW, Kaye KM, Hodgkin L, Sihota S, et al. Epstein – Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF- $\kappa$ B pathway involving TNF receptor-associated factors. Oncogene [Internet]. junio de 1997 [citado 27 de diciembre de 2021];14(24):2899-916. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/1201258>

48. Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Blake SMS, Dawson CW, Young LS. Activation of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway by Epstein-Barr Virus-encoded Latent Membrane Protein 1 Coregulates Interleukin-6 and Interleukin-8 Production \*. Journal of Biological Chemistry [Internet]. 4 de junio de

1999 [citado 14 de enero de 2022];274(23):16085-96. Disponible en:  
[https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)72945-7/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)72945-7/abstract)

49. Lo KW, To KF, Huang DP. Focus on nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell* [Internet]. 1 de mayo de 2004 [citado 14 de enero de 2022];5(5):423-8. Disponible en: [https://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108\(04\)00119-9](https://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108(04)00119-9)

50. Sun K, Jia K, Lv H, Wang SQ, Wu Y, Lei H, et al. EBV-Positive Gastric Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives. *Front Oncol* [Internet]. 14 de diciembre de 2020 [citado 22 de junio de 2023];10:583463. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7769310/>

51. Hu H, Luo ML, Desmedt C, Nabavi S, Yadegarynia S, Hong A, et al. Epstein–Barr Virus Infection of Mammary Epithelial Cells Promotes Malignant Transformation. *EBioMedicine* [Internet]. 1 de julio de 2016 [citado 14 de enero de 2022];9:148-60. Disponible en:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352396416302092>

52. Osorio JC, Blanco R, Corvalán AH, Muñoz JP, Calaf GM, Aguayo F. Epstein–Barr Virus Infection in Lung Cancer: Insights and Perspectives. *Pathogens* [Internet]. febrero de 2022 [citado 26 de enero de 2022];11(2):132. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/2/132>

53. Han A jia, Xiong M, Zong Y sheng. Association of Epstein-Barr Virus With Lymphoepithelioma-Like Carcinoma of the Lung in Southern China. *American*

Journal of Clinical Pathology [Internet]. 1 de agosto de 2000 [citado 26 de enero de 2022];114(2):220-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1309/148K-ND54-6NJX-NA61>

54. Hong S, Liu D, Luo S, Fang W, Zhan J, Fu S, et al. The genomic landscape of Epstein-Barr virus-associated pulmonary lymphoepithelioma-like carcinoma. Nat Commun [Internet]. 16 de julio de 2019 [citado 26 de enero de 2022];10(1):3108. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-10902-w>

55. Chen FF, Yan JJ, Lai WW, Jin YT, Su IJ. Epstein-barr virus-associated nonsmall cell lung carcinoma. Cancer [Internet]. 1998 [citado 26 de enero de 2022];82(12):2334-42. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-0142%2819980615%2982%3A12%3C2334%3A%3AAID-CNCR6%3E3.0.CO%3B2-S>

56. Gómez-Román JJ, Martínez MN, Fernández SL, Val-Bernal JF. Epstein-Barr virus-associated adenocarcinomas and squamous-cell lung carcinomas. Mod Pathol [Internet]. abril de 2009 [citado 26 de enero de 2022];22(4):530-7. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/modpathol20097>

57. Carpagnano GE, Lacedonia D, Natalicchio MI, Cotugno G, Zoppo L, Martinelli D, et al. Viral colonization in exhaled breath condensate of lung cancer

patients: Possible role of EBV and CMV. *The Clinical Respiratory Journal* [Internet]. 2018 [citado 26 de enero de 2022];12(2):418-24. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/crj.12531>

58. Bouchet L, Valmary S, Dahan M, Didier A, Galateau-Salle F, Brousset P, et al. Detection of oncogenic virus genomes and gene products in lung carcinoma. *Br J Cancer* [Internet]. febrero de 2005 [citado 26 de enero de 2022];92(4):743-6. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/6602409>

59. Kheir F, Zhao M, Strong MJ, Yu Y, Nanbo A, Flemington EK, et al. Detection of Epstein-Barr Virus Infection in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 31 de mayo de 2019 [citado 14 de enero de 2022];11(6):759. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627930/>

60. Tsang CM, Tsao SW. The role of Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Viol Sin* [Internet]. abril de 2015 [citado 3 de mayo de 2023];30(2):107-21. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s12250-015-3592-5>

61. Hoebe EK, Wille C, Hopmans ES, Robinson AR, Middeldorp JM, Kenney SC, et al. Epstein-Barr virus transcription activator R upregulates BART1 expression by direct binding to its promoter, independent of methylation. *J Virol*. octubre de 2012;86(20):11322-32.

62. Blanco R, Aguayo F. Role of BamHI-A Rightward Frame 1 in Epstein–Barr Virus-Associated Epithelial Malignancies. *Biology* [Internet]. diciembre de 2020 [citado 14 de enero de 2022];9(12):461. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-7737/9/12/461>
63. Wiech T, Nikolopoulos E, Lassman S, Heidt T, Schöpflin A, Sarbia M, et al. Cyclin D1 expression is induced by viral BARP1 and is overexpressed in EBV-associated gastric cancer. *Virchows Arch.* junio de 2008;452(6):621-7.
64. Chang MS, Kim DH, Roh JK, Middeldorp JM, Kim YS, Kim S, et al. Epstein-Barr Virus-Encoded BARP1 Promotes Proliferation of Gastric Carcinoma Cells through Regulation of NF- $\kappa$ B. *J Virol* [Internet]. octubre de 2013 [citado 27 de diciembre de 2021];87(19):10515-23. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3807382/>
65. Wang Q, Tsao SW, Ooka T, Nicholls JM, Cheung HW, Fu S, et al. Anti-apoptotic role of BARP1 in gastric cancer cells. *Cancer Letters* [Internet]. 8 de julio de 2006 [citado 14 de enero de 2022];238(1):90-103. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383505005896>
66. Jiang R, Cabras G, Sheng W, Zeng Y, Ooka T. Synergism of BARP1 with Ras induces malignant transformation in primary primate epithelial cells and human nasopharyngeal epithelial cells. *Neoplasia.* septiembre de 2009;11(9):964-73.

67. Hayes DP, Brink AA, Vervoort MB, Middeldorp JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Expression of Epstein-Barr virus (EBV) transcripts encoding homologues to important human proteins in diverse EBV associated diseases. *Mol Pathol*. abril de 1999;52(2):97-103.
68. Hoebe EK, Le Large TYS, Greijer AE, Middeldorp JM. BamHI-A rightward frame 1, an Epstein-Barr virus-encoded oncogene and immune modulator. *Reviews in Medical Virology* [Internet]. 2013 [citado 14 de enero de 2022];23(6):367-83. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rmv.1758>
69. Tao Q. Epstein-Barr virus (EBV) and its associated human cancers - Genetics, epigenetics, pathobiology and novel therapeutics. *Front Biosci* [Internet]. 2006 [citado 12 de junio de 2023];11(1):2672. Disponible en: <https://imrpess.com/journal/FBL/11/3/10.2741/2000>
70. Zhang Y, Xu M, Zhang X, Chu F, Zhou T. MAPK/c-Jun signaling pathway contributes to the upregulation of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL induced by Epstein-Barr virus-encoded BARF1 in gastric carcinoma cells. *Oncology Letters* [Internet]. 1 de mayo de 2018 [citado 13 de junio de 2023];15(5):7537-44. Disponible en: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.8293>

71. Kim DH, Chang MS, Yoon CJ, Middeldorp JM, Martinez OM, Byeon S ju, et al. Epstein-Barr virus BARP1-induced NFκB/miR-146a/SMAD4 alterations in stomach cancer cells. *Oncotarget* [Internet]. 9 de julio de 2016 [citado 12 de enero de 2022];7(50):82213-27. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5347686/>
72. Li S, Zhang F, Li J, Hu X, Zhao W, Zhang K, et al. The role of the Epstein-Barr virus-encoded BARP1 gene expressed in human gastric epithelial cells. *The Turkish Journal of Gastroenterology* [Internet]. noviembre de 2020 [citado 6 de junio de 2023];31(11):775. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7759223/>
73. Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* [Internet]. 1 de marzo de 2000 [citado 30 de mayo de 2023];21(3):379-85. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.379>
74. Bruner HC, Derksen PWB. Loss of E-Cadherin-Dependent Cell–Cell Adhesion and the Development and Progression of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. marzo de 2018 [citado 13 de junio de 2023];10(3):a029330. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5830899/>
75. Sheetz MP, Felsenfeld DP, Galbraith CG. Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends in Cell Biology* [Internet]. 1 de

febrero de 1998 [citado 22 de mayo de 2023];8(2):51-4. Disponible en:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892498800056>

76. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* [Internet]. mayo de 2003 [citado 22 de mayo de 2023];3(5):362-74. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrc1075>

77. Brenner CA, Adler RR, Rappolee DA, Pedersen RA, Werb Z. Genes for extracellular-matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Dev* [Internet]. junio de 1989 [citado 13 de junio de 2023];3(6):848-59. Disponible en: <http://genesdev.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gad.3.6.848>

78. Maekawa K ichi, Sato H, Furukawa M, Yoshizaki T. Inhibition of cervical lymph node metastasis by marimastat (BB-2516) in an orthotopic oral squamous cell carcinoma implantation model. *Clin Exp Metastasis* [Internet]. 1 de octubre de 2002 [citado 24 de mayo de 2023];19(6):513-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1023/A:1020329411957>

79. Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Becker JC, Ruiter DJ, van Muijen GNP. Coexpression of Integrin  $\alpha\beta 3$  and Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) Coincides with MMP-2 Activation: Correlation with Melanoma Progression. *Journal of Investigative Dermatology* [Internet]. 1 de octubre de 2000 [citado 24 de mayo

de 2023];115(4):625-32. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15410115>

80. Brown PD, Giavazzi R. Matrix metalloproteinase inhibition: A review of anti-tumour activity. *Annals of Oncology* [Internet]. 1 de diciembre de 1995 [citado 24

de mayo de 2023];6(10):967-74. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923753419614201>

81. Ellenbroek SIJ, Collard JG. Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis* [Internet]. 1 de noviembre de 2007 [citado 25 de mayo

de 2023];24(8):657-72. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10585-007-9119-1>

82. Dave JM, Bayless KJ. Vimentin as an Integral Regulator of Cell Adhesion and Endothelial Sprouting. *Microcirculation* [Internet]. mayo de 2014 [citado 13 de

junio de 2023];21(4):333-44. Disponible en:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/micc.12111>

83. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 1 de septiembre de 2011 [citado 30 de

mayo de 2023];68(18):3033-46. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0735-1>

84. Phua DCY, Humbert PO, Hunziker W. Vimentin Regulates Scribble Activity by Protecting It from Proteasomal Degradation. *MBoC* [Internet]. 15 de junio de

2009 [citado 30 de mayo de 2023];20(12):2841-55. Disponible en: <https://www.molbiolcell.org/doi/full/10.1091/mbc.e08-02-0199>

85. Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, Mpindi JP, Nevo J, Gjerdrum C, et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene* [Internet]. marzo de 2011 [citado 30 de mayo de 2023];30(12):1436-48. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/onc2010509>

86. van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 1 de diciembre de 2008 [citado 30 de mayo de 2023];65(23):3756-88. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1>

87. Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 1 de octubre de 2018 [citado 30 de mayo de 2023];18(1):939. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4845-0>

88. Han X, Na T, Wu T, Yuan BZ. Human lung epithelial BEAS-2B cells exhibit characteristics of mesenchymal stem cells. *PLoS One* [Internet]. 3 de enero de 2020 [citado 13 de junio de 2023];15(1):e0227174. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6941928/>

89. Malm SW, Amouzougan EA, Klimecki WT. Fetal bovine serum induces sustained, but reversible, epithelial-mesenchymal transition in the BEAS-2B cell line. *Toxicol In Vitro*. agosto de 2018;50:383-90.
90. Kenfield SA, Wei EK, Stampfer MJ, Rosner BA, Colditz GA. Comparison of Aspects of Smoking Among Four Histologic Types of Lung Cancer. *Tob Control* [Internet]. junio de 2008 [citado 30 de mayo de 2023];17(3):198-204. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3044470/>
91. Akhtar N, Bansal JG. Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Current Problems in Cancer* [Internet]. 1 de septiembre de 2017 [citado 13 de junio de 2023];41(5):328-39. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147027216302124>
92. Pittaluga S, Wong MP, Chung LP, Loke SL. Clonal Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol*. julio de 1993;17(7):678-82.
93. Galloway DA, McDougall JK. The oncogenic potential of herpes simplex viruses: evidence for a 'hit-and-run' mechanism. *Nature* [Internet]. marzo de 1983 [citado 13 de junio de 2023];302(5903):21-4. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/302021a0>

94. Ambinder RF. Gammaherpesviruses and “Hit-and-Run” Oncogenesis. *Am J Pathol* [Internet]. enero de 2000 [citado 30 de mayo de 2023];156(1):1-3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1868625/>
95. Nevels M, Täuber B, Spruss T, Wolf H, Dobner T. “Hit-and-Run” Transformation by Adenovirus Oncogenes. *Journal of Virology* [Internet]. abril de 2001 [citado 13 de junio de 2023];75(7):3089-94. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jvi.75.7.3089-3094.2001>
96. Staratschek-Jox A, Kotkowski S, Belge G, Rüdiger T, Bullerdiek J, Diehl V, et al. Detection of Epstein-Barr Virus in Hodgkin-Reed-Sternberg Cells. *Am J Pathol* [Internet]. enero de 2000 [citado 30 de mayo de 2023];156(1):209-16. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1868626/>
97. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. Sowa ME, Bennett EJ, Gygi SP, Harper JW. *Cell*. 2009 Jul 23. 138(2):389-403. 10.1016/j.cell.2009.04.042