

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



Interacción funcional entre Virus Epstein-Barr y *Porphyromonas gingivalis* en cáncer oral: Rol de BARRF-1 y sus interacciones con relación a propiedades oncogénicas e inflamatorias de *Porphyromonas gingivalis*

DANIELA KATHERINE NUÑEZ ACURIO

ACTIVIDAD FORMATIVA EQUIVALENTE PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER
EN MICROBIOLOGÍA

Directores de Tesis: Francisco Aguayo, Ph.D
Denisse Bravo, Ph.D

2021

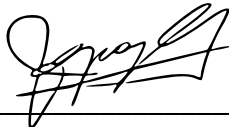
**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

Daniela Katherine Núñez Acurio

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magister en Microbiología** en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de mayo de 2021



Prof. Dr.(a) Francisco Aguayo



Prof. Dra Denisse Bravo

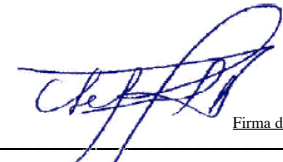
DIRECTORES DE TESIS

Facultad de Medicina, Facultad de Odontología, Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

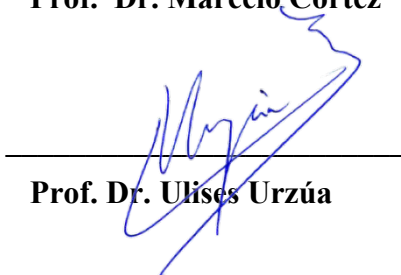


Prof. Dr. Marcelo Cortez

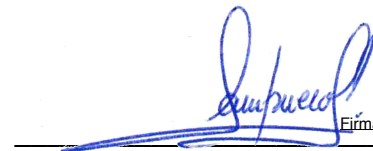


Firma digital

Prof. Dra. Claudia Lefimil



Prof. Dr. Ulises Urzúa



Firma digital

**Prof. Dra Sandra Ampuero
Presidenta Comisión**

DEDICATORIA

A aquellas personas que han entregado una parte de sí, para hacer de mí un mosaico con cada una de sus piezas.

A mis padres y hermano que me enseñaron que el amor no conoce de distancias, me dieron la fuerza para continuar y han sido el motor de mi vida.

A César quien me ha acompañado en esta aventura, con su paciencia y amor ha sido mi soporte emocional.

“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”. Thomas Chalmers

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento más profundo a mis tutores PhD. Francisco Aguayo y PhD. Denisse Bravo, por sus enseñanzas, paciencia y apoyo.

Mi especial agradecimiento al profesor PhD. Felipe del Canto, académico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y el profesor PhD. Pablo Villalobos, de la Facultad de Ciencias, quienes amablemente aportaron con su guía para la realización de los análisis bioinformáticos.

Quiero agradecer a mi familia, por ser mi constante motivación para superarme en todos los aspectos durante el transcurso de mi vida. A César por compartir los días de fracasos y de logros durante la realización de este trabajo.

Además, quiero agradecer a todas las personas quienes me recibieron cálidamente en este país y me han enseñado una cultura enriquecedora.

Por último, agradezco al financiamiento otorgado por:

- Proyecto Fondecyt 1200877 (a D.B.)
- Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS) 15130011 (D.B. y F.A)
- Proyecto Puente ICBM (2020/2021) (a F.A.)

INDICE

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1. Factores de riesgo para el desarrollo de cáncer oral	12
2. Virus Epstein-Barr	12
2.1. <i>Ciclo de replicación del virus Epstein-Barr en células epiteliales</i>	13
2.2. <i>Ciclo de replicación del virus Epstein-Barr en linfocitos B</i>	15
3. Virus Epstein-Barr y cáncer oral	16
3.1. <i>BamHI-A rightward frame 1 (BARF-1) como proteína oncogénica de VEB</i>	17
3.2. <i>Propiedades tumorigénicas de BARF-1</i>	19
4. Microbiota oral	21
4.1. <i>Periodontitis</i>	21
4.2. <i>Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis)</i>	23
4.3. <i>Porphyromonas gingivalis y su asociación con el desarrollo de cáncer oral</i>	24
5. VEB y P. gingivalis en la cavidad oral	25
2. HIPÓTESIS	27
3. OBJETIVO GENERAL	27
4. OBJETIVOS ESPECIFICOS	27
5. MATERIALES Y METODOS	28
1. Análisis filogenético	28
2. Ensayo <i>in-silico</i> de interacción entre la proteína BARF-1 y proteínas celulares	29
3. Planteamiento de modelo teórico de interacción entre VEB y P. gingivalis	29
4. RESULTADOS	31
1. Variabilidad génica de BARF-1	31
1.1. <i>Variabilidad a nivel de ADN</i>	32
1.2. <i>Variabilidad aminoacídica</i>	34
1.3. <i>Mutaciones en la estructura secundaria de BARF-1</i>	37
1.4. <i>Análisis filogenético de las secuencias</i>	41
2. Ensayo <i>in-silico</i> de interacción proteína BARF-1 y proteínas celulares	45
3. Modelo teórico de interacción entre VEB y P. gingivalis	46
5. DISCUSIÓN	506.
BIBLIOGRAFÍA	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura genómica de VEB

Figura 2. Ciclo replicativo de VEB en células epiteliales

Figura 3. Esquema de la proteína BARF-1

Figura 4. Etiología de la periodontitis

Figura 5. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de la proteína BARF-1 que presentan mutaciones puntuales

Figura 6. Localización de aminoácidos en la estructura secundaria de BARF-1, donde ocurren mutaciones

Figura 7. Árbol filogenético circular de la proteína BARF-1

Figura 8. Árbol filogenético rectangular de la secuencia nucleotídica de BARF-1

Figura 9. Árbol filogenético rectangular de la proteína BARF-1

Figura 10. Interacciones entre BARF-1 y proteínas celulares

Figura 11. Modelo de interacción sugerido entre VEB y *P. gingivalis* en el desarrollo del cáncer oral

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción del origen geográfico y la patología asociada de las 856 secuencias de BARF-1

Tabla 2. Mutaciones en 50 secuencias nucleotídicas de BARF-1 de VEB

Tabla 3. Mutaciones observadas en las 856 secuencias aminoacídicas de la proteína BARF-1

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descripción
ADNss	ADN de cadena simple
CG	Carcinoma gástrico
CGaVEB	Cáncer gástrico asociado a virus Epstein-Barr
COCE	Carcinoma oral de células escamosas
CR2	Receptor de complejo tipo 2
GECs	Células gingivales epiteliales
hCSF	Factor estimulante de colonia humano
hCSF-R	Receptor del factor estimulante de colonia humano
HDACs	Histonas desacetilasas
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IE	Genes inmediatamente tempranos
IR	Secuencias repetitivas internas
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
LH	Linfoma de Hodking
LPD	Trastorno linfoproliferativo
LPS	Lipopolisacárido
MI	Mononucleosis infecciosa
NK/T	Células asesinas naturales y linfocitos T
NPC	Carcinoma nasofaríngeo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDS	Teoría de sinergia polimicrobiana y disbiosis
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TEM	Transición epitelial mesenquimal
TR	Secuencias repetitivas terminales
VEB	Virus Epstein-Barr
VPH	Virus papiloma humano
VPH-HR	Virus papiloma humano de alto riesgo

RESUMEN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el tipo más común de cáncer oral. Su desarrollo se ha asociado a diversos factores como el tabaquismo y el consumo de alcohol. Además, se ha sugerido que algunos microorganismos de la cavidad oral son factores de riesgo de desarrollo de cáncer oral. El virus Epstein-Barr (VEB), que establece una infección persistente en la cavidad oral y se elimina de manera intermitente en la saliva, se ha asociado con el desarrollo de ciertos linfomas y tumores epiteliales como carcinoma nasofaríngeo (NPC) y un subgrupo de tumores gástricos (CGaVEB). Además, VEB ha sido detectado en COCE, aunque su rol etiológico en este tipo de cáncer no ha sido establecido. La proteína oncogénica BARF-1 de VEB, se ha detectado en el 90% de NPC y en una mayoría de CGaVEB, pero no en linfomas, por lo que se considera una oncoproteína específica de tumores epiteliales. No hay estudios de BARF-1 en cáncer oral y poco se conoce sobre sus interacciones con proteínas del hospedero asociadas al control del ciclo celular y como su variabilidad genómica y la conservación de su estructura pueden afectar estas interacciones. Por otro lado, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) es considerado un patobionte clave en el desarrollo de enfermedades periodontales. La exposición persistente a *P. gingivalis* promueve cambios tumorigénicos en células epiteliales orales, lo que sugiere que la infección crónica por *P. gingivalis* es un factor de riesgo de COCE. Dado que la cavidad oral constituye un sitio donde se detectan tanto VEB como *P. gingivalis*, y debido al potencial oncogénico de ambos, el objetivo de esta tesis es caracterizar la interacción funcional entre VEB y *P. gingivalis* mediante la proposición de un modelo teórico cuyo eje central es la proteína BARF-1, su diversidad e interacciones, con relación a las propiedades inflamatorias y oncogénicas de *P. gingivalis*.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (COCE) is the most common type of oral cancer. Its development has been associated with various factors such as smoking and alcohol consumption. In addition, some microorganisms in the oral cavity have been suggested to be risk factors for the development of oral cancer. Epstein-Barr virus (EBV), which establishes a persistent infection in the oral cavity and is shed intermittently in saliva, has been associated with the development of certain lymphomas and epithelial tumors such as nasopharyngeal carcinoma (NPC) and a subset of gastric tumors (GCaVEB). Furthermore, EBV has been detected in COCE, although its etiological role in this type of cancer has not been established. The oncogenic protein BARF-1 of EBV has been detected in 90% of NPC and in a majority of GCaVEB, but not in lymphomas, so it is considered a specific oncoprotein of epithelial tumors. There are no studies of BARF-1 in oral cancer and little is known about its interactions with host proteins associated with the control of the cell cycle and how its genomic variability and the conservation of its structure can affect these interactions. On the other hand, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) is considered a key pathobiont in the development of periodontal diseases. Persistent exposure to *P. gingivalis* promotes tumorigenic changes in oral epithelial cells, suggesting that chronic *P. gingivalis* infection is a risk factor for COCE. Given that the oral cavity constitutes a site where both EBV and *P. gingivalis* are detected, and due to the oncogenic potential of both, the objective of this thesis is to characterize the functional interaction between EBV and *P. gingivalis* by proposing a theoretical model whose central axis is the BARF-1 protein, its diversity and interactions, in relation to the inflammatory and oncogenic properties of *P. gingivalis*.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muertes a nivel mundial. En 2020 alcanzó una cifra de 19,3 millones de personas diagnosticadas y 10 millones de defunciones de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1). Se puede definir al cáncer como un proceso en el cual ciertas células pierden la capacidad de regulación de su ciclo proliferativo y control de la apoptosis, además de la adquisición de propiedades como migración, invasión y metástasis (2). Particularmente, el cáncer de labio y cavidad oral es el cuarto más común y la sexta causa de muerte por cáncer en los países de ingresos medios y bajos (3). En 2018, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) informó 354.864 nuevos casos lo que representa el 2,1% de todos los cánceres (4). Los países de mayor prevalencia son India, Pakistán, Afganistán, Bangladesh, Sri Lanka, Bután, Nepal, Irán, Maldivas y Papua Nueva Guinea (4–6). En América Latina, las tasas de incidencia y mortalidad más altas se registran en Brasil, seguido de México, Argentina, Colombia y Cuba (7,8). El cáncer oral es una entidad clínica que se desarrolla en los labios, mejillas, piso de la boca, lengua móvil, paladar duro, hueso alveolar, trigono retromolar y paladar blando (9). El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el tipo histológico de cáncer oral más frecuente (90%), seguido de neoplasias malignas de glándulas salivales, sarcomas y melanomas (6%); y linfomas de Hodgkin (4%) (10). El cáncer oral se identifica en personas con una edad media de 50 años, siendo tres veces más frecuente en hombres que en mujeres (11–13). La tasa de supervivencia a cinco años es del 54% y se debe principalmente al diagnóstico en etapa tardía de la enfermedad (13,14). La presentación clínica de este cáncer es una lesión ulcerada en la cavidad bucal, y la presencia de dientes móviles, sangrado, dolor y entumecimiento en la boca (9). La leucoplasia, la eritroplasia, el liquen plano oral y la fibrosis submucosa oral son lesiones precancerosas identificadas (15).

1. Factores de riesgo para el desarrollo de cáncer oral

El tabaquismo y el consumo de alcohol se consideran los principales factores de riesgo de cáncer oral (16,17). El riesgo de cáncer oral aumenta al menos cinco veces en aquellos sujetos que fuman tabaco y beben alcohol (18,19). Además, se han propuesto una variedad de factores de riesgo relacionados con el hospedero entre los cuales se describen la higiene bucal deficiente, comportamiento sexual, desnutrición, así como dietas bajas en frutas y verduras. De hecho, aproximadamente el 15% de los cánceres orofaríngeos son atribuidos a deficiencias dietéticas por un desbalance en el consumo de fibra (20). Además, existen factores genéticos poco estudiados como defectos heredados que causan anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, o tumores primarios múltiples (21–24). Sin embargo, algunos sujetos no tienen estos factores de riesgo conocidos y presentan lesiones orales malignas (25,26). Por tanto, se ha sugerido la participación de **factores adicionales potencialmente implicados en el desarrollo de cáncer oral**, entre los que se encuentran algunas infecciones virales y ciertas bacterias que forman parte del microbioma oral (27,28). Por ejemplo, el virus papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR), en particular VPH16 y 18, se detectan en el 24-56% de los cánceres orales en todo el mundo (29–31). Además, el virus Epstein-Barr (VEB) ha sido estudiado por su asociación con el desarrollo de COCE (32,33) y enfermedades orales inflamatorias, dentro de las cuales la periodontitis se describe como la más común y que podría contribuir al desarrollo del cáncer oral (34).

2. Virus Epstein-Barr

El VEB es un virus de ADN lineal bicatenario que pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia de gammaherpesvirus y género *Lymphocryptovirus*. Su genoma de aproximadamente 172 kb de longitud está organizado en 85 marcos de lectura abiertos, y está flanqueado por

secuencias repetitivas terminales (TR); además se encuentra dividido en cinco dominios de secuencias (U1-U5) y en cuatro dominios de repetición directos internos (IR1-IR4). El genoma viral contiene dos orígenes de replicación OriP y OriLyt que permiten la replicación del genoma viral durante el ciclo de latencia y lítico, respectivamente (35) (**Figura 1**).

El VEB presenta tropismo fundamentalmente por células B y células epiteliales. La infección primaria se inicia en células epiteliales orales en forma lítica o bien ocurre transcitosis a través de la mucosa del anillo de Waldeyer, accediendo a los linfocitos B, donde habitualmente persiste en forma latente (36).

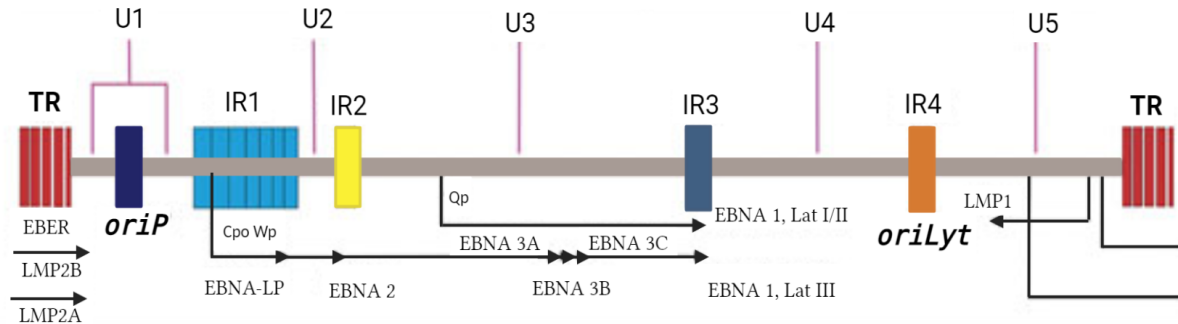


Figura 1. Estructura genómica de VEB. El VEB presenta un genoma de ADN lineal de 172kb aproximadamente. El genoma de VEB contiene una serie de repeticiones directas terminales (TR) de 0,5 kb y secuencias de repetición internas (IR1-IR4) que lo dividen en dominios de secuencia cortos y largos (U1-U5). También se muestran las posiciones de los orígenes de replicación latente (oriP) y lítico (oriLyt) (ISSN: 0121-0807)

2.1. Ciclo de replicación del virus Epstein-Barr en células epiteliales

En las células epiteliales, la entrada del virus se produce por fusión de la membrana celular a través del complejo de fusión viral gH/gL con las integrinas $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ y $\alpha\beta 8$ (37). Además, se sugiere que la interacción con el receptor celular EphA2 es necesaria para la entrada del virus (38). Inmediatamente, la cápside se desensambla, las proteínas del tegumento se liberan en el citoplasma y el genoma viral se transporta al núcleo (36). La proteína BNRF1 de VEB interactúa con la proteína nuclear del hospedador Daxx, interrumpiendo el complejo de remodelación de

cromatina Daxx / Atrx para facilitar el inicio de la transcripción de genes virales (39), que es un proceso regulado temporalmente. Las proteínas inmediatamente tempranas (IE), BZLF1 y BRLF1, actúan como factores de transcripción que promueven la expresión de genes tempranos (E), incluidos los que codifican la síntesis de ADN viral (40). Estos productos de expresión génica incluyen la subunidad catalítica de la ADN polimerasa viral (BALF5), el factor accesorio de la polimerasa (BMRF1), la proteína de unión al ADNss (hebra simple, por sus siglas en inglés) (BALF2) y los componentes del complejo helicasa / primasa (BBLF4, BSLF1-BBLF2/3) (41). El ciclo de replicación termina con la expresión de genes tardíos (L) que incluyen componentes estructurales como BLRF2 (proteína de tegumento) y las proteínas de empaquetamiento de ADN BXLF2 (gH), BALF4 (gB, gp110, gp125) y BKRF2 (gL, gp25), entre otras (41), generando viriones que pueden infectar otras células susceptibles. Por lo tanto, el virus puede colonizar glándulas salivales, tejidos linfoides y células epiteliales de la orofaringe, circulando principalmente entre la sangre periférica y el anillo de Waldeyer, donde es capaz de infectar células B (42) (**Figura 2**).

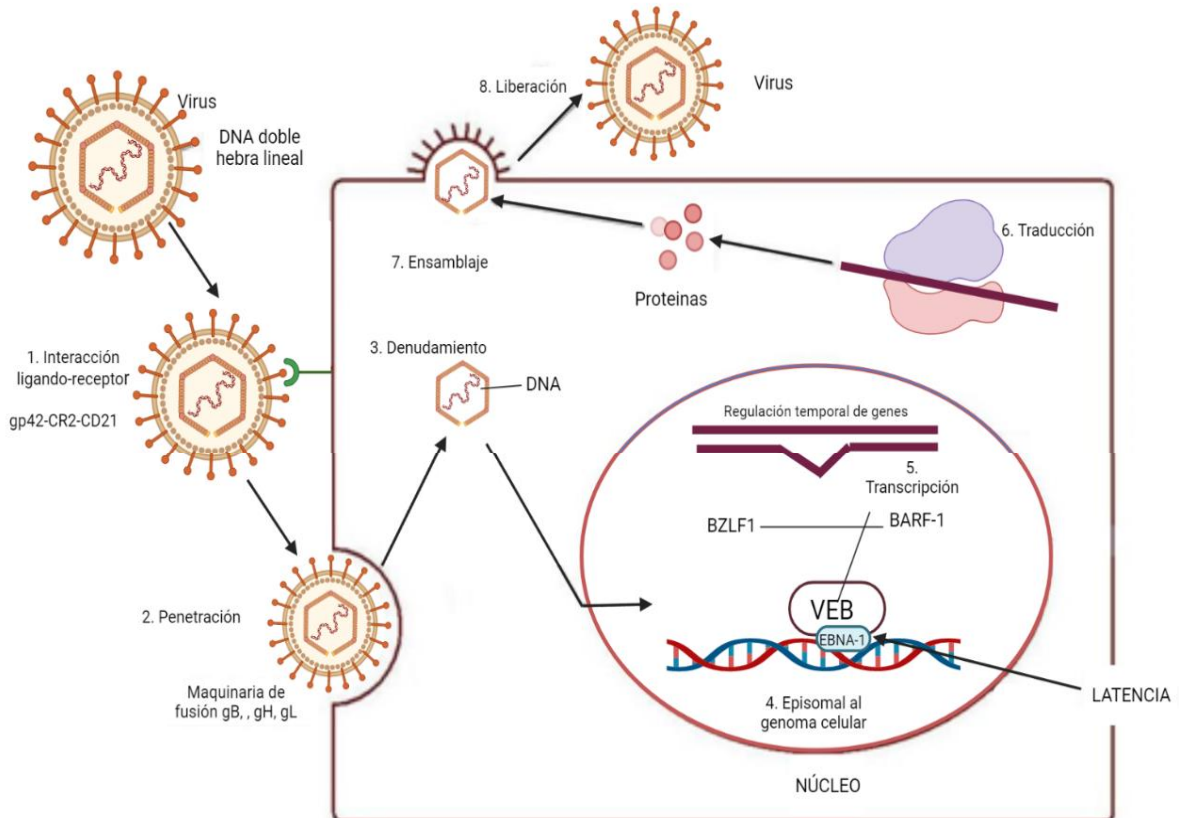


Figura 2. Ciclo replicativo de VEB en células epiteliales. El VEB establece un ciclo lítico en células epiteliales, el cual culmina con la generación de nuevas partículas virales y lisis celular. En este ciclo se expresan todos los genes necesarios para la maduración viral. Bajo ciertas condiciones, el virus puede establecer latencia en células epiteliales, expresando genes líticos tempranos como BARF-1 pero sin la generación de viriones, lo cual forma parte del ciclo lítico abortivo (**Modificado de:** (43)).

2.2. Ciclo de replicación del virus Epstein-Barr en linfocitos B

En el linfocito B se genera un ciclo latente de VEB, cuyo genoma persiste de manera episomal en el núcleo celular y con un programa de expresión génica restringido y altamente regulado (44). De esta manera, se definen cuatro perfiles de latencia viral: la latencia 0, caracterizado por la ausencia de expresión génica viral y ocurre en células B de memoria. La latencia I, en la cual se expresan *Epstein-Barr Nuclear Antigen 1* (EBNA-1), *BamHI A rightward transcripts* (BART) y *Epstein-Barr virus-encoded small RNAs* (EBERs), ocurre en linfoma de Burkitt. La latencia II involucra expresión de EBNA1, la proteína de membrana latente (LMP-1 y LMP-2), característico de linfoma Hodking y linfoma de células NK/T. Finalmente, durante la latencia

III se expresan todos los genes de latencia viral (EBNA-LP, EBNA2, EBNA 3s, EBNA1, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B) (45). Bajo condiciones de diferenciación de células B a células plasmáticas, el VEB es capaz de completar su ciclo replicativo, lo cual se traduce en activación del ciclo lítico, liberación de viriones y su diseminación (46).

3. Virus Epstein-Barr y cáncer oral

La infección por VEB está presente en más del 90% de la población humana (47–49). El virus se transmite a través de la saliva, siendo la infección generalmente asintomática durante la niñez, aunque, si la infección ocurre en la adolescencia puede conducir a mononucleosis infecciosa (MI) caracterizada por linfadenopatía y esplenomegalia (49). Además, se ha asociado al virus con el desarrollo de enfermedades malignas. En 1997, la IARC declaró a VEB como el agente causal del carcinoma nasofaríngeo (50), aunque también está relacionado con el desarrollo de varios tipos de cánceres como el linfoma de Hodgkin (LH), linfoma de células asesinas naturales/linfocitos T (NK/T), cáncer gástrico (CG) y trastornos linfoproliferativos (LPD) (51–55).

Recientemente, la infección por VEB se ha asociado con el desarrollo de COCE. Por medio de la detección de EBERs mediante Hibridación *In situ* (ISH, por sus siglas en inglés) y de EBNA1 o LMP1 por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), se ha sugerido un papel de VEB en el desarrollo de COCE (56). Se han detectado genomas de VEB en aproximadamente el 45% de COCE mediante PCR e ISH (33,57,58) y en el 80% mediante aproximaciones transcriptómicas (59). De hecho, She et al., mostraron asociación entre la infección por VEB y mayor riesgo de COCE (Odds ratio (OR) de 5,03) (32). Además, un metaanálisis que consideró 53 estudios entre 1990 y 2019, ha mostrado evidencia que las

personas infectadas por el VEB tienen un riesgo 2,5 veces mayor de desarrollar COCE (33).

La reactivación viral por parte de los linfocitos B infectados, permite que nuevas partículas virales sean capaces de infectar células epiteliales. A diferencia de lo que ocurre en la infección primaria (ciclo lítico), en esta infección se ha observado **incremento en la mantención del genoma viral en células epiteliales que muestran lesiones premalignas** (daño previo en el ADN), estableciendo programas de latencia tipo I y II. Entre las marcas de premalignidad se ha observado la sobreexpresión de Ciclina D1 y pérdida de CDKN2A (p16) (60–62). Sin embargo, se requieren estudios adicionales para determinar los factores y cambios moleculares que condicionan el establecimiento de la latencia de VEB en células epiteliales, requisito fundamental para desarrollo neoplásico promovido por este virus.

Un estudio demostró que las formas latentes de VEB promueven la proliferación celular en algunas células epiteliales orales, induciendo una disminución significativa de E-cadherina y ZO-1 (56). De hecho, la latencia viral permite la expresión sostenida de oncogenes virales, junto con evitar la detección inmune y los efectos citopáticos propios de la fase de replicación viral (60).

3.1. BamHI-A rightward frame 1 (BARF-1) como proteína oncogénica de VEB

BARF-1 codifica una proteína de 221 aminoácidos y es considerado un oncogén exclusivamente epitelial del VEB (46). Se detecta en el 90% de los carcinomas VEB-positivos durante la latencia y está ausente en linfomas VEB-positivos (63–65). Seto, et al. observaron la expresión de BARF-1 en el 93,4% y el 83,3% de las muestras de NPC y GC positivas para VEB respectivamente (66).

BARF-1 es un gen temprano cuya expresión es promovida por los reguladores maestros del *switch* latente/lítico, los factores de transcripción BZLF1 (Zta) y BRLF1 (Rta). Se ha

demostrado que la activación del ciclo lítico sin maduración viral, constituye un evento importante en el desarrollo de cáncer promovido por la infección por VEB (67,68). El ciclo lítico que no culmina con maduración viral se denomina ciclo lítico abortivo (69), siendo BАРF-1 una proteína específicamente expresada durante la carcinogénesis epitelial. Esta proteína está estructurada en dos dominios considerados tipo inmunoglobulina (Ig-like domains). El dominio N-terminal corresponde a los residuos 21 al 123 y el dominio C-terminal corresponde a los residuos 125 a 221 (**Figura 3a**). BАРF-1 se sintetiza en el retículo endoplásmico y es postraduccionalmente modificado en el complejo de Golgi con una glicosilación ligada al extremo N-terminal con alto contenido de manosa (GlcNac2-Man9) en el residuo de asparagina 95 (Asn95). La N-glicosilación de BАРF-1 juega un papel crucial en el plegamiento, translocación subcelular y secreción final. BАРF-1 se escinde después de los 20 primeros aminoácidos y se secreta como un complejo hexamérico compuesto por tres dímeros interconectados dispuestos en dos capas, con un peso de 31-33 KDa cada molécula (**Figura 3b**) (35)(68).

Existe evidencia que BАРF-1 interactúa físicamente con el factor estimulante de colonias humano (hCSF), en un sitio diferente al de interacción con el receptor de hCSF (R-hCSF) (70). A través de los residuos 34-39 y los residuos 82-86 ubicados en el extremo N-terminal BАРF-1 forman una estructura de “pinza” capaz de capturar a hCSF, cambiando su conformación e inhibiendo alostéricamente la interacción con su receptor (70,71). En consecuencia, **la conformación adecuada de BАРF-1** determina su interacción con hCSF, y podría también **determinar su interacción con otras proteínas asociadas al ciclo celular**, dadas sus propiedades tumorigénicas.

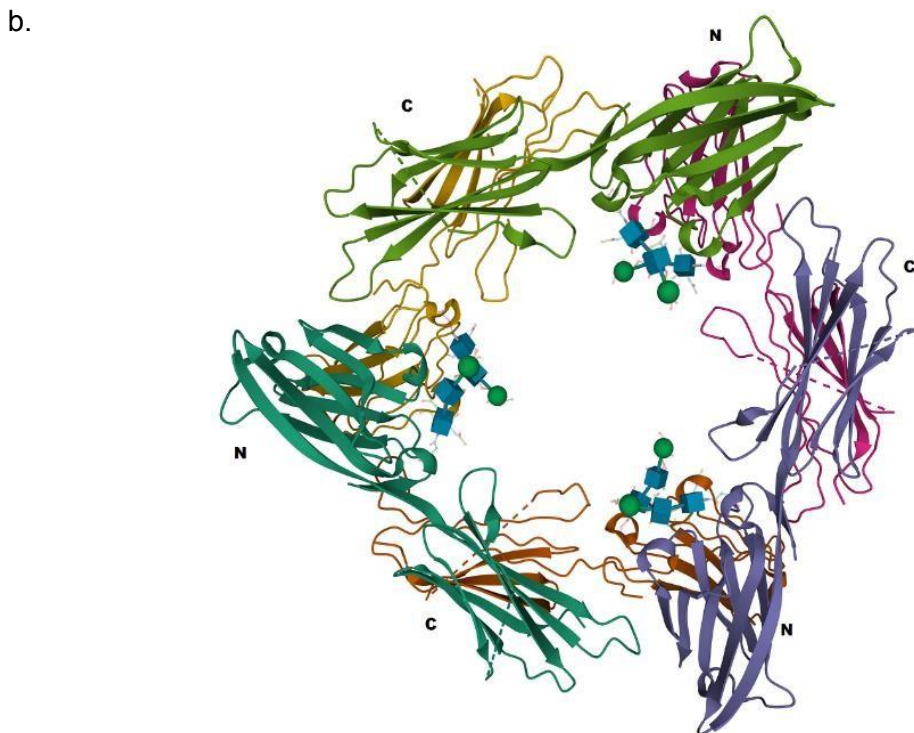
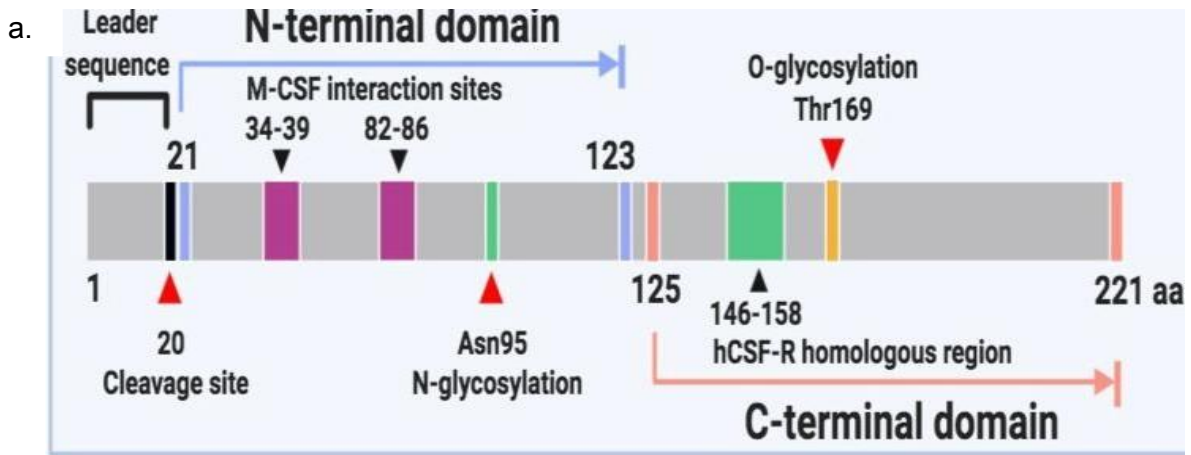


Figura 3. Esquema de la proteína BARF-1. a) La proteína BARF-1 consta de 221 aminoácidos. El dominio N-terminal (21-123aa) en color celeste, el dominio C-terminal (125-221aa) en color naranja. Se muestran glicosilaciones en Asn95 y Thr169, sitios de homología con el receptor del factor estimulante de colonias humana (hCSF) y el sitio de unión a éste. b) Disposición tridimensional esquemática de BARF-1 y los dominios en el hexámero (71).

3.2. Propiedades tumorigénicas de BARF-1

Se han descrito propiedades tumorigénicas de BARF-1 entre las cuales se encuentra su capacidad de promover proliferación celular. En efecto, se ha observado un incremento en la proliferación de células epiteliales tratadas con sBARF-1, en comparación a células control (72).

En células HaCaT se observó que BARF-1 promueve incremento en la expresión de ciclina D1, la cual regula la transición de la fase del ciclo celular G1 a S (73). Además, se observó reducción en la expresión de p21 (Inhibidor de ciclina D1) en células de cáncer gástrico transfectadas con un vector codificante para BARF-1, demostrando su participación en la proliferación y supervivencia celular (74).

Se ha demostrado que los primeros 54 aminoácidos en el extremo N-terminal de BARF-1, incluido el dominio que atraviesa la membrana, son responsables de la regulación positiva de la proteína antiapoptótica celular Bcl-2, el cual es un mediador en el escape de la senescencia tras privación de suero y el crecimiento libre de anclaje, sugiriendo su participación en la inhibición de la apoptosis (75). Además, BARF-1 presenta capacidad de promover immortalización y transformación celular en cooperación con H-Ras (76). Por otro lado, se ha observado que células epiteliales transfectadas con un plásmido codificante para BARF-1, exhiben aumento de la actividad telomerasa y de niveles de c-Myc, permitiendo su escape de la senescencia (76). Finalmente, BARF-1 tiene funciones inmunomoduladoras al inhibir hCSF (77). En efecto, BARF-1 exhibe homología con el dominio extracelular del receptor de hCSF (hCSFR) permitiendo la unión de hCSF e inhibiendo su actividad, lo cual se relaciona con la regulación de la viabilidad, proliferación y diferenciación de monocitos y macrófagos (77). Sin embargo, no se conocen los factores que condicionan el establecimiento de la latencia de VEB o el ciclo lítico abortivo con expresión de BARF-1 en células epiteliales orales. Esto permite predecir que **factores adicionales que afectan a la cavidad oral podrían favorecer el desarrollo de cánceres asociados a la infección por VEB.**

4. Microbiota oral

La cavidad oral es uno de los sitios anatómicos que contiene la microbiota más diversa, albergando al menos 687 especies (78). Tanto las bacterias patógenas como las mutualistas coevolucionan juntas para mantener la homeostasis oral (79). Sin embargo, en determinadas condiciones, como el tabaquismo, la obesidad, el estrés, la diabetes, se altera el equilibrio del ecosistema, lo que permite un aumento del número de bacterias patobiontes que producen daño en el tejido debido a la expresión de sus factores de virulencia y la consecuente respuesta inmune del hospedero (80). Esto se denomina “teoría de la sinergia polimicrobiana y disbiosis” (PDS), que propone que la pérdida de la homeostasis es causada por patógenos claves (principalmente bacterias patobiontes) que se comunican con microorganismos “accesorios”, que actúan de forma sinérgica para apoyar la virulencia del organismo asociado a la enfermedad y facilitar la progresión hacia la patogenia (81). En este contexto, la periodontitis se ajusta al concepto de PDS.

4.1. Periodontitis

La periodontitis es una enfermedad disbiótica caracterizada por una inflamación crónica, con una prevalencia del 30% siendo más frecuente en el grupo etario de 65 a 74 años (82). Es causada por un desequilibrio entre la microbiota subgingival, y la respuesta inmune del hospedero. El aumento en la abundancia de los microorganismos como *P. gingivalis*, propuesto como actor clave entre las bacterias asociadas a la periodontitis, promueve la liberación de compuestos que producen inflamación en el tejido gingival (83). Sin embargo, existe evidencia que sugiere que el aumento de una bacteria no determina todo el proceso inflamatorio, sino la interacción entre toda la comunidad disbiótica (84).

Durante la inflamación se producen citoquinas y mediadores (TNF, IL1, IL4, IL10, INF- γ), con

reclutamiento de células inmunes (CD4+, CD8+.linfocitos Th. Th1, Th2, Th17). El linfocito CD4+ produce RANK-L, una citoquina asociada a la reabsorción alveolar porque induce la diferenciación de osteoclastos (85).

Por otra parte, se ha visto que *P. gingivalis* es capaz de contribuir directamente a la inflamación porque tiene la capacidad de activar vías intracelulares específicas. Así se ha descrito que células gingivales epiteliales (GECs) infectadas activan vías anti apoptóticas, como la JAK/STAT y (PI3K) /Akt, que inhiben la vía intrínseca de la apoptosis probablemente para persistir por períodos más largos. Estas vías están relacionadas con inflamación y producción de mediadores inflamatorios como factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (86,87). El daño del tejido ocurre tanto por la desregulación en la respuesta inmune como por el efecto de los factores de virulencia de *P. gingivalis*. En este contexto se describen las gingipaínas que son proteasas capaces de degradar moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1) en las GECs, interrumpiendo la interacción entre neutrófilos y células epiteliales orales (88). Por otro lado, recientemente se describe que el ácido butírico, producido como un metabolito de desecho de *P. gingivalis*, contribuye al progreso de la inflamación. Se reporta que a altas concentraciones de ácido butírico se induce apoptosis de fibroblastos gingivales y de células T (89,90).

La inflamación crónica producida afecta los tejidos de soporte de los dientes, incluido el tejido gingival, el ligamento periodontal y el hueso alveolar (**Figura 4**).

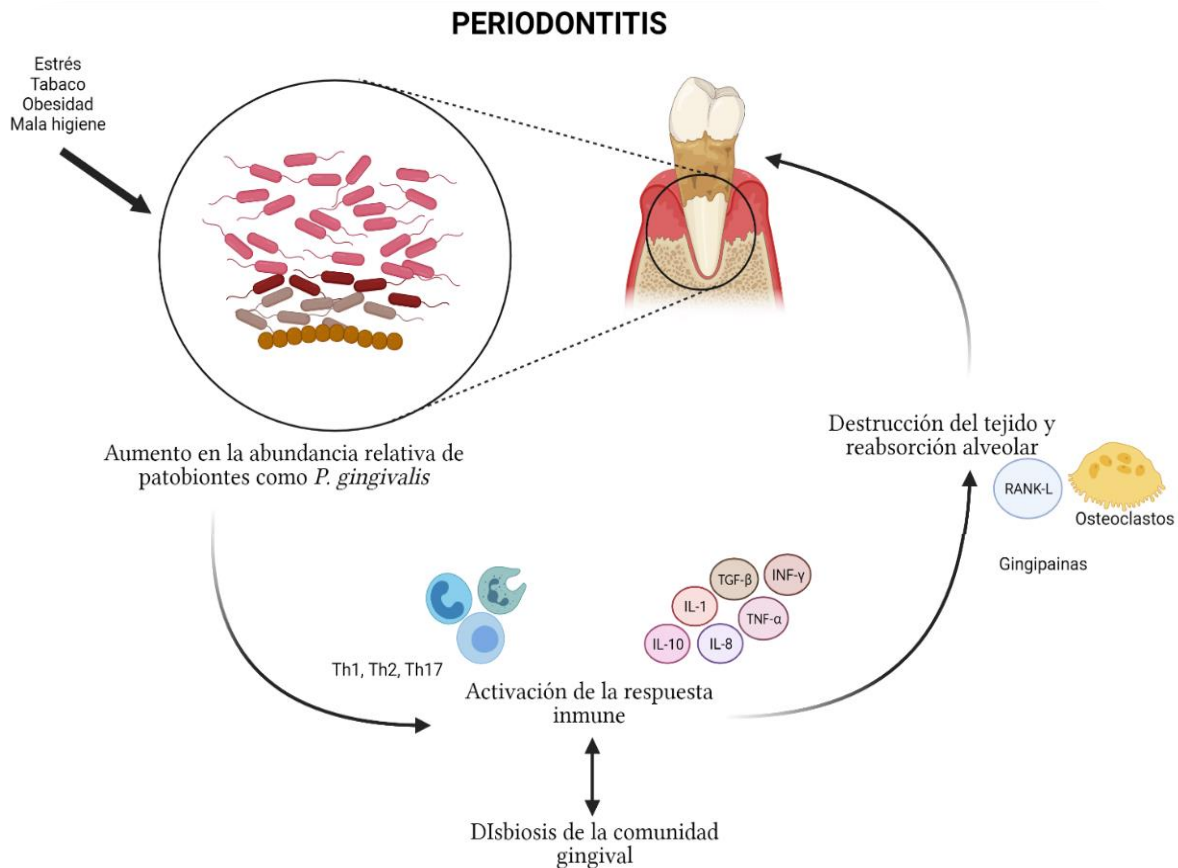


Figura 4. Etiología de la periodontitis *P. gingivalis* es considerada una piedra angular en el desarrollo de periodontitis debido a la disbiosis que genera en el saco gingival cuando ocurre un cambio en su abundancia relativa debido a diversos factores externos. La respuesta inflamatoria que se activa en respuesta a *P. gingivalis*, ocasiona una disbiosis en la microbiota gingival que contribuye nuevamente a un aumento en la inflamación. La inflamación perpetuada conlleva a una destrucción del tejido. El daño en el tejido que se produce es debido a la desregulación en la respuesta inmune y también por factores de virulencia de *P. gingivalis* como las gingipainas, lo que finalmente resulta en una reabsorción alveolar y pérdida del diente. (Imagen creada por: Daniela Nuñez)

4.2. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)

P. gingivalis es una bacteria Gram negativo anaerobia estricta asociada con el establecimiento y progresión de la periodontitis.

El hábitat principal de *P. gingivalis* es el surco subgingival de la cavidad oral, donde se establece como colonizador tardío y donde interacciona física y metabólicamente con otros miembros de la biopelícula subgingival, como *Streptococcus gordonii* y *Prevotella intermedia*, que se establecen como colonizadores primarios. Además, otros microorganismos con los que se ha

descrito una interacción con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* el cual protege a *P. gingivalis* del H₂O₂ producido por *Streptococcus sanguinis*, favoreciendo su supervivencia y crecimiento (91).

Como parte de sus estrategias de supervivencia en el hospedador, *P. gingivalis* puede invadir células y tejidos evitando así la vigilancia inmunológica. *P. gingivalis* puede internalizarse en células epiteliales gingivales, donde puede mantener la viabilidad y replicar (92). Existe evidencia de que *Fusobacterium nucleatum* provoca un aumento en la capacidad de internalización de *P. gingivalis* en las células epiteliales (93). Otro mecanismo que favorece su supervivencia es la desregulación de la inmunidad innata y subversión de la respuesta inmune induciendo altos niveles de citocinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-8 IL-6 por células T CD4+ periféricas. También existe una relación entre *P. gingivalis* y el sistema del complemento, ya que puede suprimir su activación, por degradación de C3, captura de proteína C4b, y mediante sinergia con C5a a través de la señalización del TLR-2 (94). Dados estos mecanismos se establece su relación con la progresión de la inflamación. La asociación de *P. gingivalis* con el desarrollo de periodontitis se ha propuesto que se debe al cambio de abundancia relativa dentro de la comunidad subgingival, debido a que *P. gingivalis* está presente en pacientes sanos; sin embargo, su abundancia relativa es mayor en pacientes con periodontitis (90,91).

4.3. *Porphyromonas gingivalis* y su asociación con el desarrollo de cáncer oral

La exposición persistente a *P. gingivalis* de las células epiteliales orales, promueve cambios asociados con carcinogénesis. Existe evidencia de que la infección por *P. gingivalis* incrementa el riesgo de cáncer y enfermedades periodontales hasta en 1,36 (OR:1:36; 95% CI, 0-47-3,97) (97). Además, se ha reportado que la tasa de positividad de *P. gingivalis* en COCE es del 60,7% mientras que en tejido no tumoral adyacente y tejidos normales son del 32,8% y 13,3%,

respectivamente (98). Se demostró que *P. gingivalis* provoca cambios en la morfología celular, aumenta la proliferación de células y aumenta sus propiedades migratorias e invasivas (99). *P. gingivalis* estimula el crecimiento de GECs, que bajo estimulación de ATP extracelular y mediado por el receptor P2X₇ **regulan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)** (100). ROS median la activación de vías de señalización prooncogénicas que posteriormente facilitan la progresión del cáncer, la angiogénesis y la supervivencia (101). Además, ROS puede generar modificaciones en las bases nitrogenadas del ADN, induciendo inestabilidad del genoma y mutaciones (102). Asimismo, *P. gingivalis* aumenta la proliferación de fibroblastos primarios del ligamento periodontal y promueve la proliferación de células gingivales inmortalizadas (103). Por último, *P. gingivalis* induce la migración de GEC de forma dependiente de Zeb1, un activador de la transición epitelial-mesenquimal (TEM) (104).

5. VEB y *P. gingivalis* en la cavidad oral

Recientemente, se ha reportado una asociación positiva entre periodontitis e infección por VEB. Niveles más altos de ADN de VEB se ha detectado en la saliva de pacientes con enfermedades crónicas como periodontitis o periodontitis agresiva (105,106). Por ello, se ha estudiado la relación entre VEB y *P. gingivalis*, al considerarse patobionte clave en el desarrollo de la periodontitis. Ayako et al, mostró la coexistencia de material genético de VEB y de *P. gingivalis* en el 68% de pacientes con sitios profundos (sacos periodontales >5mm) diagnosticados con periodontitis grave (106). Además, se observó mayor cantidad de material genético del virus y de la bacteria en estos pacientes, en comparación a pacientes con sondaje periodontal < 5mm o pacientes sanos (105), lo que sugiere que su coexistencia puede determinar la gravedad de la enfermedad.

En el contexto de cáncer oral, existe evidencia que sugiere la participación de VEB y *P. gingivalis* debido a sus capacidades de activar vías de señalización asociadas a tumorigénesis de manera independiente. La activación de la vía EGFR / PI3K / Akt se ha visto alterada en los tumores VEB positivos y también en infección por *P. gingivalis* (107). A pesar que no se ha determinado un mecanismo de interacción directa entre ellos, se ha visto que luego de la estimulación de la línea celular linfoide Raji con un sobrenadante de cultivo de *P. gingivalis*, ocurre reactivación de VEB (108). **Por tanto, es plausible la noción que dicha reactivación también podría ocurrir en células epiteliales en presencia de *P. gingivalis*, lo cual podría favorecer la expresión de oncogenes virales tempranos como BARF-1.**

2. HIPÓTESIS

Estableciendo que 1) BARF-1 es una proteína de VEB expresada en la mayoría de los tumores epiteliales asociados a la infección por este virus; 2) La infección por VEB y expresión de BARF-1 no es condición suficiente para el desarrollo de cáncer; 3) *P. gingivalis* promueve transformación celular participando en la iniciación y promoción del cáncer; 4) En enfermedad periodontal y lesiones inflamatorias de la cavidad oral se ha detectado presencia de VEB y *P. gingivalis*.

Se plantea la hipótesis: “La proteína BARF-1 de VEB es altamente conservada y mediante sus interacciones celulares, en un ambiente inflamatorio promovido por *P. gingivalis* está involucrada en el desarrollo de cáncer oral”.

3. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar *in-silico* la diversidad a nivel génico y aminoacídico de la proteína BARF-1 y sus interacciones con proteínas celulares asociadas a la tumorigénesis, para el establecimiento de un modelo de cooperación con *P. gingivalis* en el desarrollo de cáncer oral.

4. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Analizar filogenéticamente la variabilidad nucleotídica y aminoacídica de BARF-1
2. Estudiar la interacción *in-silico* entre BARF-1 y proteínas celulares relacionadas con carcinogénesis.
3. Proponer un modelo teórico de interacción entre BARF-1 de VEB y *P. gingivalis*, mediado por la activación de vías intracelulares asociadas a inflamación, para su participación en el desarrollo de cáncer oral.

5. MATERIALES Y METODOS

1. Análisis filogenético

El análisis de la variabilidad de la secuencia aminoacídica y nucleotídica de la proteína BARF-1 se realizó utilizando secuencias depositadas en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Fueron seleccionadas todas las secuencias que estuvieran identificadas como BARF-1 human gammaherpesvirus 4 y presentaran 221 aminoácidos, correspondiente al tamaño de la proteína. Se realizó el alineamiento de todas las secuencias que presentaran el criterio anterior utilizando el programa bioinformático Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/>). El análisis filogenético de todas las secuencias se realizó utilizando los programas MEGA versión 7 y NGPhylogeny (<https://ngphylogeny.fr/>) usando el método estadístico de Neighbor-joining, considerando 50 repeticiones *bootstraps*. El árbol filogenético se ilustró con la ayuda del programa iTol (Interactive Tree of Life) (<https://itol.embl.de/>). Posteriormente, para una mejor visualización, se seleccionaron aleatoriamente 50 secuencias con base a la información derivada en el alineamiento (mutaciones observadas), y la información de la cepa del tipo de patología de la que fue obtenida (carcinoma gástrico, carcinoma nasofaríngeo, linfoma, etc). Con los 50 genomas seleccionados se realizó el análisis de las secuencias nucleotídicas (666bp) correspondiente a BARF-1.

La representación de los residuos en la estructura 3D de la proteína BARF-1 se realizó utilizando la estructura cristalográfica obtenida por difracción de rayos X, depositada en Protein Data Bank (RCSB PDB), con el código 2CH8 (DOI: 10.2210/pdb2CH8/pdb). La visualización de los aminoácidos cercanos se obtuvo mediante el programa Visual Molecular Dynamics (VMD).

2. Ensayo *in-silico* de interacción entre la proteína BАРF-1 y proteínas celulares

El análisis bioinformático de las interacciones proteína-proteína (IPP) conocidas entre VEB y el hospedero se obtuvieron utilizando el servicio web PSICQUIC del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI)

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/webservices/psicquic/view/main.xhtml>). Se realizó la búsqueda de interacción VEB-hospedero en las bases de datos activas presentes en este servidor mediante la palabra clave EBV, Epstein-Barr o Gammaherpesvirus. Virus-Host Network (VirHostNet 2.0) (<http://virhostnet.prabi.fr/>) es uno de los principales recursos de interacción patógeno-hospedero especializado en la gestión y análisis de interacción proteica de virus-virus, virus-hospedero y hospedero-hospedero acopladas a sus anotaciones funcionales (109). También se utilizó MorCVD (<http://morcvd.sblab-nsit.net/>), la cual es una base de datos que contiene información de interacciones proteína-proteína hospedero-patógeno implicadas en enfermedades cardiovasculares (ECV) (110). IntAct Molecular Interaction Database, es una herramienta de análisis para datos de interacción molecular, donde muestra el método por el cual se ha evidenciado la interacción derivada de la literatura (111). Además, se obtuvo información de las proteínas con las cuales se mostró una interacción en la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

3. Planteamiento de modelo teórico de interacción entre VEB y *P. gingivalis*

Se realizó una revisión bibliográfica en *National Library of Medicine* (NIH) PubMed® sobre cáncer oral y las vías de señalización molecular relacionadas con la carcinogénesis con las palabras claves “EBV, oral cancer”, “*P. gingivalis*, oral cancer”, “*P. gingivalis*, inflammation” y “periodontitis, EBV, *P. gingivalis*”. Además, se ha revisado el estado del

arte en cuanto a la participación de VEB y *P. gingivalis* en carcinogénesis oral. Considerando los datos obtenidos *in-silico* y de la información bibliográfica obtenida, se ha propuesto un modelo teórico de cooperación entre ambos microorganismos para promover el desarrollo de cáncer oral. El modelo se ha ilustrado utilizando BioRender (<https://biorender.com/>).

4. RESULTADOS

1. Variabilidad génica de BARF-1

Se obtuvo 856 secuencias aminoacídicas de la proteína BARF-1 del GenBank. Todas las secuencias incluidas estaban identificadas como BARF-1 human gammaherpesvirus 4 y presentaron 221 aminoácidos (tamaño completo de BARF-1). Además, se incluyó dos secuencias de referencia B95-8 y AG876. En la **Tabla 1**, se describe la información obtenida de las secuencias con respecto al sitio geográfico y la patología asociada. El 71,5% de las secuencias provienen de Asia y el 49,5% son de carcinoma nasofaríngeo.

Origen Geográfico		
Continente	País	Nº de secuencias
ASIA (71,5%)	China	581
	Singapore	12
	Korea del sur	9
	Japon	9
	Vietnam	1
	Total	612
AFRICA (4,1)	Kenya	27
	Ghana	6
	Nigeria	2
	Total	35
EUROPA (15,3%)	Inglaterra	109
	Francia	15
	Alemania	3
	Polonia	3
	Ucrania	1
	Total	131
AMERICA (2%)	Estados unidos	8
	Brasil	6
	Argentina	3
	Total	17
OCEANIA 2,6%)	Australia	21
	Papua Nueva Guinea	1
	Total	22
Sin información (4,6%)		39
	TOTAL	856

Patología asociada	
Enfermedad	Nº de secuencias
Carcinoma nasofaríngeo (49,5%)	424
Cáncer gástrico (9,5%)	81
Linfoma Burkitt	29
Mononucleosis Infecciosa	28
NK/T Linfoma	21
Linfoma Hodking	14
Cáncer de pulmón	4
Otros linfomas	135
No información	84
Sanos	36
TOTAL	856

Tabla 1. Descripción del origen geográfico y la patología asociada de las 856 secuencias de BARF-1. Se reporta el número de secuencias de la proteína BARF-1 provenientes de los diferentes países, y la patología asociada a las secuencias.

1.1. Variabilidad a nivel de ADN

En el alineamiento de las secuencias se observó una alta similitud, mostrando un 97-100% de identidad entre todas las secuencias. Se seleccionaron 50 aislados aleatoriamente y se realizó el análisis de mutaciones en la secuencia nucleotídica. BARF-1 se encuentra en la posición 165504 a 166169 nt del genoma de VEB B95-8 (GeneBank Acc. No. V01555). En la **Tabla 2** se resume las mutaciones encontradas. En la posición 165589 ocurre un cambio de timina por citosina (T165589C) que da lugar al cambio aminoacídico de valina por alanina en el codón 29 (V29A). Esta mutación se presenta en 16/50 secuencias. De igual manera en la posición 165892 ocurre un cambio de adenina por guanina (A165892G) en 8/50 secuencias, generando un cambio de aminoácido de histidina por arginina en el codón 130 (H130R). Por otro lado, se describen mutaciones silentes T165545C en 14/50, T165768C en 12/50, C165779T en 5/50, T165797C en 10/50, C165944T en 15/50. La mayoría de estas secuencias están asociadas a carcinoma nasofaríngeo.

Cambio nucleotídico	codón	Cambio aa	NPC	GC	Linfomas	MI	Sanos	SI	Total
C165515G	4	F → L						1	1
A165516G	5	I → V	1						1
T165545C	14	C	14					1	15
C165553G	17	A → G						1	1
C165554A	17	A						1	1
G165561A	20	A → T	1						1
A165567G	22	T → A						1	1
T165573C	24	F → L			1				1
C165575T	24	F	1		1			1	3
T165589C	29	V → A	8		3	1		4	16
A165591G	30	T → A					1		1
C165599G	32	T						1	1
T165640C	46	V → A		2					2
C165661G	53	P → R		1					1
G165664A	54	G → E						1	1
G165666A	55	E → K						1	1
A165667C	55	E → A					1		1
G165677A	58	V						3	3
C165678G	59	L → V						1	1
T165680C	59	L	1						1
G165699A	66	D → N	1						1
T165706C	68	I → T	2						2
T165717G	72	W → G	2						3
A165739G	79	D → G					1		1
T165767C	88	F		1					1
T165768C	89	L	7		3	1		1	12
C165779T	92	T	4		1				5
T165797C	98	H	7		2	1			10
G165801A	100	G → S	1						1
A165822G	107	K → E	1						1
G165840A	113	V → I		2					2
A165892G	130	H → R	6		2				8
G165915T	138	D → Y					2		2
G165924C	141	V → L						1	1
C165944T	147	T	7		3	1		4	15
A166038G	179	K → E	1						1
G166040T	179	K → N				3			3
T166058C	185	V	1						1
G166059T	186	A → S	1						1
C166072T	190	S → L	1						1
C166136T	211	H						1	1
G166153T	217	G → V	1						1
T166158G	219	L → V			1				1
G166163A	220	S					2		2

Tabla 2. Mutaciones en 50 secuencias nucleotídicas de BARF-1. Se muestra las 44 mutaciones observadas en la secuencia de nucleótidos y la patología asociada. Se encontraron 14 mutaciones silentes, y 30 produjeron un cambio de aminoácido. En rojo se muestran las más prevalentes. NPC (Carcinoma nasofaríngeo), GC (Cáncer gástrico), MI (Mononucleosis infecciosa), SI (Sin información), aa (aminoácido).

1.2. Variabilidad aminoacídica

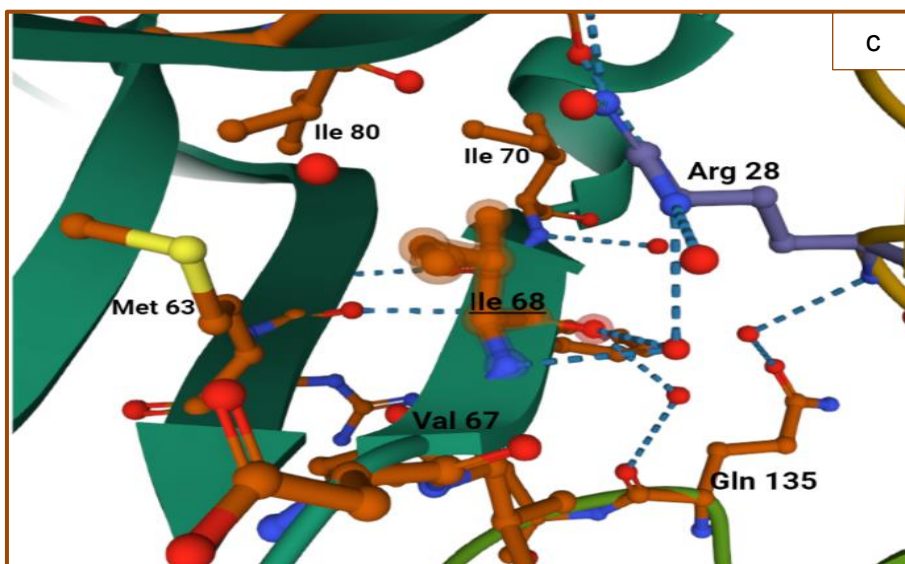
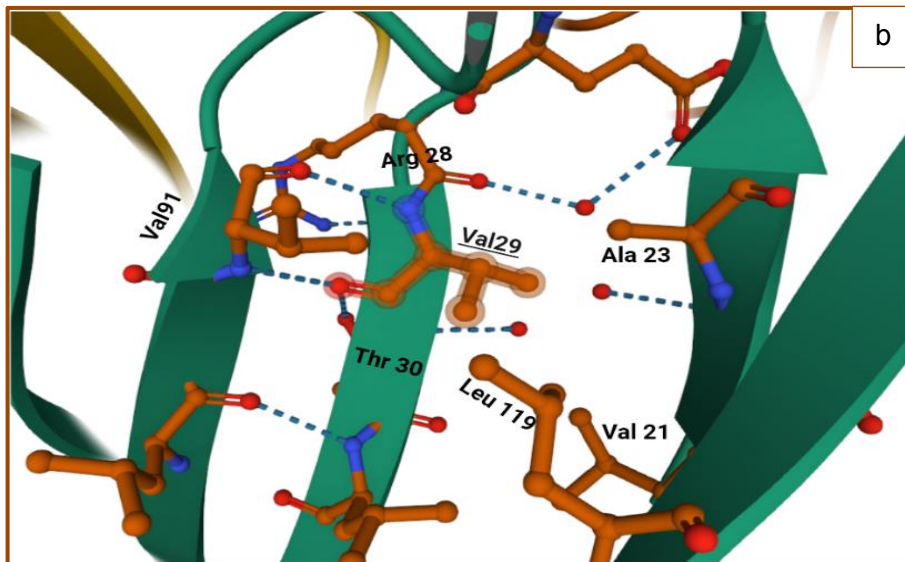
En relación a las mutaciones que generan un cambio de aminoácido se observaron mutaciones descritas en la Tabla 3, entre ellas V29A (173/856), H130R, (30/856), W72G (9/856), y A20T (9/856). En la **Figura 5** se muestra el sitio donde se producen estas mutaciones en la secuencia aminoacídica, con respecto a las secuencias de referencias (B95-8, AG876) y secuencia del vector MSCV-N-BARF-1, las cuales no presentan ninguna mutación.

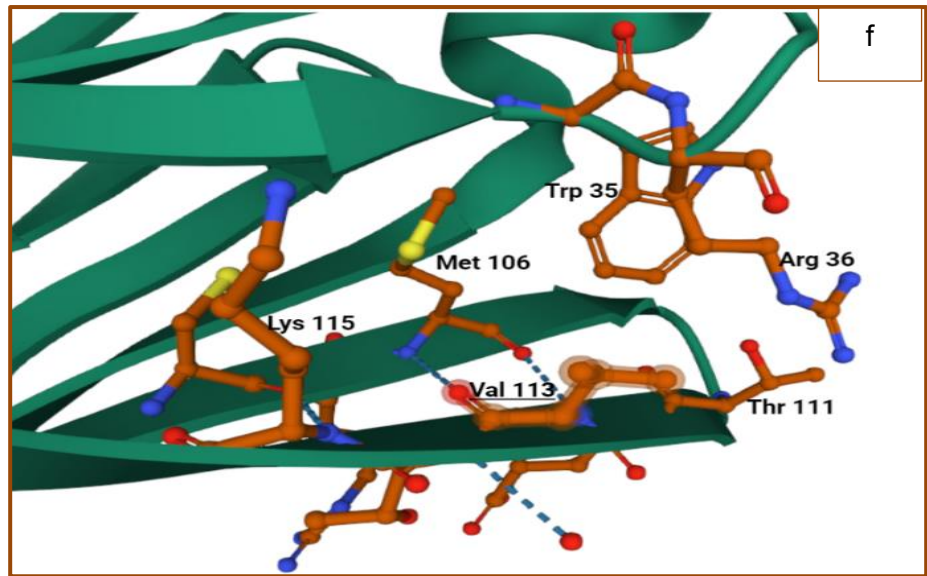
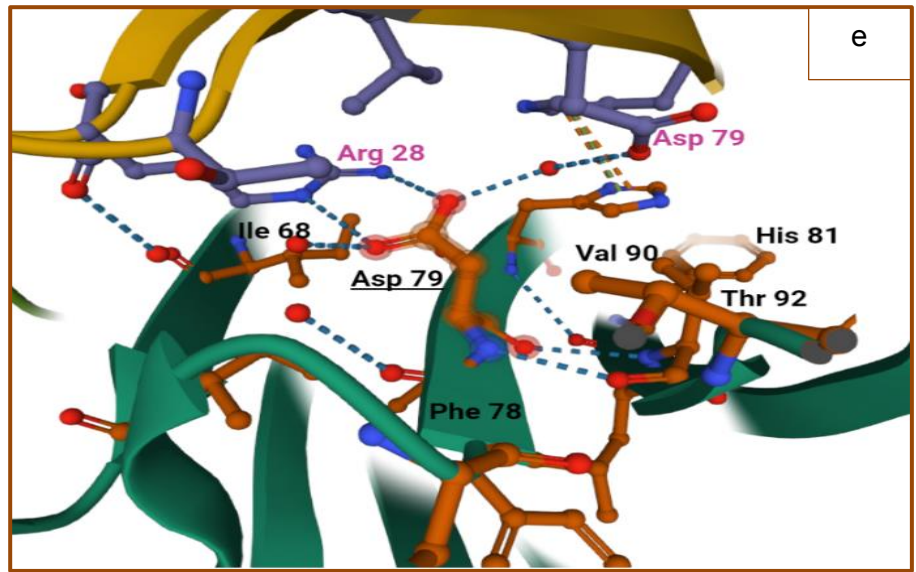
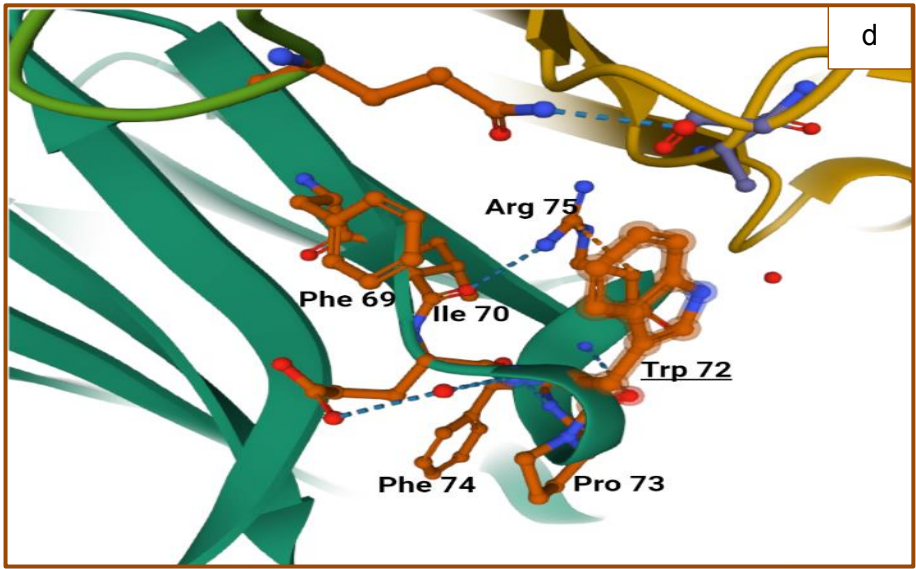
Mutación	Nº de secuencias	Mutación	Nº de secuencias
A2T	1	D79G	2
F4L	2	F87L	1
I5V	2	G100D	1
L9F	1	G100S	2
A17G	1	K107E	1
A20T	9	V113I	2
T22A	1	H130R	30
F24L	1	D138Y	2
V29A	173	V141L	2
T30A	1	L159I	1
V46A	3	G174D	1
P53R	1	G174S	1
G54E	1	K179N	4
E55A	1	K179E	1
E55K	1	A186S	2
Q57R	1	S190L	1
L59V	1	W195L	1
R62H	1	V213I	1
D66N	1	G217V	1
I68T	3	L219V	2
W72G	9		

Tabla 3. Mutaciones observadas en las 856 secuencias aminoacídicas de la proteína BARF-1 de VEB. Se describen las 41 mutaciones que generan un cambio de aminoácido, y el número de secuencias en las que se presentó. En rojo se indican las mutaciones que se presentaron en más de una secuencia.

1.3. Mutaciones en la estructura secundaria de BARF-1

Los residuos donde ocurren cambios por mutaciones en el ADN viral se ubicaron en la estructura 3D de la proteína obtenida del Protein Data Bank (RCSB PDB). En la **figura 6a**, se muestra el monómero de BARF-1 con los residuos donde ocurren las mutaciones más prevalentes y previamente descritas en la literatura. Los residuos se muestran con los aminoácidos que se encuentran a 5 Å. En **6b**, se observa el residuo 29 correspondiente a valina. V29 forma puentes de hidrógeno con el residuo valina 91. La mutación que se observó en este residuo fue un cambio por alanina (V29A). En **6c**, se muestra el residuo isoleucina 68 que tiene interacción con glutamina 135. La mutación que se observó en este residuo fue por treonina (I68T). El residuo 72 correspondiente a triptófano que se observa en **6d**, forma puente de hidrogeno con arginina 75. El cambio en este residuo fue por glicina (W72G). En **6e**, el residuo ácido aspártico 79 interactúa con arginina 28 y ácido aspártico 79 de otro monómero de BARF-1. La mutación asociada a este residuo fue cambio por glicina (D79G). El aminoácido valina 113 forma puentes de hidrogeno con metionina 106 como se muestra en **6f**. El cambio asociado a este residuo fue por isoleucina (V113I). En **6g**, se observa el residuo histidina 130, que forma enlace con treonina 145. La mutación asociada fue un cambio por arginina (H130R). El residuo 138 correspondiente a ácido aspártico de muestra en **6h**, y muestra interacción con serina 140, y serina 134. La mutación asociada fue un cambio por tirosina (D138Y).





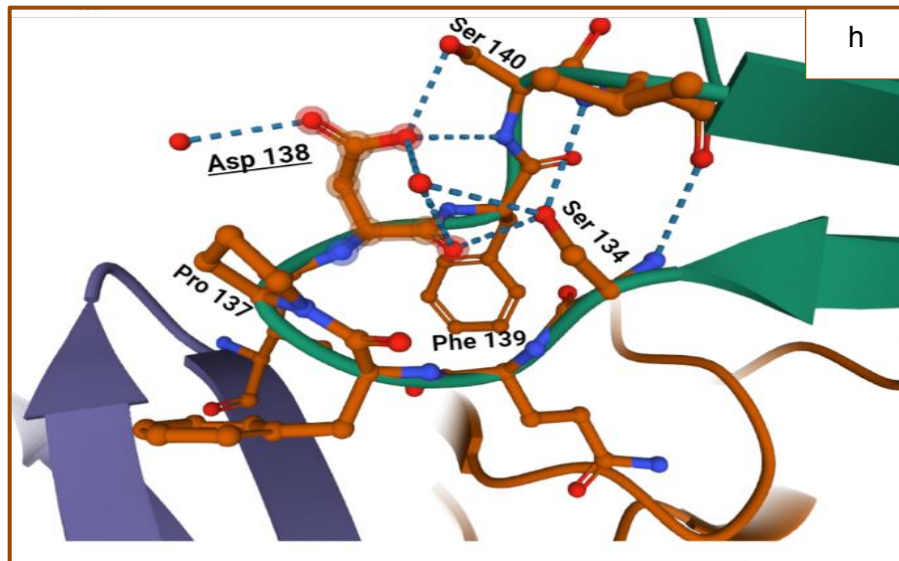
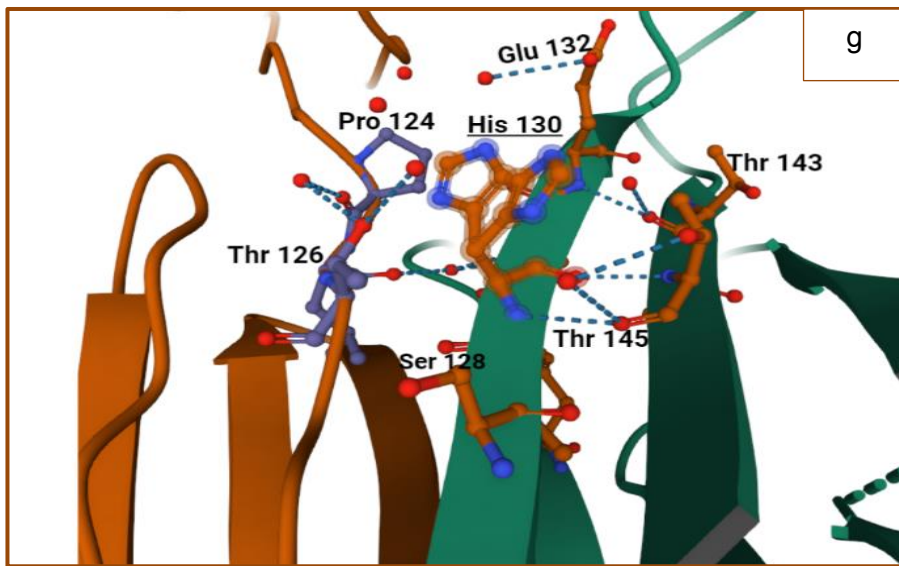
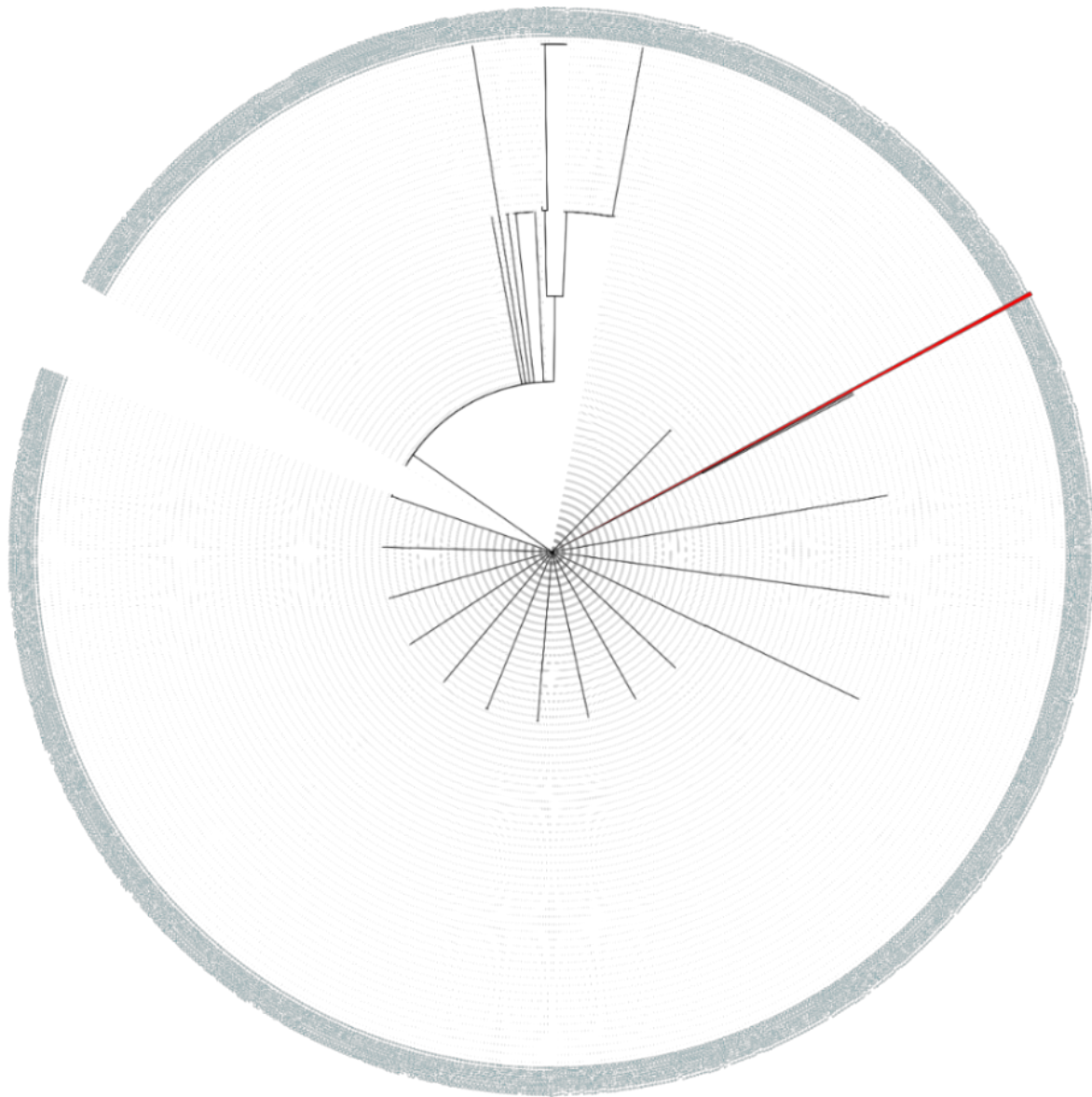


Figura 6. Localización de aminoácidos en la estructura secundaria de BARF-1, donde ocurre mutación y aminoácidos que están a 5 Å. a) Monómero de BARF-1 con los aminoácidos donde ocurren las mutaciones encontradas. b) Valina 29, c) isoleucina 68, d) triptófano 72, e) ácido aspártico 79, f) valina 113, g) histidina 130, h) ácido aspártico 138.

1.4. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de BARF-1

El análisis filogenético de la proteína BARF-1 mostró la presencia de dos nodos, el primero involucra la mayoría de las secuencias, mientras que el otro grupo presenta subnodos, dentro de los cuales se encuentran la mayoría de las secuencias que presentan mutaciones puntuales. En la **Figura 7** se observa el árbol filogenético de las 859 secuencias, incluyendo la secuencia del vector MSCV-N-BARF-1 y las secuencias de referencia (B95-8 y AG876). En la **Figura 8** se presenta el árbol filogenético de las 50 secuencias nucleotídicas seleccionadas anteriormente. En la **Figura 9**, se muestra el árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas de los mismos aislados. De las 50 secuencias seleccionadas, 30 provienen de carcinomas epiteliales (carcinoma gástrico y carcinoma nasofaríngeo); sin embargo, ninguna proviene de carcinoma oral. En las secuencias nucleotídicas se pudo observar la agrupación en nodos. El grupo 1 y grupo 3 correspondiente a secuencias de carcinoma nasofaríngeo, y el grupo 2 de carcinoma gástrico. Existe una asociación entre el grupo 3 de NPC y la presencia de la mutación V29A. De igual manera, esta asociación es evidente en la secuencia aminoacídica.



Tree scale: 0.01 |—————|

Figura 7. Árbol filogenético circular de la proteína BARSF-1. Se muestra el análisis filogenético realizado por el método de Neighbor-joining (500boostraps) de 859 secuencias aminoacídicas de la proteína BARSF-1 de VEB. En rojo se observa la ubicación de la secuencia del vector MSCV-N-BARSF-1

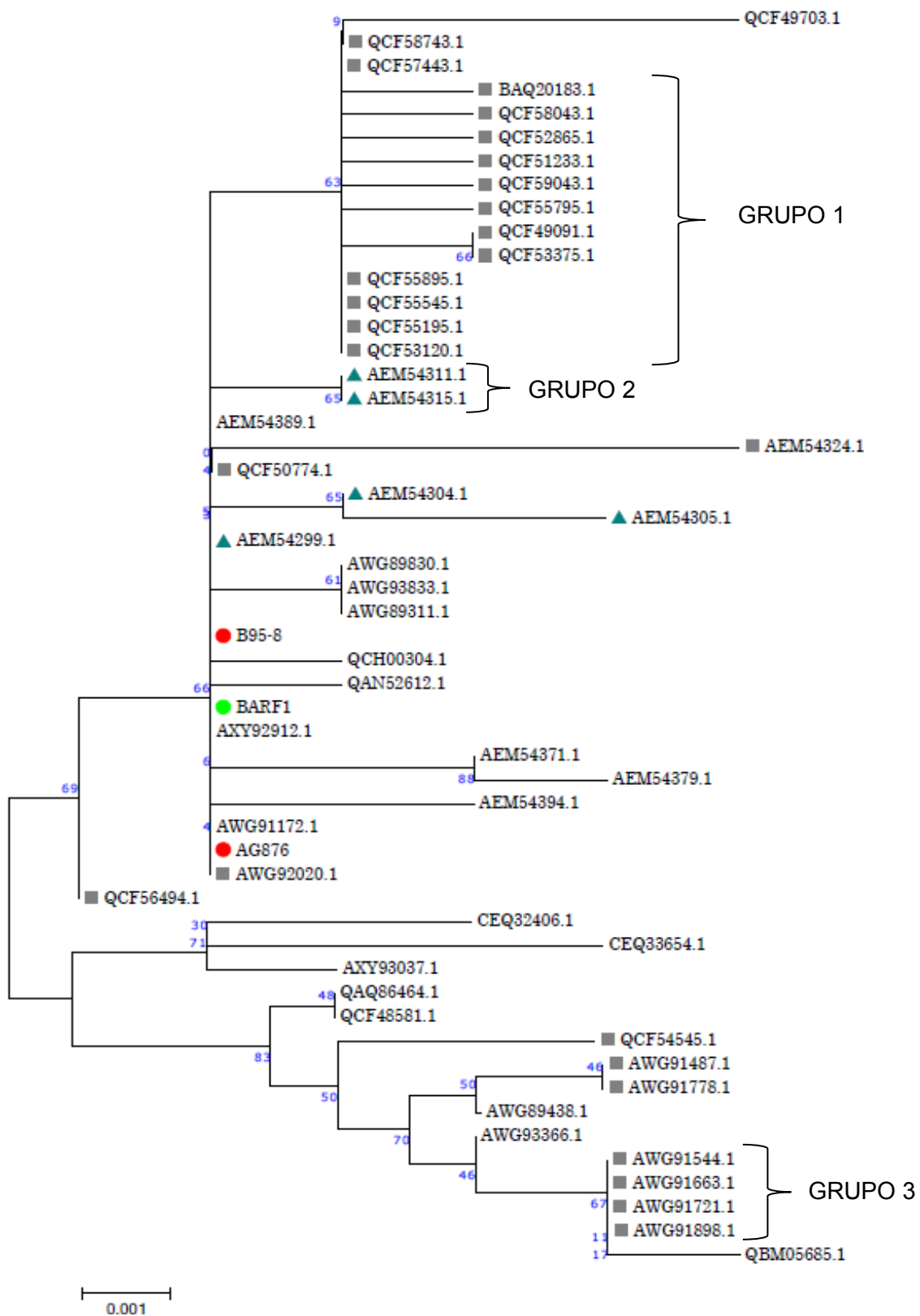


Figura 8. Árbol filogenético rectangular de la secuencia nucleotídica de BARF-1. Se muestra el análisis filogenético de 53 secuencias nucleotídicas de BARF-1. Con círculo verde se muestra la ubicación de la secuencia del vector MSCV-N-BARF-1. En rojo se muestran las secuencias de referencia (B95-8, AG876). Los triángulos verdes son secuencias correspondientes a carcinoma gástrico, y el cuadrado gris secuencias de carcinoma nasofaríngeo.

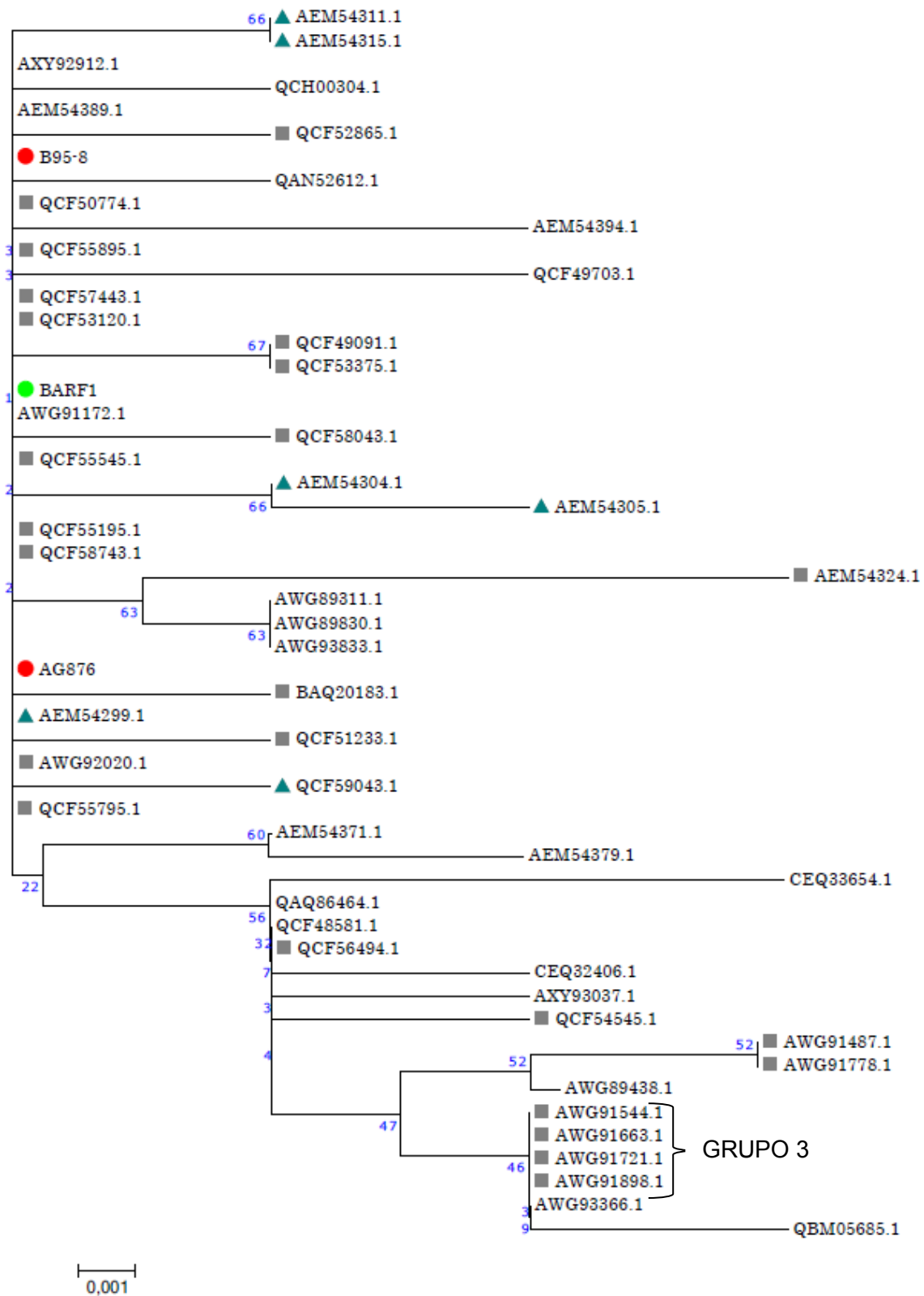


Figura 9. Árbol filogenético rectangular de la proteína BARSF-1. Se muestra el análisis filogenético de 53 secuencias aminoacídicas de la proteína BARSF-1. Con círculo verde se muestra la ubicación de la secuencia del vector MSCV-N-BARSF-1, en rojo las secuencias de referencia (B95-8 y AG876). Los triángulos verdes son secuencias correspondientes a carcinoma gástrico, y el cuadrado gris secuencias de carcinoma nasofaríngeo.

2. Ensayo *in-silico* de interacción proteína BARS-1 y proteínas celulares

En bases de datos de interacción proteína- proteína se evidenció la interacción entre BARS-1 y proteínas celulares asociadas a tumorigénesis. La base de datos MorCVD, mostró que la cepa AG876 de VEB (Uniprot P0C6N0), presenta interacción física comprobada por ensayos de doble híbrido con la proteína Piruvato quinasa (PKM) (Uniprot P14618). También mostró interacción con *DnaJ homolog subfamily A member 3* (DNAJA3) (Uniprot Q96EY1), y con Alfa-actinina-1 (Uniprot P12814). De igual manera, en la base de datos VirusHostNet se observó que la cepa BARS1_EBVA8 presentan interacción con las mismas proteínas antes mencionadas y, además, con la Proteína 1 que contiene el dominio SERTA (SRTD1) (Uniprot Q9UHV2). Estas interacciones se visualizan en la **Figura 10a**. Como ya ha sido ampliamente descrito, en las bases de Uniprot e IntACT se evidencia la interacción entre BARS1_EBV9 con hCSF-1 humano y de ratón (**Figura 10b y c**).

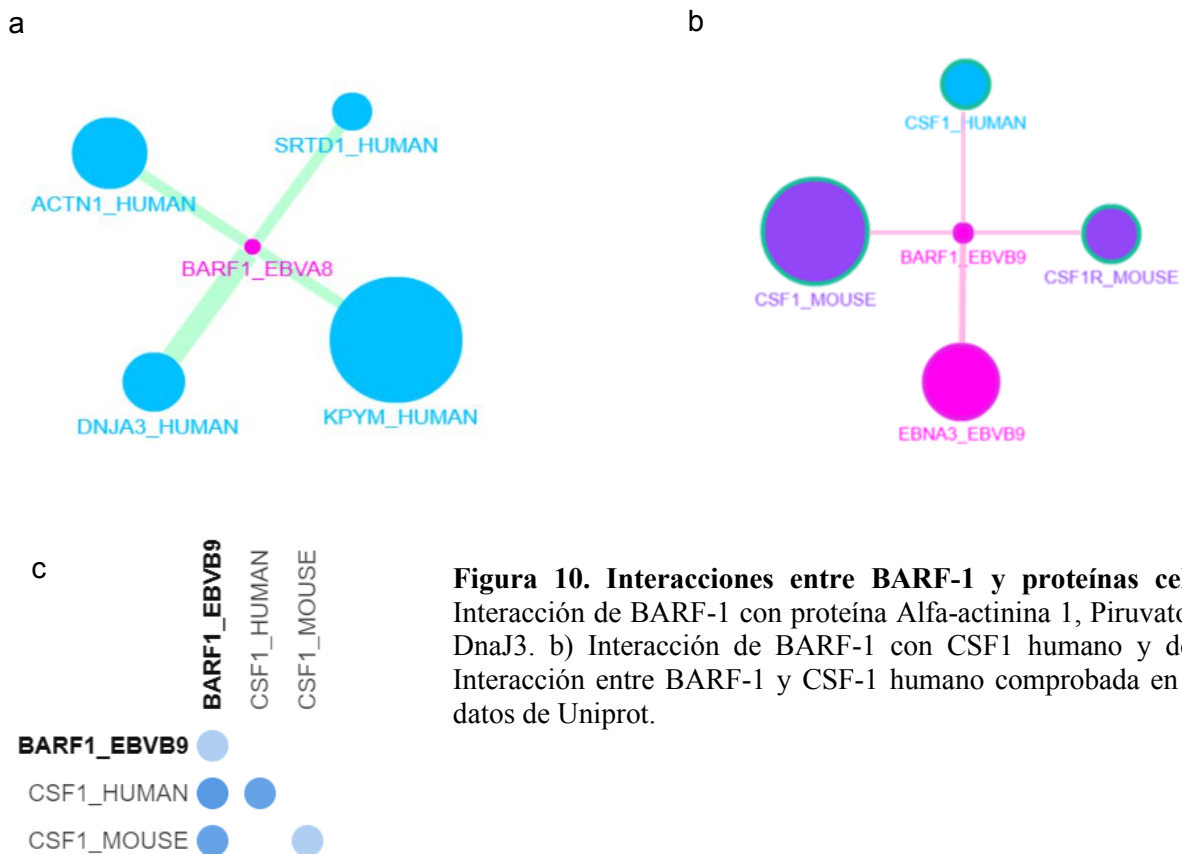


Figura 10. Interacciones entre BARS-1 y proteínas celulares. a) Interacción de BARS-1 con proteína Alfa-actinina 1, Piruvato quinasa y DnaJ3. b) Interacción de BARS-1 con CSF1 humano y de ratón. c) Interacción entre BARS-1 y CSF-1 humano comprobada en la base de datos de Uniprot.

3. Modelo teórico de interacción entre VEB y *P. gingivalis*

La búsqueda bibliográfica con respecto a VEB y *P. gingivalis* arrojó los siguientes resultados, los cuales permitieron el planteamiento de un modelo, publicado en un artículo y representado en la **Figura 11** (67).

Las comunidades microbianas de la cavidad oral ejercen interacciones complejas que modifican el comportamiento del microbioma y las respuestas de la célula hospedera, como ocurre en la periodontitis. En esta enfermedad, la disbiosis causada por el aumento de patobiontes, como *P. gingivalis*, promueve un proceso exacerbado de inflamación. La inflamación crónica conlleva la producción de factores mediadores que en su suma resultan en la destrucción del tejido gingival. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son moléculas de señalización clave que juegan un papel importante en la progresión de los trastornos inflamatorios. En niveles altos, ROS puede conducir a una función fisiológica deteriorada a través del daño celular del ADN, proteínas, lípidos y otras macromoléculas.

Por otro lado, el VEB y *P. gingivalis* muestran mayor presencia en pacientes con periodontitis crónica, en comparación con pacientes sanos (112–114). De igual manera se ha visto una mayor proporción de *P. gingivalis* detectada en sujetos VEB-positivos y se ha demostrado que la estimulación con el sobrenadante de *P. gingivalis* da como resultado la reactivación del VEB en la línea celular linfocito B VEB-positiva (Raji; Colección Japonesa de Biorecursos de Investigación) (108). Hasta el momento, no se dispone de información que describa una interacción directa entre el VEB y *P. gingivalis*, sin embargo, existe una evidencia creciente que muestra que ambos microorganismos tienen un papel en la carcinogénesis oral, activando vías de señalización comunes como parte del proceso de infección.

Por otro lado, los estudios demuestran que *P. gingivalis* induce el cambio lítico del VEB (113). El promotor del gen BZL1 (gen inmediatamente temprano) está envuelto por histonas y su activación requiere la inhibición de una histona desacetilasa (HDAC) (114). El ácido butírico, un ácido graso de cadena corta es un componente de desecho metabólico de *P. gingivalis* que promueve la inhibición de HDACs (115), por lo tanto, genera la acetilación de histonas y la liberación y activación del promotor del gen BZL1 finalmente la activación del ciclo lítico abortivo del VEB (116). Se informa que la concentración de ácido butírico aumenta con la progresión de la enfermedad periodontal, lo que sugiere que puede promover un estado grave de la enfermedad (89). Se ha demostrado que la reactivación lítica del VEB es importante para la carcinogénesis (69). De hecho, el ciclo lítico abortivo, en el que se expresa un conjunto limitado de productos virales, aunque sin maduración viral, es prominente en la carcinogénesis epitelial (117). Entre los genes virales expresados en este ciclo lítico abortivo se encuentran los inmediatamente tempranos, pero no los genes estructurales, por lo que no se produce ninguna nueva partícula viral (118).

En un ciclo lítico de VEB, los genes que codifican proteínas con funciones antiapoptóticas (BHRF1, BALF1) e inmunomoduladoras (BCRF1, BARF-1, BILF1, BGLF5, BNLF2a, BLLF3) promueven la producción viral al proteger temporalmente las células infectadas de las señales de muerte provocadas por respuestas inmunes. En la tumorigénesis también podrían jugar un papel, ya que estos genes continuarían brindando asistencia inmunomoduladora y antiapoptótica sin la célula infectada, alcanzando las etapas líticas finales asociadas con la muerte celular (69). Por tanto, se expresan los genes que permiten que el virus esté activo y que la célula viva mantenga su presencia.

BARF-1 cumple un rol en la tumorigénesis por sus propiedades inmunomoduladoras debido a su interacción física con hCSF. Por otro lado, como se ha descrito también presenta propiedades anti

apoptóticas y de inmortalización.

Un punto muy importante es el establecimiento de latencia en los tumores epiteliales mediados por VEB. Teniendo en cuenta que tanto en NPC como en VEBaGC, se detecta sistemáticamente un VEB latente clonal en los tumores y que apenas se encuentra latencia en los epitelios no tumorales (60), una pregunta importante es qué factores promueven el establecimiento de la latencia del VEB en las células epiteliales. A este respecto, se ha sugerido que el daño previo al ADN puede favorecer la posibilidad de mantenimiento del genoma viral y el establecimiento de la latencia (61).

Por tanto, con los antecedentes obtenidos de la bibliografía se plantea un modelo que indica una sugerida interacción funcional VEB-*P. gingivalis* mediada por el potencial oncogénico, inmunomodulador e interacciones celulares de BRF-1, y las propiedades inflamatorias y oncogénicas de *P. gingivalis*. El aumento de la abundancia relativa de *P. gingivalis* en la cavidad oral por factores como estrés o tabaco entre otros, produce una disbiosis y un proceso de inflamación crónica. Esto conlleva a la sobreproducción de ROS y el consiguiente daño del ADN (119) que puede favorecer el establecimiento de latencia del VEB. Por otro lado, el ácido butírico generado como metabolito de desecho de *P. gingivalis*, favorece la transcripción del gen inmediatamente temprano BZLF1(113). BRF-1 es expresado y secretado por la activación del factor de transcripción. Las propiedades tumorigénicas de BRF-1 promueven el desarrollo de cáncer oral.

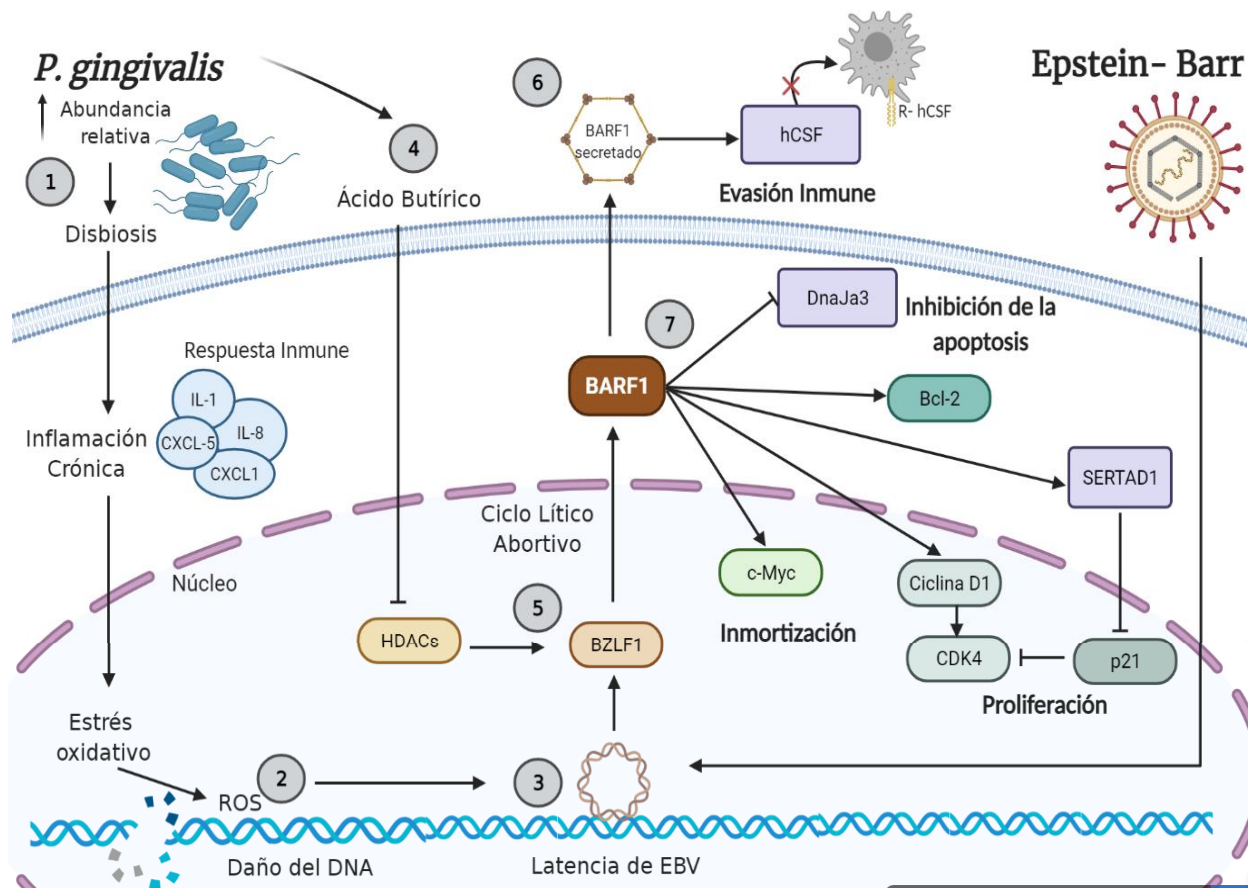


Figura 11. Modelo de interacción sugerido entre VEB y *P. gingivalis* en el desarrollo del cáncer oral:
 1) El aumento en la abundancia relativa de *P. gingivalis* conduce a un microambiente oral disbiótico, que a su vez promueve inflamación crónica. 2) Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden provocar daños en el ADN. 3) Las alteraciones del ADN favorecen el mantenimiento del genoma y establecimiento de latencia de VEB en células epiteliales orales. 4,5) El ácido butírico, desecho del metabolismo de *P. gingivalis*, inhibe las HDAC, promueve la acetilación de histonas, la expresión de genes VEB IE, lo que a su vez promueve activación del ciclo lítico abortivo en el que se expresan algunos genes virales latentes y líticos, como BARF-1. 6) La proteína BARF-1 hexamérica secretada modula la respuesta inmune del hospedero, a través del hCSF que actúa como receptor señuelo, promoviendo una reducción en la activación y diferenciación de macrófagos 7) La porción de BARF-1 intracelular interactúa con proteínas celulares para promover la inhibición de la apoptosis, contribuir en la proliferación celular e inmortalización. Por tanto, la suma de estos factores y el entorno inflamatorio provocado por la respuesta inmune del hospedero contribuyen al proceso de transformación y desarrollo de cáncer oral.

5. DISCUSIÓN

El VEB está asociado etiológicamente a tumores epiteliales como NPC indiferenciados y a un subgrupo de tumores gástricos. A pesar de que aún se desconoce su relación con el desarrollo de COCE, se ha sugerido que VEB desempeña un rol importante en la promoción y progresión del proceso tumoral. En efecto, se ha descrito que VEB está presente en alrededor del 40% de COCE en el mundo (57).

Las propiedades del VEB que contribuyen al proceso de carcinogénesis están dadas por su capacidad de evadir la respuesta inmune y por la expresión de oncogenes virales. En tumores epiteliales, se ha descrito que el 90% de los casos expresan la proteína oncogénica BARF-1 (66), la cual es raramente detectada en linfomas (65). Esto sugiere que BARF-1 es una proteína específica del epitelio tumoral infectado.

En esta tesis se realizó el análisis de la diversidad genética de las secuencias en toda la región codificante del gen BARF-1 (165504–166169pb). Un total de 41 mutaciones que se tradujeron en cambio en la secuencia aminoacídica de BARF-1 fueron detectadas en 856 aislados. Siete de ellas (V29A, V46A, W72G, D79G, V113I, H130R, D138Y) han sido previamente reportadas (120). Las mutaciones V29A y H130R fueron detectadas en 173/856 y 30/856 aislados, respectivamente, constituyendo las mutaciones más prevalentes. Esto es concordante con el estudio de Hutajulu, et al. (2010) en el que se analizó la variabilidad de BARF-1 en muestras de NPC, otras enfermedades relacionadas a VEB y pacientes sanos de Indonesia, encontrando que estas mutaciones estuvieron presentes principalmente en NPCs. Otras mutaciones que se encontraron en más de una secuencia en este estudio fueron A20T (9), K179N (4) y I68T (3).

De las 856 secuencias, 50 fueron analizadas para mutaciones en la secuencia nucleotídica, arrojando 44 mutaciones, 14 de ellas silentes. Las mutaciones silentes T165545C, T165768C, C165779T, T165797C, C165944T fueron las más prevalentes (n: 15, 12, 5, 10 y 15/50 respectivamente). Las mutaciones silentes pueden afectar a la proteína a pesar de que no generen un cambio de aminoácido, debido a que el cambio en el uso de codones se ha visto relacionado con alteración en la velocidad de traducción y en el plegamiento de la proteína (121). Diferentes codones pueden codificar un mismo aminoácido, por la redundancia del genoma; sin embargo, la disponibilidad de ARNt es específico para cada codón. Los codones que son habituales en un gen disponen de ARNt para la traducción. Por ello, el cambio de codón podría modificar la traducción, especialmente la velocidad y esto conllevar a un mal plegamiento de la proteína.

La mutación T165545C ha sido reportada por Zhang, et al 2006 en líneas celulares de VEB de linfoma de células T/NK, a diferencia de lo encontrado en este estudio en que 14 de las 15 mutaciones corresponden a NPC (122). Por otro lado, T165768C, C165779T, T165797C, C165944T se presentaron mayormente en NPC, al igual que en el estudio de Hutajulu, et al. (2010). La mutación T165589C da cuenta del cambio de V29A y se presentó mayormente en NPC (54/173). Al igual que en estudios previos (120), la posición V29 mostró ser el *hot spot* más frecuente. Interesantemente esta mutación se presentó solo en 5/173 GCs. La mayor frecuencia de V29A en NPCs sugiere que puede existir una asociación. De igual manera, como evidencia el árbol filogenético de la secuencia nucleotídica de BARF-1, el grupo 3 que corresponde a NPC, presenta la mutación V29A. El 80,3% de NPCs de pacientes indonesios han presentado esta mutación, y el 25,3% de NPC de China del Norte, confirmando los resultados obtenidos (120,123).

La mayoría de los aislados presentaron una secuencia aminoacídica correspondiente a la cepa de referencia B95-8 en la región del gen BARF-1, como se evidenció en el árbol filogenético de las

856 secuencias aminoacídicas. La región de homología con el receptor hCSF (146-158aa) se muestra altamente conservado entre las secuencias, al igual que los sitios de unión al hCSF (34-39 y 82-86aa), sugiriendo que este sitio en la proteína BARF-1 es relevante para el virus y para su función biológica. El hecho de que las mutaciones no se encuentren en el sitio de interacción con otras proteínas, no descarta que puedan afectar la estructura o estabilidad de la proteína. Para evaluar esta posibilidad, se realizó el análisis de la posición de los aminoácidos donde ocurren las mutaciones en la estructura cristalográfica de la proteína BARF-1. Así, valina 29 ubicado en el dominio N-terminal de la proteína forma un puente de hidrogeno con valina 91. La mutación en esta posición genera un cambio de valina por alanina, sin embargo, al ser los dos aminoácidos alifáticos poco reactivos y fuertemente hidrofóbicos, se sugiere que no produce efecto en la estructura de la proteína (124). Además, la interacción valina 91 no se ve afectada, ya que esta interacción ocurre entre los grupos amino y carboxilo de ambos aminoácidos. El cambio de triptófano por glicina en la posición 72 implica un cambio de un aminoácido apolar por uno polar sin carga. La estructura de estos aminoácidos es bastante diferente por el anillo aromático del triptófano, el cual interactúa con arginina 75 y esta interacción puede ser afectada por glicina y cambiar la estabilidad de la proteína BARF-1. En la posición 130, la mutación genera un cambio de histidina por arginina, ambos aminoácidos polares con carga positiva, con grupos funcionales diferentes. La histidina es un aminoácido aromático con un grupo imidazol, mientras que arginina tiene un grupo guanidino. Sin embargo, es un cambio que tampoco supondría un efecto en la estabilidad de la proteína. Hutajulu y col. (2010) han sugerido que no se considera que los tres cambios principales de aminoácidos (V29A, W72G y H130R) en el gen BARF-1 cambien la estructura secundaria, de BARF-1, por lo tanto, podrían tener un mínimo efecto sobre su función biológica (120). Tomados en conjunto, los datos filogenéticos permiten concluir que la proteína

BARF-1 es altamente conservada y que las variaciones reportadas en su secuencia primaria no afectan su estructura y, en consecuencia, no afectan sus propiedades biológicas.

El potencial oncogénico de BARF-1 está dado por sus interacciones con proteínas celulares con funciones relacionadas a carcinogénesis. Como se ha descrito previamente, BARF-1 neutraliza e inactiva alostéricamente a hCSF, lo cual impide la unión de este último a su receptor (70). El efecto de esta interacción es la inhibición de la proliferación, diferenciación y activación de células del linaje mononuclear-fagocítico, y por consiguiente inhibición de la secreción de INF- γ secretado por estas células (125). Por otro lado, como se ha evidenciado en este trabajo, BARF-1 presenta interacción con otras proteínas como *DnaJ homolog subfamily A member 3* (DNAJA3), también conocida como Tid1. Esta proteína es considerada un supresor tumoral, que modula la transducción de señales apoptóticas o las estructuras efectoras dentro de la matriz mitocondrial. Tid1 afecta la liberación de Citocromo C de las mitocondrias y la activación de la Caspasa 3, pero no la activación de la Caspasa 8. Se han identificado dos formas de *splicing* de ARNm de Tid1 y producen dos variantes (Tid1-L y Tid1-S) en el citosol. La expresión de hTid-1L aumenta la apoptosis inducida por el agente mitomicina c y TNF α . Se demostró que esta actividad depende del dominio J de hTid-1L, debido a que una mutante de este dominio suprimió la apoptosis. Al contrario, se demostró que hTid-1S suprime la apoptosis, porque una mutante de este dominio aumentó la apoptosis (126). Estos datos sugieren que el papel de Tid1 en la progresión del cáncer podría depender del tipo de variante de Tid1 (127). Además, se ha visto que niveles aumentados de Tid1 están asociados con supresión de metástasis en cáncer de cabeza y cuello mediante la inhibición de Galectin-7 (128). Dada la interacción de Tid1 con BARF-1, y su actividad dual en la modulación de la apoptosis, estudios futuros podrían abordar en el efecto de esta interacción y dar luz respecto de la variante de Tid1 que interactúa con BARF-1. Es conocido que otros virus oncogénicos expresan proteínas

capaces de controlar la apoptosis (129–131), por tanto, es plausible la noción que BARF-1 interactúe con Tid1 con el propósito de evitar la muerte celular para permitir la replicación viral o la mantención de la latencia durante el ciclo lítico abortivo. En todo caso, se requieren estudios adicionales para confirmar estas posibilidades.

En esta tesis se evidenció interacción de BARF-1 con la *Proteína 1 que contiene el dominio SERTA* (Sertad1). Esta proteína se une a promotores que responden a E2F, funcionando como corregulador para integrar señales proporcionadas por factores de transcripción. Sertad1 estimula la actividad transcripcional de E2F1 / TFDP1 y hace que la actividad de ciclina D1 / CDK4 sea resistente a los efectos inhibidores de p16. Por lo tanto, la interacción de Sertad1 con BARF-1 podría favorecer la actividad reguladora de la primera, promoviendo proliferación celular debido a la regulación positiva por E2F/DP1. Sin embargo, se requieren estudios experimentales adicionales para comprobar esta posibilidad.

En todas las neoplasias malignas asociadas al VEB, el virus se encuentra en estado latente. La latencia viral es un mecanismo adaptativo que permite evitar la detección inmune y los efectos citopáticos de la fase replicativa viral. El establecimiento de latencia por VEB puede darse tras un proceso de reactivación ocurrido en los linfocitos (donde permaneció en latencia por mucho tiempo) permitiendo el contacto entre el virus y células epiteliales donde se hayan dado cambios genéticos tempranos premaligno como la sobreexpresión de ciclina D1 o la pérdida de p16, que facilitarían la infección latente estable del virus (61,132).

Otro factor conocido que genera daño en el ADN es la desregulación de ROS. En niveles altos, ROS puede conducir a una función fisiológica deteriorada de la célula a través del daño del ADN, proteínas, lípidos y otras macromoléculas. En todo caso, no se conocen los mecanismos mediante los cuales el daño al genoma se traduce finalmente en el mantenimiento del genoma viral y

establecimiento de latencia en células epiteliales.

La inflamación crónica que genera *P. gingivalis* en la cavidad oral promueve la producción de ROS por parte de neutrófilos polimorfonucleares. Se ha descrito que la creación de un entorno proinflamatorio puede vincular funcionalmente la enfermedad periodontal con el desarrollo de cáncer oral, dado que los mecanismos que afectan la integridad de los tejidos y alteran la respuesta inmunitaria son relevantes en tumorigénesis.

Por ello la inflamación crónica generada por *P. gingivalis* y por ende la producción exacerbada de ROS y el subsecuente daño al genoma, potencialmente podrían facilitar el establecimiento de latencia de VEB.

Por otro lado, el ácido butírico, producido como un compuesto de desecho de *P. gingivalis*, favorecería la inhibición de histona desacetilasas (HDAC) y la activación del promotor BZLF1, que dirige la expresión de la proteína Zta, regulador del switch latente/lítico.

La activación de los genes IE puede conducir a un ciclo lítico abortivo del VEB con expresión de algunos genes líticos, incluido BARF-1. Esto ha sido plasmado en el modelo propuesto de interacción entre VEB y *P. gingivalis* en el cual la proteína BARF-1 tendría un rol fundamental (**Figura 11**). En este modelo, el incremento en la abundancia relativa de *P. gingivalis* promueve inflamación crónica con generación de ROS, los cuales pueden provocar daños en el ADN. Estas alteraciones favorecen el establecimiento de la latencia de VEB en células epiteliales orales. Adicionalmente, el ácido butírico, proveniente del metabolismo de *P. gingivalis*, provoca alteraciones que favorecen activación del ciclo lítico abortivo de VEB con expresión de BARF-1. Esta proteína modula la respuesta inmune del hospedero e interactúa con proteínas celulares para promover la inhibición de la apoptosis, contribuir en la proliferación celular e inmortalización. Por tanto, la suma de estos factores y el entorno inflamatorio provocado por la respuesta inmune del

hospedero contribuyen al proceso de transformación y desarrollo de cáncer oral.

Finalmente, se ha descrito que ambos tanto VEB como *P. gingivalis* tienen la capacidad de activar vías de señalización celular que promueven tumorigénesis de manera independiente, sugiriendo la necesidad de profundizar en el estudio de esta interacción y sus consecuencias, en el desarrollo del cáncer oral. La cuantificación de la abundancia de *P. gingivalis* en la cavidad oral y la detección del genoma de VEB, con expresión de BARF-1 podrían constituir marcadores diagnósticos o pronósticos, como también sugerir herramientas terapéuticas en la prevención y tratamiento de cáncer oral.

En conclusión, en esta tesis se caracterizó a BARF-1 mediante herramientas bioinformáticas, confirmando que es una proteína altamente conservada, lo que favorecería su interacción con proteínas celulares. Las interacciones entre BARF-1 con proteínas celulares asociadas al ciclo celular permitieron plantear un modelo de cooperación con *P. gingivalis* para el desarrollo de cáncer oral. Los resultados obtenidos permiten confirmar la hipótesis planteada en esta tesis.

6. 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 Cancer J Clin* [Internet]. 2021 Feb 4;caac.21660. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>
2. Um P. Cancer, Definition. In: *Encyclopedia of Metagenomics* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2015. p. 65–65. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-7475-4_106
3. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* [Internet]. 2019 Apr 15;144(8):1941–53. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.31937>
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018 Nov;68(6):394–424. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>
5. de Camargo Cancela M, Voti L, Guerra-Yi M, Chapuis F, Mazuir M, Curado MP. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: Population-based incidence. *Head Neck* [Internet]. 2009;NA-NA. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hed.21193>
6. Shield KD, Ferlay J, Jemal A, Sankaranarayanan R, Chaturvedi AK, Bray F, et al. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2017 Jan;67(1):51–64. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21384>
7. Herrera-Serna BY, Lara-Carrillo E, Toral-Rizo VH, Cristina do Amaral R, Aguilera-Eguía RA. Relationship between the Human Development Index and its Components with Oral Cancer in Latin America. *J Epidemiol Glob Health* [Internet]. 2019;9(4):223. Available from: <https://www.atlantispress.com/article/125921806>
8. Perdomo S, Martin Roa G, Brennan P, Forman D, Sierra MS. Head and neck cancer burden and preventive measures in Central and South America. *Cancer Epidemiol* [Internet]. 2016 Sep;44:S43–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877782116300376>
9. Wong T, Wiesenfeld D. Oral Cancer. *Aust Dent J* [Internet]. 2018 Mar;63:S91–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/adj.12594>
10. Dhanuthai K, Rojanawatsirivej S, Thosaporn W, Kintarak S, Subarnbhesaj A, Darling M, et al. Oral cancer: A multicenter study. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal* [Internet]. 2017;0–0. Available from: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/aop/21999.pdf>
11. Mello FW, Miguel AFP, Dutra KL, Porporatti AL, Warnakulasuriya S, Guerra ENS, et al. Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2018 Aug;47(7):633–40. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jop.12726>
12. Conway DI, Purkayastha M, Chestnutt IG. The changing epidemiology of oral cancer : definitions , trends , and risk factors. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2018;225(9):867–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.922>
13. JEHN P, DITTMANN J, ZIMMERER R, STIER R, JEHN M, GELLRICH N-C, et al. Survival Rates According to Tumour Location in Patients With Surgically Treated Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res* [Internet]. 2019 May 15;39(5):2527–33. Available from: <http://ar.iiajournals.org/lookup/doi/10.21873/anticancer.13374>
14. Listl S, Jansen L, Stenzinger A, Freier K, Emrich K, Holleczeck B, et al. Survival of Patients with Oral Cavity Cancer in Germany. Scheurer M, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jan 18;8(1):e53415. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0053415>

15. Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van Der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2007 Jul 26;36(10):575–80. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0714.2007.00582.x>
16. Hashibe M, Hunt J, Wei M, Buys S, Gren L, Lee Y-CA. Tobacco, alcohol, body mass index, physical activity, and the risk of head and neck cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian (PLCO) cohort. *Head Neck* [Internet]. 2013 Jul;35(7):914–22. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hed.23052>
17. Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* [Internet]. 2004 Feb 20;108(5):741–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.11627>
18. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsagué X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol Drinking in Never Users of Tobacco, Cigarette Smoking in Never Drinkers, and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2007 May 16;99(10):777–89. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djk179>
19. Garrote LF, Herrero R, Reyes RMO, Vaccarella S, Anta JL, Ferbeyre L, et al. Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *Br J Cancer* [Internet]. 2001 Jul 3;85(1):46–54. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1054/bjoc.2000.1825>
20. Taghavi N, Yazdi I. Type of food and risk of oral cancer. *Arch Iran Med* [Internet]. 2007 Apr;10(2):227–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17367228>
21. Perry BJ, Zammit AP, Lewandowski AW, Bashford JJ, Dragovic AS, Perry EJ, et al. Sites of Origin of Oral Cavity Cancer in Nonsmokers vs Smokers. *JAMA Otolaryngol Neck Surg* [Internet]. 2015 Jan 1;141(1):5. Available from: <http://archotol.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoto.2014.2620>
22. Bravi F, Bosetti C, Filomeno M, Levi F, Garavello W, Galimberti S, et al. Foods, nutrients and the risk of oral and pharyngeal cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2013 Nov 22;109(11):2904–10. Available from: <http://www.nature.com/articles/bjc2013667>
23. Gupta B, Bray F, Kumar N, Johnson NW. Associations between oral hygiene habits, diet, tobacco and alcohol and risk of oral cancer: A case–control study from India. *Cancer Epidemiol* [Internet]. 2017 Dec;51:7–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877782117301467>
24. Jefferies S, Eeles R, Goldgar D, A'Hern R, Henk JM, Gore M. The role of genetic factors in predisposition to squamous cell cancer of the head and neck. *Br J Cancer* [Internet]. 1999 Feb;79(5–6):865–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10070882>
25. Kruse AL, Bredell M, Grätz KW. Oral squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients. *Head Neck Oncol* [Internet]. 2010 Dec 4;2(1):24. Available from: <https://headandneckoncology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-3284-2-24>
26. Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker–never drinkers: A descriptive epidemiologic study. *Head Neck* [Internet]. 2008 Jan;30(1):75–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hed.20664>
27. Foy J-P, Bertolus C, Boutolleau D, Agut H, Gessain A, Herceg Z, et al. Arguments to Support a Viral Origin of Oral Squamous Cell Carcinoma in Non-Smoker and Non-Drinker Patients. *Front Oncol* [Internet]. 2020 May 21;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.00822/full>
28. Bebek G, Bennett KL, Funchain P, Campbell R, Seth R, Scharpf J, et al. Microbiomic subprofiles and MDR1 promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2012 Apr 1;21(7):1557–65. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddr593>
29. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988–2007). *Ann Oncol*

- [Internet]. 2008 Oct;19(10):1681–90. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419401877>
30. Haegglblom L, Ramqvist T, Tommasino M, Dalianis T, Näsman A. Time to change perspectives on HPV in oropharyngeal cancer. A systematic review of HPV prevalence per oropharyngeal sub-site the last 3 years. *Papillomavirus Res* [Internet]. 2017 Dec;4:1–11. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405852117300137>
 31. Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsagué X, Laporte L, et al. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* [Internet]. 2014 Nov;15(12):1319–31. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204514704711>
 32. She Y, Nong X, Zhang M, Wang M. Correction: Epstein-Barr virus infection and oral squamous cell carcinoma risk: A meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2019 Jun 20;14(6):e0217659. Available from:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0217659>
 33. de Lima MAP, Teodoro IPP, Galiza LE de, Filho PHBM, Marques F de M, Pinheiro RFF, et al. Association between Epstein-Barr Virus and Oral Carcinoma: A Systematic Review with Meta-Analysis. *Crit Rev Oncol* [Internet]. 2019;24(4):349–68. Available from:
<http://www.dl.begellhouse.com/journals/439f422d0783386a,7201abfe54b9dad8,231460b72b91481b.html>
 34. Gao Z, Lv J, Wang M. Epstein-Barr virus is associated with periodontal diseases. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2017 Feb;96(6):e5980. Available from: <https://journals.lww.com/00005792-201702100-00020>
 35. Tarbouriech N, Ruggiero F, de Turenne-Tessier M, Ooka T, Burmeister WP. Structure of the Epstein-Barr Virus Oncogene BARF1. *J Mol Biol* [Internet]. 2006 Jun;359(3):667–78. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283606004190>
 36. Guidry J, Birdwell C, Scott R. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of oral cancers. *Oral Dis* [Internet]. 2018 May;24(4):497–508. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/odi.12656>
 37. Chesnokova LS, Hutt-Fletcher LM. Fusion of Epstein-Barr Virus with Epithelial Cells Can Be Triggered by v 5 in Addition to v 6 and v 8, and Integrin Binding Triggers a Conformational Change in Glycoproteins gHgL. *J Virol* [Internet]. 2011 Dec 15;85(24):13214–23. Available from:
<https://jvi.asm.org/content/85/24/13214>
 38. Zhang H, Li Y, Wang H-B, Zhang A, Chen M-L, Fang Z-X, et al. Ephrin receptor A2 is an epithelial cell receptor for Epstein-Barr virus entry. *Nat Microbiol* [Internet]. 2018 Feb 1;3(2):164–71. Available from:
<http://www.nature.com/articles/s41564-017-0080-8>
 39. Tsai K, Thikmyanova N, Wojcechowskyj JA, Delecluse H-J, Lieberman PM. EBV Tegument Protein BNRF1 Disrupts DAXX-ATRX to Activate Viral Early Gene Transcription. Sugden B, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2011 Nov 10;7(11):e1002376. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002376>
 40. Feederle R. The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *EMBO J* [Internet]. 2000 Jun 15;19(12):3080–9. Available from:
<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/19.12.3080>
 41. Murata T. Encyclopedia of EBV-Encoded Lytic Genes: An Update. In 2018. p. 395–412. Available from:
http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-7230-7_18
 42. Tonoyan L, Vincent-Bugnas S, Olivieri C-V, Doglio A. New Viral Facets in Oral Diseases: The EBV Paradox. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Nov 22;20(23):5861. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/23/5861>
 43. Belshaw R, Pereira V, Katzourakis A, Talbot G, Paces J, Burt A, et al. Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 Apr 6;101(14):4894–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044706>
 44. Hatton OL, Harris-Arnold A, Schaffert S, Krams SM, Martinez OM. The interplay between Epstein-Barr

- virus and B lymphocytes: implications for infection, immunity, and disease. *Immunol Res* [Internet]. 2014 May 12;58(2–3):268–76. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12026-014-8496-1>
45. Borza CM, Hutt-Fletcher LM. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein–Barr virus. *Nat Med* [Internet]. 2002 Jun;8(6):594–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm0602-594>
 46. Münz C. Latency and lytic replication in Epstein–Barr virus-associated oncogenesis. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2019 Nov 2;17(11):691–700. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41579-019-0249-7>
 47. Farid E, Al-Biltagi M. Trend and seroprevalence of Epstein–Barr virus in Bahrain: 2001–2015. *East Mediterr Heal J* [Internet]. 2017 Dec 1;23(12):821–9. Available from: http://applications.emro.who.int/emhj/v23/12/EMHJ_2017_23_12_821_829.pdf
 48. Dowd JB, Palermo T, Brite J, McDade TW, Aiello A. Seroprevalence of Epstein-Barr Virus Infection in U.S. Children Ages 6-19, 2003-2010. Chan KH, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 May 22;8(5):e64921. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0064921>
 49. Kuri A, Jacobs BM, Vickaryous N, Pakpoor J, Middeldorp J, Giovannoni G, et al. Epidemiology of Epstein-Barr virus infection and infectious mononucleosis in the United Kingdom. *BMC Public Health* [Internet]. 2020 Dec 12;20(1):912. Available from: <https://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12889-020-09049-x>
 50. IARC. Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8. Lyon, France, 17-24 June 1997. IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans [Internet]. 1997;70:1–492. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9705682>
 51. Weiss LM, Chen YY, Liu XF, Shibata D. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Pathol* [Internet]. 1991 Dec;139(6):1259–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1661073>
 52. Suzuki R, Yamaguchi M, Izutsu K, Yamamoto G, Takada K, Harabuchi Y, et al. Prospective measurement of Epstein-Barr virus–DNA in plasma and peripheral blood mononuclear cells of extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Blood* [Internet]. 2011 Dec 1;118(23):6018–22. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/118/23/6018/29116/Prospective-measurement-of-EpsteinBarr-virusDNA-in>
 53. Kim WY, Montes-Mojarro IA, Fend F, Quintanilla-Martinez L. Epstein-Barr Virus-Associated T and NK-Cell Lymphoproliferative Diseases. *Front Pediatr* [Internet]. 2019 Mar 15;7. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fped.2019.00071/full>
 54. Taylor GS, Long HM, Brooks JM, Rickinson AB, Hislop AD. The Immunology of Epstein-Barr Virus–Induced Disease. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2015 Mar 21;33(1):787–821. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032414-112326>
 55. Qiao Y-W, Zhao XQ, Liu J, Yang WJ. Clinicopathological features of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *J BUON* [Internet]. 24(3):1092–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31424666>
 56. Heawchaiyaphum C, Iizasa H, Ekalaksananan T, Burassakarn A, Kiyono T, Kanehiro Y, et al. Epstein–Barr Virus Infection of Oral Squamous Cells. *Microorganisms* [Internet]. 2020 Mar 16;8(3):419. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/3/419>
 57. Sand LP, Jalouli J, Larsson P-A, Hirsch J-M. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* [Internet]. 2002 May;93(5):586–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079210402000148>
 58. Acharya S, Ekalaksananan T, Vatanasapt P, Loyha K, Phusingha P, Promthet S, et al. Association of

- Epstein-Barr virus infection with oral squamous cell carcinoma in a case-control study. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2015 Apr;44(4):252–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jop.12231>
59. Yen C-Y, Lu M-C, Tzeng C-C, Huang J-Y, Chang H-W, Chen R-S, et al. Detection of EBV Infection and Gene Expression in Oral Cancer from Patients in Taiwan by Microarray Analysis. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2009;2009:1–15. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2009/904589/>
 60. Tsang CM, Deng W, Yip YL, Zeng M-S, Lo KW, Tsao SW. EBV infection and persistence in nasopharyngeal epithelial cells. *Chin J Cancer* [Internet]. 2014 Sep 16; Available from: http://www.cjcsysu.cn/abstract_AOP.asp?fr=doi&id=14-169
 61. Tsang CM, Yip YL, Lo KW, Deng W, To KF, Hau PM, et al. Cyclin D1 overexpression supports stable EBV infection in nasopharyngeal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2012 Dec 11;109(50):E3473–82. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1202637109>
 62. Pathmanathan R, Prasad U, Sadler R, Flynn K, Raab-Traub N. Clonal Proliferations of Cells Infected with Epstein-Barr Virus in Preinvasive Lesions Related to Nasopharyngeal Carcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 1995 Sep 14;333(11):693–8. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199509143331103>
 63. Seto E, Yang L, Middeldorp J, Sheen TS, Chen JY, Fukayama M, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded BARP1 gene is expressed in nasopharyngeal carcinoma and EBV-associated gastric carcinoma tissues in the absence of lytic gene expression. *J Med Virol*. 2005;76(1):82–8.
 64. Decaussin G, Sbih-Lammali F, de Turenne-Tessier M, Bouguermouh A, Ooka T. Expression of BARP1 gene encoded by Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma biopsies. *Cancer Res* [Internet]. 2000 Oct 1;60(19):5584–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034107>
 65. zur Hausen A, Brink AA, Craanen ME, Middeldorp JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: expression of the transforming BARP1 gene. *Cancer Res* [Internet]. 2000 May 15;60(10):2745–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10825150>
 66. Seto E, Yang L, Middeldorp J, Sheen T-S, Chen J-Y, Fukayama M, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded BARP1 gene is expressed in nasopharyngeal carcinoma and EBV-associated gastric carcinoma tissues in the absence of lytic gene expression. *J Med Virol* [Internet]. 2005 May;76(1):82–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778977>
 67. Núñez-Acurio D, Bravo D, Aguayo F. Epstein-Barr Virus-Oral Bacterial Link in the Development of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Pathog (Basel, Switzerland)* [Internet]. 2020 Dec 18;9(12). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33352891>
 68. Blanco R, Aguayo F. Role of BamHI-A Rightward Frame 1 in Epstein-Barr Virus-Associated Epithelial Malignancies. *Biology (Basel)* [Internet]. 2020 Dec 11;9(12):461. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-7737/9/12/461>
 69. Morales-Sánchez A, Fuentes-Panana E. The Immunomodulatory Capacity of an Epstein-Barr Virus Abortive Lytic Cycle: Potential Contribution to Viral Tumorigenesis. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2018 Mar 30;10(4):98. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6694/10/4/98>
 70. Eleghert J, Bracke N, Pouliot P, Gutsche I, Shkumatov A V, Tarbouriech N, et al. Allosteric competitive inactivation of hematopoietic CSF-1 signaling by the viral decoy receptor BARP1. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2012 Sep 19;19(9):938–47. Available from: <http://www.nature.com/articles/nsmb.2367>
 71. Lo AK-F, Dawson CW, Lung HL, Wong K-L, Young LS. The Therapeutic Potential of Targeting BARP1 in EBV-Associated Malignancies. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Jul 17;12(7):1940. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32708965>
 72. Sall A, Caserta S, Jolicœur P, Franqueville L, de Turenne-Tessier M, Ooka T. Mitogenic activity of Epstein-Barr virus-encoded BARP1 protein. *Oncogene* [Internet]. 2004 Jun 17;23(28):4938–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064715>

73. Sakka E, Zur Hausen A, Houali K, Liu H, Fiorini S, Ooka T. Cellular localization of BARP1 oncoprotein and its cell stimulating activity in human epithelial cell. *Virus Res* [Internet]. 2013 Jun;174(1–2):8–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23458996>
74. 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- κ B. *J Virol* [Internet]. 2013 Oct 1;87(19):10515–23. Available from: <https://jvi.asm.org/content/87/19/10515>
75. Sheng W, Decaussin G, Sumner S, Ooka T. N-terminal domain of BARP1 gene encoded by Epstein-Barr virus is essential for malignant transformation of rodent fibroblasts and activation of BCL-2. *Oncogene* [Internet]. 2001 Mar 10;20(10):1176–85. Available from: <http://www.nature.com/articles/1204217>
76. 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* [Internet]. 2009 Sep;11(9):964–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476558609800493>
77. Hoebe EK, Le Large TYS, Tarbouriech N, Oosterhoff D, De Gruijl TD, Middeldorp JM, et al. Epstein-Barr Virus-Encoded BARP1 Protein is a Decoy Receptor for Macrophage Colony Stimulating Factor and Interferes with Macrophage Differentiation and Activation. *Viral Immunol* [Internet]. 2012 Dec;25(6):461–70. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vim.2012.0034>
78. Chen T, Yu W-H, Izard J, Baranova O V., Lakshmanan A, Dewhirst FE. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database* [Internet]. 2010 Jul 30;2010:baq013–baq013. Available from: <https://academic.oup.com/database/article-lookup/doi/10.1093/database/baq013>
79. Samaranayake L, Matsubara VH. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem. *Dent Clin North Am* [Internet]. 2017 Apr;61(2):199–215. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011853216301318>
80. Hernández M, Dutzan N, García-Sesnich J, Abusleme L, Dezerega A, Silva N, et al. Host-Pathogen Interactions in Progressive Chronic Periodontitis. *J Dent Res* [Internet]. 2011 Oct 6;90(10):1164–70. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034511401405>
81. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol* [Internet]. 2012 Dec;27(6):409–19. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x>
82. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res* [Internet]. 2012 Oct 30;91(10):914–20. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034512457373>
83. SILVA N, ABUSLEME L, BRAVO D, DUTZAN N, GARCIA-SESNICH J, VERNAL R, et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2015 Jun;23(3):329–55. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572015000300329&lng=en&tlng=en
84. Hoare A, Soto C, Rojas-Celis V, Bravo D. Chronic Inflammation as a Link between Periodontitis and Carcinogenesis. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2019 Mar 27;2019:1–14. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2019/1029857/>
85. Cardoso EM, Reis C, Manzanares-Céspedes MC. Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases. *Postgrad Med* [Internet]. 2018 Jan;130(1):98–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29065749>
86. Li J, Li L, Wang X, Xiao L. *Porphyromonas gingivalis* Inhibition of MicroRNA-205-5p Expression Modulates Proinflammatory Cytokines in Gingival Epithelial Cells. *Biochem Genet* [Internet]. 2020 Aug 17;58(4):566–79. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10528-020-09957-y>

87. Groeger S, Jarzina F, Domann E, Meyle J. *Porphyromonas gingivalis* activates NF κ B and MAPK pathways in human oral epithelial cells. BMC Immunol [Internet]. 2017;1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12865-016-0185-5>
88. Takeuchi H, Sasaki N, Yamaga S, Kuboniwa M, Matsusaki M, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via degradation of junctional adhesion molecule 1. PLoS Pathog [Internet]. 2019;15(11):e1008124. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31697789>
89. Shirasugi M, Nakagawa M, Nishioka K, Yamamoto T, Nakaya T, Kanamura N. Relationship between periodontal disease and butyric acid produced by periodontopathic bacteria. Inflamm Regen [Internet]. 2018 Dec 17;38(1):23. Available from: <https://inflammregen.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41232-018-0081-x>
90. Ochiai K, Kurita-Ochiai T. Effects of butyric acid on the periodontal tissue. Jpn Dent Sci Rev [Internet]. 2009 Sep;45(2):75–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1882761609000386>
91. Zhu B, Macleod LC, Newsome E, Liu J, Xu P. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediates protection of *Porphyromonas gingivalis* from *Streptococcus sanguinis* hydrogen peroxide production in multi-species biofilms. Sci Rep [Internet]. 2019 Dec 20;9(1):4944. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-41467-9>
92. Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. FEMS Microbiol Lett [Internet]. 2012 Aug;333(1):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22530835>
93. Saito A, Inagaki S, Kimizuka R, Okuda K, Hosaka Y, Nakagawa T, et al. *Fusobacterium nucleatum* enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Immunol Med Microbiol [Internet]. 2008 Dec;54(3):349–55. Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2008.00481.x>
94. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. J Immunol Res [Internet]. 2014;2014:476068. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24741603>
95. Kageyama S, Takeshita T, Asakawa M, Shibata Y, Takeuchi K, Yamanaka W, et al. Relative abundance of total subgingival plaque-specific bacteria in salivary microbiota reflects the overall periodontal condition in patients with periodontitis. Komaki M, editor. PLoS One [Internet]. 2017 Apr 3;12(4):e0174782. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0174782>
96. Damgaard C, Danielsen AK, Enevold C, Massarenti L, Nielsen CH, Holmstrup P, et al. *Porphyromonas gingivalis* in saliva associates with chronic and aggressive periodontitis. J Oral Microbiol [Internet]. 2019 Jan 1;11(1):1653123. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20002297.2019.1653123>
97. Sayehmiri F, Sayehmiri K, Asadollahi K, Soroush S, Bogdanovic L, Jalilian FA, et al. The prevalence rate of *Porphyromonas gingivalis* and its association with cancer: A systematic review and meta-analysis. Int J Immunopathol Pharmacol [Internet]. 2015 Jun;28(2):160–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26002887>
98. Chang C, Geng F, Shi X, Li Y, Zhang X, Zhao X, et al. The prevalence rate of periodontal pathogens and its association with oral squamous cell carcinoma. Appl Microbiol Biotechnol. 2018;(117).
99. Geng F, Liu J, Guo Y, Li C, Wang H, Wang H, et al. Persistent Exposure to *Porphyromonas gingivalis* Promotes Proliferative and Invasion Capabilities, and Tumorigenic Properties of Human Immortalized Oral Epithelial Cells. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2017 Feb 24;7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00057/full>
100. Choi CH, Spooner R, DeGuzman J, Koutouzis T, Ojcius DM, Yilmaz Ö. *Porphyromonas gingivalis* - nucleoside-diphosphate-kinase inhibits ATP-induced reactive-oxygen-species via P2X 7 receptor/NADPH-

- oxidase signalling and contributes to persistence. *Cell Microbiol* [Internet]. 2013 Jun;15(6):961–76. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12089>
101. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* [Internet]. 2006 May 11;5:14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16689993>
 102. Poetsch AR. The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2020;18:207–19. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2001037019304209>
 103. Liu J, Tang X, Li C, Pan C, Li Q, Geng F, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes the cell cycle and inflammatory cytokine production in periodontal ligament fibroblasts. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2015 Aug;60(8):1153–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003996915001211>
 104. Sztukowska MN, Ojo A, Ahmed S, Carenbauer AL, Wang Q, Shumway B, et al. *Porphyromonas gingivalis* initiates a mesenchymal-like transition through ZEB1 in gingival epithelial cells. *Cell Microbiol* [Internet]. 2016 Jun;18(6):844–58. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12554>
 105. Kato A, Imai K, Ochiai K, Ogata Y. Prevalence and quantitative analysis of Epstein-Barr virus DNA and *Porphyromonas gingivalis* associated with Japanese chronic periodontitis patients. *Clin Oral Investig* [Internet]. 2015 Sep;19(7):1605–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25515271>
 106. Kato A, Imai K, Sato H, Ogata Y. Prevalence of Epstein-Barr virus DNA and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese peri- implantitis patients. *BMC Oral Health*. 2017;17:148.
 107. Simpson DR, Mell LK, Cohen EEW. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* [Internet]. 2015 Apr;51(4):291–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25532816>
 108. Sugano N, Ikeda K, Oshikawa M, Idesawa M, Tanaka H, Sato S, et al. Relationship between *Porphyromonas gingivalis*, Epstein-Barr virus infection and reactivation in periodontitis. *J Oral Sci* [Internet]. 2004;46(4):203–6. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/josnusd/46.203?from=CrossRef>
 109. Guirimand T, Delmotte S, Navratil V. VirHostNet 2.0: surfing on the web of virus/host molecular interactions data. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2015 Jan 28;43(D1):D583–7. Available from: <http://academic.oup.com/nar/article/43/D1/D583/2437900/VirHostNet-20-surfing-on-the-web-of-virushost>
 110. Singh N, Bhatia V, Singh S, Bhatnagar S. MorCVD: A Unified Database for Host-Pathogen Protein-Protein Interactions of Cardiovascular Diseases Related to Microbes. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 11;9(1):4039. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-40704-5>
 111. Orchard S, Ammari M, Aranda B, Breuza L, Briganti L, Broackes-Carter F, et al. The MIntAct project—IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Jan;42(D1):D358–63. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkt1115>
 112. Jakovljevic A, Andric M, Knezevic A, Milicic B, Beljic-Ivanovic K, Perunovic N, et al. Herpesviral-bacterial co-infection in mandibular third molar pericoronitis. *Clin Oral Investig* [Internet]. 2017 Jun 12;21(5):1639–46. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00784-016-1955-4>
 113. Imai K, Inoue H, Tamura M, Cueno ME, Inoue H, Takeichi O, et al. The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* induces the Epstein–Barr virus lytic switch transactivator ZEBRA by histone modification. *Biochimie* [Internet]. 2012 Mar;94(3):839–46. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030090841100455X>
 114. Murata T, Kondo Y, Sugimoto A, Kawashima D, Saito S, Isomura H, et al. Epigenetic Histone Modification of Epstein-Barr Virus BZLF1 Promoter during Latency and Reactivation in Raji Cells. *J Virol* [Internet]. 2012 May 1;86(9):4752–61. Available from: <https://jvi.asm.org/content/86/9/4752>
 115. RIGGS MG, WHITTAKER RG, NEUMANN JR, INGRAM VM. n-Butyrate causes histone modification in

- HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature* [Internet]. 1977 Aug;268(5619):462–4. Available from: <http://www.nature.com/articles/268462a0>
116. Countryman JK, Gradoville L, Miller G. Histone Hyperacetylation Occurs on Promoters of Lytic Cycle Regulatory Genes in Epstein-Barr Virus-Infected Cell Lines Which Are Refractory to Disruption of Latency by Histone Deacetylase Inhibitors. *J Virol* [Internet]. 2008 May 15;82(10):4706–19. Available from: <https://jvi.asm.org/content/82/10/4706>
 117. Martel-Renoir D, Grunewald V, Touitou R, Schwaab G, Joab I. Qualitative analysis of the expression of Epstein--Barr virus lytic genes in nasopharyngeal carcinoma biopsies. *J Gen Virol* [Internet]. 1995 Jun 1;76(6):1401–8. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-76-6-1401>
 118. Al Tabaa Y, Tuailon E, Jeziorski E, Ouedraogo DE, Bolloré K, Rubbo P-A, et al. B-cell polyclonal activation and Epstein-Barr viral abortive lytic cycle are two key features in acute infectious mononucleosis. *J Clin Virol* [Internet]. 2011 Sep;52(1):33–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653211001958>
 119. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol* [Internet]. 2019 Jul;25:101084. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231718309017>
 120. Hutajulu SH, Hoebe EK, Verkuijlen SA, Fachiroh J, Hariwijanto B, Haryana SM, et al. Conserved mutation of Epstein-Barr virus-encoded BamHI-A Rightward Frame-1 (BARF1) gene in Indonesian nasopharyngeal carcinoma. *Infect Agent Cancer* [Internet]. 2010 Sep 19;5:16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20849661>
 121. Bali V, Bebok Z. Decoding mechanisms by which silent codon changes influence protein biogenesis and function. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2015 Jul;64:58–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25817479>
 122. Zhang Y, Ohyashiki JH, Takaku T, Shimizu N, Ohyashiki K. Transcriptional profiling of Epstein-Barr virus (EBV) genes and host cellular genes in nasal NK/T-cell lymphoma and chronic active EBV infection. *Br J Cancer* [Internet]. 2006 Feb 27;94(4):599–608. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16449999>
 123. Liu J, Ji X, Shen Z, Wang PhD Y, Luo PhD B. Sequence variations of Epstein-Barr virus-encoded BARF1 gene in nasopharyngeal carcinomas and healthy donors from southern and northern China. *J Med Virol* [Internet]. 2018;90(10):1629–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29797589>
 124. Gregoret LM, Sauer RT. Tolerance of a protein helix to multiple alanine and valine substitutions. *Fold Des* [Internet]. 1998 Apr;3(2):119–26. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359027898000170>
 125. Felix J, De Munck S, Verstraete K, Meuris L, Callewaert N, Elegheert J, et al. Structure and Assembly Mechanism of the Signaling Complex Mediated by Human CSF-1. *Structure* [Internet]. 2015 Sep;23(9):1621–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212615002725>
 126. Syken J, De-Medina T, Münger K. TID1, a human homolog of the *Drosophila* tumor suppressor *l(2)tid*, encodes two mitochondrial modulators of apoptosis with opposing functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 Jul 20;96(15):8499–504. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411904>
 127. Wang S-F, Huang K-H, Tseng W-C, Lo J-F, Li AF-Y, Fang W-L, et al. DNAJA3/Tid1 Is Required for Mitochondrial DNA Maintenance and Regulates Migration and Invasion of Human Gastric Cancer Cells. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Nov 20;12(11). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33233689>
 128. Chen Y-S, Chang C-W, Tsay Y-G, Huang L-Y, Wu Y-C, Cheng L-H, et al. HSP40 co-chaperone protein Tid1 suppresses metastasis of head and neck cancer by inhibiting Galectin-7-TCF3-MMP9 axis signaling. *Theranostics* [Internet]. 2018;8(14):3841–55. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30083263>

129. Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol* [Internet]. 1999 Jun 1;80(6):1513–7. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-80-6-1513>
130. Scheffner M, Münger K, Huibregtse JM, Howley PM. Targeted degradation of the retinoblastoma protein by human papillomavirus E7-E6 fusion proteins. *EMBO J* [Internet]. 1992 Jul;11(7):2425–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1321031>
131. Shimada M, Yamashita A, Saito M, Ichino M, Kinjo T, Mizuki N, et al. The human papillomavirus E6 protein targets apoptosis-inducing factor (AIF) for degradation. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):14195. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32848167>
132. Koriyama C, Kitajima S, Nomoto M, Sueyoshi K, Itoh T, Eizuru Y, et al. Loss of p16/CDKN2A Protein in Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma. *Oncology* [Internet]. 2004;67(1):81–7. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/80290>