

**EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR COMO
POSIBLE CO-FACTOR DE RIESGO EN CÁNCER DE CUELLO UTERINO DE
MUJERES DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA.**

Mónica Marcela Gaviria Calle

Trabajo de grado para optar por el título de Bióloga

Asesora:

Gloria Inés Sánchez Vásquez MSc, PhD

Profesora asociada, Facultad de Medicina

Coordinadora Grupo Infección y Cáncer

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
MEDELLÍN**

2013

DEDICATORIA

A mis padres, quienes me han apoyado desde el principio y gracias a ellos sigo luchando por esta historia, la cual no termina sino que es una carrera continua de superación.

A mi tutora y demás participantes del trabajo, ya que brindaron su conocimiento, apoyo y guía durante este largo camino.

A mis profesores del Instituto de Biología, porque cada uno en un momento dado aportó su conocimiento tanto académico como personal y me ayudó a tomar decisiones para llegar hasta aquí y continuar en el camino.

A mis amigos, compañeros que con su apoyo, afecto fueron un soporte importante.

TABLA DE CONTENIDO.

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	5
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.	6
Hipótesis.....	6
Objetivos generales y específicos.	6
Objetivo General.....	6
Objetivos Específicos.	6
MARCO TEÓRICO.....	7
Impacto de carga del cáncer de cuello uterino.	7
Virus de Papiloma humano.	8
Virus de Epstein-Barr.....	10
Clasificación taxonómica.	10
Epidemiología.....	11
Estructura del genoma	12
Estructura del virión.	13
Mecanismo de infección, transmisión y patogénesis.....	14
Evidencias del papel de VEB en otros cáncercánceres	15
Evidencias que muestran relación entre VEB, VPH y Cáncer de cuello uterino	16
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Diseño y población del estudio	18

Tamaño de muestra	18
Muestras	19
Extracción de ADN	20
Genotipificación del VPH.	21
Identificación del virus Epstein-Barr	21
Análisis estadísticos	22
RESULTADOS.....	23
Características socio-demográficas de la población estudiada.	23
Riesgo de cáncer de cuello uterino asociado a la infección concomitante con VEB y VPH....	25
Concordancia entre la infección por el VEB y la infección por VPH.....	25
Razones de odds (OR) ajustadas del riesgo de cáncer cervical asociado a infección por VEB.	26
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	35
CONFLICTOS DE INTERÉS	35
AGRADECIMIENTOS	35
Contribución del personal del laboratorio.....	36
TABLAS Y FIGURAS	38
Tabla 1. Análisis bivariado y multivariado de riesgo de cáncer de Cuello uterino asociado a VPH, VEB y otros factores de riesgo en mujeres del departamento de Antioquia, 2007-2010	39
Tabla 2. Riesgo de cáncer de cuello uterino asociado a la co-infección de virus del papiloma humano y virus de Epstein-Barr en mujeres del departamento de Antioquia, 2007-2010.....	42
Tabla 3. Análisis de concordancia entre Infección por el virus de Epstein-Barr y el virus de papiloma humano en mujeres sanas del departamento de Antioquia, 2007-2010.	43

Tabla 4. Análisis de concordancia entre Infección por el virus de Epstein-Barr y el virus de papiloma humano en casos de mujeres del departamento de Antioquia, 2007-2010.	44
Tabla 5. Razones de odds (OR) ajustadas del riesgo de cáncer de cuello uterino asociado a infección por virus de Epstein-Barr en mujeres del departamento de Antioquia.....	45
Figura 1. PCR para el VEB con controles internos de la prueba, m: marcador, c1-2 casos, c3-4-7 controles internos.	47
REFERENCIAS.....	48

RESUMEN

El virus de Epstein-Barr (VEB) ha sido detectado en biopsias de cáncer de cuello uterino (CaCu). Se desconoce si éste virus está asociado al riesgo de este cáncer. Objetivo: Evaluar si existe asociación entre la infección con el VEB y el riesgo de CaCu. Materiales y Métodos: Inclusión de 96 mujeres con diagnóstico de CaCu y 186 mujeres con citología normal o lesiones intraepiteliales de bajo grado, emparejados a los casos por edad y lugar de nacimiento. Información de factores de riesgo (edad primera relación sexual, número de parejas sexuales, número de hijos, uso de anticonceptivos orales, consumo de cigarrillo y uso de condón) fue recolectada mediante cuestionario. El virus del Papiloma Humano (VPH) se detectó con PCR GP5+/GP6+ e hibridación reversa y VEB por PCR de un segmento del fragmento BamHI W que contiene parte del antígeno nuclear 2 de VEB (EBNA 2, del inglés, Epstein-Barr nuclear antigen 2). La asociación entre el virus y el cáncer se evaluó por razones de Odds (ORs) e intervalos de confianza (IC 95%), los cuales se estimaron por regresión logística, sin ajustar y ajustando con los factores de riesgo mencionados. Correlación entre VEB e infección por VPH fue evaluada por porcentaje de acuerdo y kappa de Cohen. Resultados: Se observó incremento del riesgo de CaCu asociado a VPH (OR: 131,0; IC95% 47.7-360) y VEB (OR: 6.1; IC95%: 2.8-13.1). Este último disminuyó y perdió significancia al ajustar por variables de riesgo. Las variables que tuvieron mayor efecto sobre esta asociación fueron aquellas asociadas a una conducta sexual de riesgo para infecciones de transmisión sexual tales como número de parejas sexuales durante la vida, edad de inicio de las relaciones sexuales e infección por VPH (OR:1,08; IC:95%: 0,11-10,51) . El riesgo de CaCu permaneció significativamente alto al evaluar infección simultanea de VPH y VEB, aun después de ajustar por el resto de factores de riesgo (OR: 34,5;

IC95%: 4.0-298.4) pero fue menor que cuando se evalúa solamente el VPH. Se observó un acuerdo del 84.4% (IC95%:60.6-71.6) de infección de VPH y VEB en controles, pero la concordancia fue baja (Kappa = 0.0); en casos solo se presentó un acuerdo de 31,2% con una concordancia baja (Kappa = 0.005). **Discusión y Conclusión:** El virus Epstein-Barr se asocia con cáncer de cuello uterino. Sin embargo esta relación puede ser debida a otras razones asociadas a la infección del VPH y cáncercáncer de cérvix. Los resultados no confirman un papel etiológico directo del VEB en el desarrollo del cáncer de cuello uterino. Su papel como posible co-factor necesita más evaluación.

Palabras claves: Virus de Epstein-Barr, cáncer de cuello uterino, virus del papiloma humano.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino es el tercer cáncer más común en mujeres alrededor del mundo, con un estimado en el 2008 de 529.000 nuevos casos y 275.000 muertes por esta causa en el mundo.

El 85% de los casos y 88% de las muertes ocurren en países en vía de desarrollo (Ferlay et al, 2010a). En Colombia, las tasas de mortalidad de cáncer de seno y el cáncer de cuello uterino son similares y ocupan la primera causa de muerte por cáncer entre las mujeres (Ferlay et al, 2010b).

La evaluación de los programas muestran que la calidad de la prueba de tamización como también el bajo acceso de mujeres con pruebas positivas al diagnóstico definitivo y tratamiento, son las razones por las que se mantiene esta situación especialmente en regiones de bajo desarrollo económico y social (Cendales et al, 2010). La asociación de causalidad entre el cáncer de cuello uterino y la infección por virus del papiloma humano (VPH) ha sido establecida anteriormente por la presencia de ADN de VPH en el 99.7% de los tumores, por evidencia molecular y epidemiológica (Bosch et al, 2002; Bosch et al, 1995; Walboomers et al, 1999a).

A pesar de que el VPH es el factor necesario para el desarrollo de CaCu, existen otros cofactores que modulan el riesgo de este cáncer en mujeres VPH+. Factores tales como la paridad (Muñoz et al, 2002), el uso de anticonceptivos orales (Moreno et al, 2002), el tabaquismo (Castellsague & Munoz, 2003; Munoz et al, 2006; Szarewski et al, 1996), la inmunosupresión—particularmente la relacionada con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la infección por otras enfermedades de transmisión sexual (Smith et al, 2002a; Smith et al, 2002b) incrementan la probabilidad de infección VPH persistentes y el riesgo de cáncer.

Por otro lado, el virus de Epstein-Barr (VEB) perteneciente a la subfamilia Gamma-Herpesviridae, el cual se encuentra en el 90% de la población, ha sido clasificado como un

carcinógeno tipo I por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC., 2012), debido a la cada vez más fuerte asociación con linfoma de Burkitt (de-Thé et al, 1978), linfoma de células B, carcinoma nasofaríngeo, y cáncer gástrico (Corvalan et al, 2001; Kieff & Rickinson, 2007). Éste virus continua siendo investigado como posible co-factor en el desarrollo de otros tipos de cáncer (Hippocrate et al, 2011), incluyendo el cáncer de cuello uterino (Taylor et al, 1994).

La infección de VPH es muy común y se adquiere concomitante con el inicio de las relaciones sexuales. Sin embargo el 90% de estas infecciones se eliminan espontáneamente sin dejar ninguna secuela clínica. En la proporción de mujeres que no se elimina el virus se instaura una infección persistente la cual es indicativo de alto riesgo de cáncer de cuello uterino (IARC, 2007). Por tanto en la frontera actual del conocimiento existe el interés de entender que co-factores y mecanismos se relacionan con la persistencia del VPH. En este sentido, la búsqueda de una posible relación entre VEB y cáncer de cuello uterino permitiría establecer si esta infección puede modular el riesgo de cáncer de cuello uterino en las mujeres VPH (+). El propósito de este trabajo es establecer si existe asociación entre VEB y Cáncer de cuello uterino y establecer su papel como potencial co-factor de la infección del VPH en el desarrollo de este cáncer

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

A pesar de que se tiene evidencia que hay excreción del VEB en exudados cervicales (Silver et al, 2011), la relación entre el VEB y el desarrollo de cáncer de cuello uterino ha sido poco estudiada. Taylor y colaboradores (Taylor et al, 1994) realizaron un estudio que incluyó 327 mujeres sin anormalidades citológicas y 92 con anormalidades citológicas, de los cuales se encontró que el 40% y 36% respectivamente eran positivas para VEB, por ello concluyeron que es posible que éste virus haga parte de una infección multi-viral. Por otra parte, Voog y colaboradores (1995) en un estudio que incluyó 91 mujeres, reportan la presencia de ADN del VEB en el 38% y co-infección con VPH del 15% concluyendo que la presencia de VEB no está correlacionada con la infección con VPH (Voog et al, 1995). Mientras que un estudio más reciente que incluyó 60 mujeres con diferente diagnóstico de lesiones pre-neoplásicas: 27 con LIEBG (lesiones intraepiteliales de bajo grado), 10 con LIEAG (lesiones intraepiteliales de alto grado) y 23 con carcinoma cervical se observó que la frecuencia del VEB incrementa en siete veces el riesgo de encontrar VPH integrado al genoma del hospedero. Por tanto concluyen que el VEB puede estar involucrado en dicha integración y por consiguiente contribuir al desarrollo de cáncer cervical (Szostek et al, 2009). Sin embargo a la fecha no se ha llevado a cabo un estudio de casos y controles con el fin de estimar el riesgo asociado a la infección del VEB.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

Hipótesis

El virus del VEB es un co-factor en el desarrollo de cáncer de cuello uterino.

Objetivos generales y específicos.

Objetivo General.

Explorar la posible asociación entre la presencia del ADN del VEB con riesgo de cáncer de cuello uterino.

Objetivos Específicos.

- Estimar el riesgo de cáncer de cuello uterino asociado a la presencia del virus Epstein-Barr.
- Estimar el riesgo de cáncer de cuello uterino debido a la co-infección entre el virus de Epstein-Barr y el virus del papiloma humano.
- Describir los factores de riesgo de cáncer de cuello uterino asociado a la infección con VEB.

MARCO TEÓRICO

Impacto de carga del cáncer de cuello uterino.

En América Latina y el Caribe, el cáncer es la segunda causa de muerte crónica luego de las enfermedades cardiovasculares representando un problema de salud pública, del cual Colombia no se encuentra aislada (Le Gales-Camus et al, 2005).

Entre los diferentes tipos de cáncer, el cáncer de cuello uterino (CaCu) es la tercera causa de muerte a nivel mundial en mujeres y el segundo para América Latina y el Caribe, después del cáncer de seno (Ferlay et al, 2010a). Para el año 2008 se estimaron 530.000 casos nuevos alrededor del mundo, de los cuales más del 85% ocurren en países en desarrollo. Sur América presenta altas tasas de incidencia (23 casos nuevos por 100.000 habitantes) en comparación con otras regiones. Además este cáncer es reportado como responsable de 275.000 muertes alrededor del mundo para el 2008, representado en un 88% en países en vía de desarrollo, distribuida así: 53.000 en África, 31.400 en América Latina y el Caribe y 159.800 en Asia (Ferlay et al, 2010b). Aunque las tasas de incidencia y mortalidad de cáncer de cuello uterino han disminuido en las últimas dos décadas a nivel mundial, en Colombia continua siendo un problema de salud pública especialmente en las áreas de bajo desarrollo. En el 2008, las tasas de incidencia y mortalidad en Colombia fueron del 21.5 y 10.0 por 100.000 mujeres respectivamente (Ferlay et al, 2010b); sin embargo el panorama regional es diferente. Mientras que las tasas de mortalidad por cáncer de cuello uterino presentaron una significativa tendencia a la disminución en Medellín, pasando de 8.5 por 100 000 mujeres para el año 2000 a 6.3 por 100.000 mujeres para el 2007, en las subregiones del departamento de Antioquia las tasas fueron constantes en este periodo de tiempo

y tres veces más altas en las subregiones del bajo Cauca (21.8, IC95%17.8-25.8), Magdalena Medio (21.3, IC95%16-26.6) y Urabá (19, IC95%16.2-21,8) (Baena et al, 2011).

Una asociación de causalidad molecular y epidemiológica entre el cáncer de cuello uterino y la infección por virus del papiloma humano (VPH) ha sido previamente establecida. De igual manera se ha detectado la presencia de ADN de VPH en el 99.7% de los tumores (Bosch et al, 2002; Bosch et al, 1995; Walboomers et al, 1999a)

Virus de Papiloma humano.

El Virus del Papiloma Humano es el agente necesario más no suficiente para el desarrollo de cáncer de cuello uterino (Bosch et al, 2002; Walboomers et al, 1999a). El VPH es un virus pequeño de ADN de doble cadena, con aproximadamente un genoma de 8000 pares de bases (pb), organizado en diez marcos de lectura abierta (ORF), ocho tempranos (E1-E8), dos tardíos (L1 y L2) y una región de control de transcripción (LCR) (Scheurer et al, 2005). La cápside icosaédrica sin envoltura, está compuesta por 72 capsómeros conformados por la proteína mayor (L1) y la proteína menor (L2). Este es un virus epiteliotrópico, ya que presenta capacidad replicativa en núcleos de células escamosas epiteliales, por lo cual exhibe capacidad de infectar varios tejidos epiteliales, incluyendo la epidermis, revestimiento epitelial de las vías respiratorias y el tracto genital (Kieff & Rickinson, 2007).

Entre los 200 tipos de VPH descubiertos hasta la fecha, clasificados de acuerdo a la secuencia del gen que codifica para la proteína mayor de la cápside L1, aproximadamente 30-40 genotipos están relacionados con infecciones anogenitales. Éstos se subdividen en dos grupos, alto riesgo involucrado en la progresión de cáncer en el cuello uterino y de bajo riesgo relacionados con la aparición de verrugas anogenitales (Stanley, 2010). Entre los VPH de alto riesgo, VPH 16 se

detecta en un 50 a 70 % de los casos de cáncer de cuello uterino, seguido por VPH 18 encontrado en un 7-20% seguido de VPH 31, 33, 35, 45 entre otros (Bosch et al, 2002; Bosch et al, 1995; Swan et al, 1999). El mecanismo de acción del virus sobre el hospedero ha sido extensamente estudiado, y se ha encontrado que para la progresión a cáncer se incrementa la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, (Howley & Lowy, 2007); las cuales se unen al producto del gen supresor de tumor p53 y a la proteína retinoblastoma, respectivamente. La proteína E6 está implicada en la degradación de p53 (Werness et al, 1990) y la proteína E7 al unirse e inhibir la acción antiproliferativa de la proteína de retinoblastoma faculta la progresión al ciclo celular (Howley & Lowy, 2007).

El VPH ha sido reportado como la causa necesaria para el desarrollo de cáncer de cuello uterino (Bosch et al, 1995; Walboomers et al, 1999a) y sus lesiones precursoras (Howley & Lowy, 2007; Munoz et al, 2003; Munoz et al, 2006).

Se debe tener en cuenta que el VPH es transmitido sexualmente, y la población en alguna etapa de su vida puede contraer el virus con un riesgo del 50-80%. Los estudios de historia natural han mostrado que en el 90% de las mujeres se elimina la infección entre 12 a 18 meses después (IARC, 2007). Además se presenta mayor prevalencia en mujeres entre los 15 a 25 años, (25-40%) y ésta decrece con la edad, probablemente por la disminución de exposición a la infección y resistencia a la misma (Baseman & Koutsky, 2005).

Adicional a VPH, se encuentran otros co-factores que intervienen en el desarrollo de CaCu, como el tipo de VPH, duración de la infección, edad del paciente, mutaciones en el genoma del hospedero o la relación a co-factores como el consumo de cigarrillo (Castle et al, 2002; Szarewski et al, 1996), la paridad(Muñoz et al, 2002), el uso de anticonceptivos orales (Brinton

et al, 1990; Moreno et al, 2002), la inmunosupresión—particularmente la relacionada con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la infección por otras enfermedades de transmisión sexual y la presencia de otros agentes patógenos como *Chlamydia trachomatis* (Smith et al, 2002a; Smith et al, 2002b; Tamim et al, 2002).

Dentro de las infecciones que pueden contribuir al desarrollo de CaCu, es decir que potencian la oncogenicidad del VPH (Szostek et al, 2009) se ha propuesto al VEB; ya que ambos virus tienen capacidad de infectar mucosas, ambos virus están relacionados con lesiones orales (Voog et al, 1995) y algunos estudios han reportado la presencia de VEB en muestras cervicales, tanto de mujeres sanas como en mujeres con lesiones de alto grado (Taylor et al, 1994).

Virus de Epstein-Barr

Clasificación taxonómica.

El virus Epstein-Barr (VEB) o Herpesvirus Humano tipo 4 (HHV-4) pertenece al género Lymphocryptovirus (LCL) dentro de la subfamilia Gammaherpesviridae que a su vez incluye el género Rhadinovirus (RDV) con representantes tales como el Herpesvirus tipo 8 asociado al sarcoma de Kaposi (VHSC), los cuales pertenecen a la familia Herpesviridae, del orden Herpesvirales. Esta familia también incluye el Herpesvirus humano 1 y 2 y el citomegalovirus (CMV) (Albà et al, 2001; IARC., 2012; Kieff & Rickinson, 2007). Los miembros de la familia Herpesviridae son virus de ADN comúnmente encontrados en animales y humanos, se caracterizan por codificar gran variedad de proteínas relacionadas con el metabolismo de ácidos nucleicos y la síntesis de ADN. El ensamblaje de la cápside siempre ocurre en el núcleo de la célula hospedera y la producción de partículas virales está acompañada por la muerte de la

célula. El virus presenta infecciones de forma latente pero también causa infecciones líticas en su hospedero

Debido a la expresión génica del virus, se han determinado dos subtipos del VEB en humanos, denominados tipo I y II (anteriormente A y B). Estos tipos se definen de acuerdo a las diferencias de los genes que codifican para algunas proteínas nucleares, como EBNA-2, 3A, 3B, 3C. Dichas proteínas presentan una variación de secuencia de aminoácidos en un porcentaje de 47%, 16%, 20% y 28% respectivamente (Kieff & Rickinson, 2007).

Epidemiología

Estudios acerca del VEB establecen que el tipo I es predominante en países occidentales y Asiáticos, especialmente países desarrollados y el tipo II es frecuentemente encontrado en África, en países en vía de desarrollo, como África Ecuatorial y Nueva Guinea (Corvalan et al, 2006; IARC., 2012). VEB produce infecciones en más del 90% de la población humana adulta; particularmente es asociado con la enfermedad del Beso (mononucleosis infecciosa), la cual se manifiesta por dolor muscular, linfadenopatía, esplenomegalia, hepatoesplenomegalia y faringitis exudativa (Kieff & Rickinson, 2007). La edad de infección primaria varía sustancialmente alrededor del mundo, y la exposición al virus es debida a factores socioeconómicos. Por ejemplo en Uganda, se estima que el 80% de la población infantil es seropositiva para VEB a la edad de un año, mientras que este estimado solo corresponde al 45% en población rural de Estados Unidos. La infección en infantes usualmente es sub-clínica o presenta síntomas que son similares a otras enfermedades respiratorias. En jóvenes la infección ocurre usualmente en países desarrollados en adolescentes, por el contacto con la saliva a través del beso (Cohen, 2006). Además, en los latinoamericanos algunos estudios reportan que la infección por el VEB puede

darse a edades más tempranas que las observadas en países industrializados donde normalmente ocurre en la adultez (González Saldaña et al, 2012). Entre los reportes encontrados para Colombia, en un estudio con individuos sanos, se encontraron anticuerpos para el VEB en un 83,5% de las muestras, confirmando que muchas personas sanas pueden tener el virus sin acarrear consecuencias en su salud (Pordeus et al, 2008).

El VEB se ha asociado a neoplasias linfoides como el linfoma de linfocitos B en pacientes inmunosuprimidos, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo (NPC) y linfoepiteliomas (IARC., 2012; Kieff & Rickinson, 2007; Thompson & Kurzrock, 2004). Actualmente se ha encontrado presente en otros cánceres como el gástrico (Corvalan et al, 2001; Takada, 2000), carcinomas glandulares mamarios (Aguayo et al, 2011; Glaser et al, 2004) y se ha discutido su posible asociación como potencial oncogénico en el tracto genital (Szostek et al, 2009; Taylor et al, 1994).

Estructura del genoma

VEB se caracteriza por presentar un genoma linear de ADN, superenrollado de doble cadena de 184 kpb que codifica por 85 o más genes. Los marcos abiertos de lectura identificados hasta la fecha son clasificados en genes de la latencia y genes líticos. Los líticos a su vez se distinguen como tempranos inmediatos, tempranos y tardíos. La mayoría de los genes líticos dan lugar a proteínas y muchos de estos presentan alta homología con genes humanos. Algunos de los genes latentes no son traducidos, entre estos los más estudiados están EBER-1 y 2 (del inglés Epstein-Barr encoded RNA). También se han identificado al menos 17 secuencias de micro-RNAs. El genoma además contiene secuencias repetidas de 0.5Kb en los extremos y una secuencia repetida interna que divide el genoma en dos segmentos. Los extremos repetidos ayudan a identificar si

las células infectadas con VEB provienen del mismo progenitor ya que cuando el virus infecta una célula, el ADN se circulariza y persiste como un genoma episomal con un número característico de secuencias repetidas similares a las del genoma parental. Sin embargo este número de repeticiones varían durante la replicación viral, pero si la infección es latente sin replicación activa del genoma, los genomas de generaciones futuras contendrán el mismo número de repeticiones (Kieff & Rickinson, 2007). Adicionalmente, se encuentran genes no codificantes de proteínas, los EBERs, los cuales son ARN no codificante que intervienen en la activación de otros genes (Clarke et al, 1990; IARC., 2012) y los BARTS los cuales son expresados en todas las formas de infección de VEB y pueden actuar sobre la expresión de otros genes (Kieff & Rickinson, 2007).

Estructura del virión.

El virión está organizado con el ADN envuelto por una proteína central en forma de toroide, una nucleocápside formada por 162 cápsomeros y una envoltura en la superficie que contiene espículas externas de glicoproteínas codificadas por el virus. Entre la nucleocápside y la envoltura presenta un tegumento proteico (Kieff & Rickinson, 2007). De las diferentes proteínas virales que expresa el virus, las mas caracterizadas son: las proteínas nucleares (EBNA, del inglés Epstein-Barr nuclear antigen), la cuales tienen funciones tales como el mantenimiento del episoma y la trans-activación de genes virales, entre ellas se resalta EBNA-1 que ha sido ampliamente investigada en las células del prototipo B95 (línea celular linfoblastoide de tití inmortalizada con un caso de mononucleosis infecciosa positiva para VEB) en las cuales se expresa cuando se presenta la infección lítica (Owen et al, 2010). Otras proteínas ampliamente estudiadas son las proteínas de membrana, (denominadas así por su expresión en la membrana de

la célula que infectan) LMP 1 (del inglés Latent Membrane Protein), y LMP-2 (Kieff & Rickinson, 2007).

Mecanismo de infección, transmisión y patogénesis

Hasta la fecha solo los humanos son los únicos huéspedes naturales reconocidos para el VEB. VEB infecta y persiste de por vida en cerca del 90% de los adultos humanos sin causar enfermedad (Cohen, 2006). El virus se transmite por vía oral y se propaga por la saliva entrando al epitelio del anillo de Waldeyer, situado en la oro-faringe donde probablemente inicia la infección lítica que lleva a la amplificación del virus. Luego infecta células B del tejido linfoide subyacente usando un programa de latencia, que incluye las proteínas EBNA-3A, 3Bb y 3C. Esto lleva a la migración de la célula B dentro del folículo para iniciar una reacción en el centro germinal y establecer el programa de transcripción (latencia II) en el cual se expresan las proteínas, EBNA 1, LMP-1, 2A y 2B, BARF0 y los RNA no transcriptos EBERs. Este programa estimula en el linfocito B una señal de supervivencia y salida del centro germinal como células B de memoria. En este momento comienza el programa de latencia 0, en donde se apaga totalmente la expresión de todas las proteínas virales en las células B de memoria en reposo, las cuales eventualmente se dividen y expresan la proteína EBNA I (latencia I). En ocasiones estas células B de memoria retornan a las amígdalas en donde se reactiva la diferenciación a células plasmáticas en las cuales se reactiva la replicación viral. Desde allí se liberan partículas virales que pueden infectar otros hospederos u otras células B (IARC., 2012; Kieff & Rickinson, 2007). Aunque se considera que el virus es linfotrópico, y ya se han reconocido los receptores en células B, se tiene evidencia que pueden infectar los linfocitos T y células epiteliales mediante receptores y mecanismos no muy bien entendidos (Chesnokova et al, 2009). Hasta la fecha se

sugiere que en las células epiteliales se lleva a cabo ciclos de replicación lítica pero hasta la fecha no se ha evidenciado infección latente en estas células.

Evidencias del papel de VEB en otros cánceres

Además de la fuerte evidencia del VEB y su relación en desordenes linfoproliferativos, linfoma de células B, linfoma de Burkitt (Kieff & Rickinson, 2007), existen estudios de inmunohistoquímica que muestran presencia del virus en tejido mamario, como el reportado por Labrecque y colaboradores (1995) al analizar 91 muestras de carcinoma de seno primario que encontró señal por hibridación in situ (HIS) para EBERs en 19 muestras que dieron positivo para VEB con buena señal en un 63% (12 muestras) de estas y débil señal en el 21% (4 muestras). A pesar de esta observación, los autores concluyen que no encuentran diferencias estadísticamente significativas de la presencia del virus entre los diferentes estadios histológicos del cáncer de seno, lo que sugiere que el papel del VEB en el desarrollo de cáncer de seno no es aun concluyente (Labrecque et al, 1995). Recientemente, un análisis inmunohistoquímico de la proteína nuclear (EBNA1) en 69 biopsias de cáncer de seno indican presencia del virus en el 35% de las muestras (24) y por tanto descartan que este virus sea simplemente un pasajero silencioso (Preciado et al, 2005). Por otro lado, Khan y colaboradores analizaron 219 cortes de muestras de cáncer de seno por HIS y encontraron que el 19% presentaban positividad pero solo en los linfocitos infiltrantes. Por ello concluyen la inexistencia de un papel etiológico del VEB con el cáncer de seno (Khan et al, 2011). En 1992 se estudiaron 138 muestras de adenocarcinoma gástrico en el cual el virus fue detectado en el 16% (22/138), y en ninguno de los 37 controles, por tanto los autores concluyen que existe una asociación significativa del VEB con este cáncer ($p=0,009$).¹ Aunque el estudio muestra la presencia del VEB y su posible

importancia en el diagnóstico y manejo terapéutico sobre todo en las lesiones de tipo difuso, son necesarios otros estudios para aclarar el papel de este virus en este cáncer (Shibata & Weiss, 1992). Corvalan y colaboradores (2001) analizaron 185 muestras de cáncer gástrico y encontraron 16,8% (31/185) muestras positivas para VEB por HIS y resumen, que han hallado altas frecuencias de VEB asociado a cáncer gástrico y con patrones únicos de expresión de la histología del tumor, especialmente del tipo difuso, por tanto se hace necesario más estudios para confirmar estos hallazgos (Corvalan et al, 2001).

Evidencias que muestran relación entre VEB, VPH y Cáncer de cuello uterino

Hasta la fecha se ha reportado varios estudios que han detectado ADN de VEB en cáncer de cuello uterino. En 1994 Taylor describió la presencia de VEB mediante la detección de ADN del virus en el 42% (98/235) de mujeres con citología cervical normal y 36% (33/92) en mujeres con anomalías en la citología. El autor sugirió la posibilidad de una acción sinérgica de ambos virus (VPH y VEB), sin embargo en este estudio no se llevó a cabo detección del VPH, (Taylor et al, 1994). En el 2000 Enbom y cols analizaron muestras de raspado cervical y suero de 112 mujeres atendidas en una clínica para enfermedades venéreas, de las cuales 98% (110/112) fueron seropositivas, es decir, se encontró presencia de anticuerpos para el antígeno viral de la cápside de VEB (VCA) y de estas mujeres solo el 8.9% (10/112) tuvieron resultados positivos para ADN del VEB en la PCR en muestras de exudado cervical (Enbom M et al, 2001).

En el 2009, treinta casos de adenocarcinoma cervical fueron evaluados por PCR para el ADN del VEB y VPH. El VEB se detectó en un 10% (tres) de los casos mientras que VPH 16, y 18 fueron detectados en el 33,3% (10/30) y 40% (12/30) de los casos. Solo uno de los casos presentó co-infecciones entre VEB y VPH. Los autores sugieren que estos resultados no

soportan un papel de VEB o alguna relación entre la infección de VPH y VEB en adenocarcinoma cervical (Lau et al, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y población del estudio

Se realizó un estudio de casos y controles en una proporción 1:2, es decir dos controles por cada caso emparejando los controles teniendo en cuenta la distribución de la edad de los casos. Los casos fueron mujeres diagnosticadas mediante biopsia tomada por colposcopia, con neoplasia intraepitelial cervical de grado tres (NIC3) o carcinoma escamocelular invasivo (CEC). Los controles fueron mujeres con resultado de citología normal o lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG) que atendieron a la toma de muestra de citología en sitios cercanos o en los mismos sitios donde fueron reclutados los casos. Mujeres con incapacidad mental, en embarazo, VIH+, con conización u otro tratamiento previo para cáncer de cuello uterino (radio o quimioterapia) o histerectomía radical, no se consideraron elegibles. Todas las mujeres que accedieron a participar en el estudio eran mayores de 18 años y firmaron el consentimiento informado para ingreso al estudio y uso de las muestras en estudios que relacionaban agentes infecciosos con cáncer de cérvix. Todas contestaron una encuesta sobre datos sociodemográficos, comportamiento sexual y reproductivo, y uso de cigarrillo. El estudio fue aprobado por los Comités de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia y de la Sede de Investigación Universitaria.

Tamaño de muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se estimó mediante el programa EpiDaTa para un estudio de casos y controles teniendo en cuenta una prevalencia de la exposición (infección por VEB) en casos del 68% (Prayitno, 2006), y 15% en los controles (Datos preliminares obtenidos por la

estudiante del proyecto). Con un nivel de confianza del 95% y una potencia del 80%, se estimó un total de 49 casos y 49 controles. Teniendo en cuenta que se planea estimar el riesgo asociado a la co-infección de VEB y VPH, también se hizo la estimación con una prevalencia de la exposición del 30% en los casos, ya que todo son VPH+ y 8% que es la frecuencia de la co-infección de VEB y VPH observada en datos preliminares en el estudio en mención. Para este fin se estimó un tamaño de muestra de 74 casos y 74 controles con el mismo nivel de confianza y la misma potencia.

Muestras

Las muestras de los casos correspondían a biopsias frescas y/o tejidos FFIP (tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina), mientras que las muestras de los controles eran cepillados cervicales. Las biopsias fueron obtenidas por los ginecólogos al momento de la cirugía, el cual daba inicio del ingreso al estudio y transportadas al laboratorio en 5 ml de medio RPMI-1640. En el laboratorio, las biopsias fueron lavadas con PBS, pesadas y congeladas a -30 °C, para posterior extracción de ADN. En algunos casos que no se logró obtener la biopsia (un caso), los tejidos FFIP fueron obtenidos de los archivos y registros del Departamento de Patología del Hospital de San Vicente de Paúl. Las muestras se obtuvieron de diferentes clínicas: laboratorios de patología de la Clínica Las Américas (8 casos), Clínica Vida (2 casos), Clínica Medellín (1 caso), la Congregación Mariana (1 caso), Hospital la María (1 caso), Hospital Marco Fidel Suárez (HMFS) (1 caso), IPS universitaria (2 casos) y HUSVP (80 casos) para un total de 96 casos. Los cepillados cervicales de los controles fueron recolectados en los servicios de citología de la institución prestadora de servicios de salud (IPS) Dinámica y de la IPS Universidad de Antioquia (Laboratorio de la Escuela de Microbiología). Los cepillados cervicales obtenidos

después de la preparación del Papanicolaou fueron almacenados en un tubo con medio de transporte en PBS. Después de dar vortex y centrifugar y lavar la muestra con PBS, el pellet de células se congeló a -20 °C.

Extracción de ADN

El ADN de las biopsias se aisló utilizando el Kit de purificación de ADN genómico Wizard[®] (Promega, Madison, USA), el cual mediante lisis celular, y precipitación de proteínas facilita la purificación del ADN de cada muestra.

Previo a la extracción del ADN de los tejidos FFIP, se confirmó la presencia del tumor. Para ello, de cada bloque de parafina se hicieron cinco nuevos cortes histológicos, donde el primero y el último fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H & E). El análisis microscópico de las placas teñidas con H & E fue realizado por un patólogo experto, quien confirmó la calidad de la muestra y el diagnóstico, y evaluó el tipo histológico. Los cortes internos fueron utilizados para marcación, disección de la lesión y obtención del ADN, siguiendo los procedimientos previamente descritos (Gornick et al, 2010).

A partir del cepillado cervical se obtuvo extracto crudo mediante el tratamiento de las células con una solución de proteinasa K (10mg/ml proteinasa K en en TRIS 50mM, pH= 8,3) del cual se usaron 10 ul para determinación de la presencia del ADN de VEB y VPH (Gornick et al, 2010). La calidad del ADN se verificó mediante amplificación de un segmento de 209 bp del gen de la β -globina con los cebadores BGPCO-3 (5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'; sentido) y BGPCO-5 (5'-GAAACCCAAGAGTCTTCTCT-3'; antisentido). Los segmentos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%.

Genotipificación del VPH.

La genotipificación del VPH se llevó a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con los cebadores Gp5+/Gp6+ los cuales amplifican un segmento de 150 pb de una región conservada del gen L1 e identificación de los genotipos mediante la hibridación reversa de este segmento con sondas específicas que tienen la capacidad de identificar 37 genotipos anogenitales, incluyendo todos los de alto riesgo. (van den Brule et al, 2002).

Identificación del virus Epstein-Barr

El ADN del VEB, se detectó mediante una PCR, que amplifica una secuencia repetida del fragmento BamH1 W, del prototipo B 95-8 (línea celular linfoblastoide de tití inmortalizada con un caso de mononucleosis infecciosa positiva para VEB) cuyos primers han sido referenciados por Voog y colaboradores (1995) (Voog et al, 1995). Las secuencias de los primers son: (forward primer) 5'GGT ATC GGG CCA GAG GTA AGT 3' y REv (reverse primer) 5'GCT GGA CGA GGA CCC TTC TAC-3' y estos fueron donados por el doctor Michael Hagensee, profesor del departamento de Medicina y Microbiología de la escuela de medicina de Louisiana State University en Nueva Orleans, USA. Estos amplifican un segmento de 192 pb del gen EBNA-2. Para ello el ADN se amplificó de 5 µL de muestra en una reacción total de 50µL, la cual contenía 5 µL del Buffer de PCR II 10x, 3 µL de MgCl₂ a una concentración de 25mM, 2 µL de dNTPs a una concentración de 5mM, 3 µL de cada uno de los primer a una concentración de 12.5 pmoles/µL, 0,5 ul de la enzima Taq polimerasa (Applied Biosystems). La PCR se realizó con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 45 segundos, 66°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto. Finalmente se realizó un ciclo de elongación de 7 minutos a 72°C y se conservó la muestra a 4°C a 15°. La PCR para

VEB, incluyó controles internos (tres positivos con diferente contenido de ADN viral, 10ng, 1ng, 0.1 ng (gentilmente donado por el doctor Michael Hagensee), control de un caso negativo conocido y control de la reacción sin muestra). Posteriormente se realizó una electroforesis de los productos amplificados en un gel de agarosa al 2% para confirmar presencia del segmento de 192 pb del VEB.

Análisis estadísticos

Modelos de regresión logística no condicional, ajustados y sin ajustar, fueron usados para valorar el riesgo de cáncer de cuello uterino asociado a la infección con VEB mediante razones de odds y sus respectivos intervalos de confianza. También se llevaron a cabo análisis estratificados, para descartar que las variables de estudio estuvieran influenciadas por el valor de otra variable. Finalmente, se hizo un análisis ajustando por subgrupos de variables que modificaron el efecto en el anterior análisis. La concordancia entre la infección VEB y VPH fue evaluada mediante el cálculo del índice Kappa de Cohen y el porcentaje de concordancia. En todos los análisis se empleó un nivel de significancia de 0.05. Los resultados se generaron usando el paquete estadístico R (R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, (URL <http://www.R-project.org/>)

RESULTADOS

Características socio-demográficas de la población estudiada.

219 potenciales casos fueron consecutivamente identificados entre mayo de 2007 y junio de 2010. Ciento ocho casos (52.5%) fueron identificados en la fundación hospitalaria San Vicente de Paúl, 71 (34%) en el Instituto de Cancerología (Clínica las Américas), 8 (3.8%) en la congregación Mariana, 7 (3.4%) en el HMFS, y 12 (5.8%) en la Clínica Vida, Hospital la María y en el laboratorio de patología del Dr. Suescún (servicio de pensionados de la fundación hospitalaria San Vicente de Paúl). No se tuvo información sobre el centro de recolección de uno de los casos.

42 (19.3%) potenciales casos fueron excluidos del estudio. De estos, 20 tenían un diagnóstico diferente a Neoplasia Intraepitelial Cervical 3 (carcinoma in situ) o más severo (carcinoma escamocelular), 14 no tenían la información del diagnóstico histopatológico, 4 habían recibido tratamiento previo para cáncer cervical, 2 estaban en embarazo, uno no estaba en capacidad para decidir participar en el estudio y en otro caso, los criterios de elegibilidad no pudieron ser diligenciados. De los 177 (80.8%) casos restantes, se incluyeron los primeros 145 casos que cumplieron con los criterios de inclusión. De estos 145, 101 tenían diagnóstico de cáncer escamocelular invasivo y 45 de NIC-3. Por ser el desenlace final de cáncer de cuello uterino, para este trabajo, se escogieron aleatoriamente, 96 casos de carcinoma escamo celular invasivo que fueron emparejados por edad en una proporción de 2:1 con 186 controles. La tabla 1 muestra que el 84.9% de los controles fueron de Dinámica IPS y el resto de la IPS Universidad de Antioquia. Alrededor del 50% fueron mujeres menores 54 años, el 50% habían iniciado relaciones sexuales de 20 o más años y el 68% habían tenido 2 o menos parejas sexuales durante

toda la vida y el 84% nunca habían usado condón. La tabla 1 muestra el análisis bivariado ajustado por edad y el análisis multivariado ajustado por todas las variables incluidas en el estudio. Se observa que la mayoría de los casos fueron mayores 35 años, los cuales fueron emparejados apropiadamente con controles sanos sin cáncer de cuello uterino ($p = 0.917$). Se observa además que hay un incremento del riesgo de cáncer de cuello uterino asociado a la infección con VPH (OR: 131; IC95% 47.7-360) y con el Epstein-Barr (OR: 6.1; IC95% 2.8-13.1). Como se ha observado en otros estudios, hay una asociación estadísticamente significativa con la edad de inicio de las relaciones sexuales y el cáncer de cérvix. Esta misma relación se observa con el número de parejas sexuales durante toda la vida. Comparado con mujeres que inician las relaciones sexuales a los 20 o más años, las mujeres que inician entre 16-19 años (OR: 6.3; IC95% 2.7-14.5) o cuando son menores de 15 años (OR: 14.4; IC95%: 5.3-38.9) tienen mayor riesgo de cáncer de cuello uterino. Comparadas con las mujeres que solo han tenido una pareja sexual durante toda su vida, las mujeres que tienen 3 (OR: 3.6; 95%IC: 1.5-8.6) o más de 4 (OR: 4.0; 95%IC: 1.8-9.2) parejas tienen un incremento de hasta 4 veces en el riesgo de cáncer de cuello uterino. Adicionalmente se observa que como en otros estudios el embarazo y uso del cigarrillo también incrementan significativamente dicho riesgo. Contrariamente a lo ya descrito, en este estudio se observó una disminución del riesgo con el uso de los anticonceptivos orales.

Al analizar la infección por el virus de Epstein-Barr, se observa que el 27,1% de los casos fueron positivos mientras que solo el 5,9% de los controles presentaron esta infección. Por tanto la infección del VEB se asoció con un incremento de 6,1 veces en la probabilidad del riesgo de cáncer de cuello uterino (OR: 6,1; 95% IC: 2,8-13,1; $p < 0,001$). En el análisis multivariado el cual incluyó todas las variables que mostraron alguna asociación en el análisis bivariado, muestra

que la infección por el VPH (OR:141,2 95%IC:35.7-557.9), la inicio de las relaciones sexuales antes de los 15 años (OR:10.8 95%IC:1.6-72) y haber estado en embarazo (OR:22.1 95%IC:1.6-302) permanecen con una asociación estadísticamente significativa con el riesgo de cáncer de cuello uterino. Sin embargo no se conservó una asociación estadísticamente significativa del riesgo para cáncer de cérvix; para el resto de variables, aunque se sigue observando un incremento del riesgo con la infección con VEB, la cual es marginalmente estadísticamente significativa (OR: 3.4; 95%IC: 0,6-19.3; $P < 0.001$).

Riesgo de cáncer de cuello uterino asociado a la infección concomitante con VEB y VPH.

Cuando se observan los resultados para la co-infección (Tabla 2) de los virus, se encuentra que de los 96 casos analizados, 24 (25,0%) casos son positivos para ambos el VPH y el VEB; mientras que en los controles solo se observó 1 (0,5%) caso con esta co-infección. Al realizar el análisis bivariado asociado a la co-infección, (ajustando solo por edad) se mantiene el riesgo del cáncer de cuello uterino (OR: 69.9; IC 95%: 9.2-532.7 $p < 0.0$). Similarmente, al ajustar por todas las variables (excepto uso de condón), el riesgo se mantiene aunque disminuye respecto al OR obtenido cuando se ajusta solo por edad (OR: 34.5; IC95%: 4.0- 298.4 $p < 0,001$).

Concordancia entre la infección por el VEB y la infección por VPH.

La concordancia de infección de VEB y VPH en controles es del 84.4%, el cual probablemente atribuido al gran porcentaje de individuos negativos para ambos virus. Sin embargo el Kappa es muy pobre (Kappa = 0.0) (ver tabla 3). Esto es debido a que solo 1 de los 186 (0.53%) controles fue positivo para ambos virus. En casos, solo el 31.2% de las mujeres infectadas con VEB

también lo estaban con VPH, y según el coeficiente de Kappa de Cohen, esta concordancia es también pobre (Kappa = 0.005) (ver tabla 4).

Razones de odds (OR) ajustadas del riesgo de cáncer cervical asociado a infección por VEB.

Como se observó en la tabla 1, el riesgo de cáncer de cérvix asociado a VEB es estadísticamente significativo en el análisis crudo, pero este se pierde completamente cuando se hace ajuste por todas las variables que dieron asociación en el análisis bivariado. Por tanto se realizó un análisis adicional para definir las variables responsables de este efecto (Tabla 5). En este análisis se muestra los ORs y sus respectivos intervalos de confianza del análisis bivariado crudo y ajustado por cada una de las variables o grupos de variables indicadores de conducta sexual de riesgo (Edad de inicio de relaciones sexuales, número de parejas sexuales o infección con VPH, uso de condón) y de co-factores para los cuales se ha reconocido una relación con cáncer de cérvix. En la tabla 5 se observa que el riesgo de cáncer cervical relacionado con el VEB se mantuvo (OR:5,91;IC95%:2,77-12,60) cuando en el modelo se ajustó individualmente por cada una de las variables pero se observa que cuando se incluyen las variables de conducta sexual tales como infección por VPH, Edad de inicio de las relaciones sexuales, número de parejas sexuales durante la vida y uso de condón en el modelo de regresión, el ajuste tiene un gran efecto sobre la magnitud de esta asociación aunque no pierde su significancia estadística. (Sin embargo en el modelo multivariado, que incluye todas las variables de conducta sexual, incluido el VPH, la asociación no solo disminuye a 1.08 sino que además el IC95% pierden significancia (0.11-10.51). Inclusive, aunque persiste un incremento del riesgo de cáncer de cérvix asociado a la infección con VEB cuando se eliminan del modelo variables de difícil medición tales como el

uso del condón, la asociación no es estadísticamente significativa (OR:3,37 IC95% 0,72 - 15,64). Es claro que la edad, la cual es una variable que influye en la prevalencia del VPH, también se asocia con el incremento del riesgo de cáncer de cérvix asociado al VEB. De hecho en análisis estratificados se observó que mujeres de 35-44 (OR: 14,2 IC95% 3,64-55,44) y 55-64 (OR: 15,0, IC95% 1,54-146) tienen mayor de riesgo de cáncer de cérvix asociado al VEB (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

El cáncer de cuello uterino sigue siendo una enfermedad de interés en salud pública, ya que corresponde a la tercer causa de muerte por cáncer a nivel mundial en mujeres (Ferlay et al, 2010b). La frontera actual del conocimiento de la prevención de esta enfermedad se enfoca en la implementación de vacunas profilácticas que tienen un potencial de reducir en un futuro lejano, un 60% los casos de cáncer de cérvix, cuando alcancen la edad adulta las niñas que se están vacunando actualmente. El segundo aspecto importante de la prevención se enfoca en la identificación de factores o biomarcadores que identifiquen con mayor precisión aquellas mujeres en riesgo de desarrollar un cáncer entre las VPH+. Se conoce que el VPH es un factor necesario más no suficiente para el desarrollo de la enfermedad (Bosch et al, 2002; Munoz et al, 1992; Walboomers et al, 1999b). Durante mucho tiempo se ha observado que otros agentes infecciosos están relacionados con un aumento en la probabilidad del desarrollo del cáncer de cérvix. Entre las infecciones de transmisión sexual que han sido objeto de muchos estudios esta el virus Herpes Simplex y la bacteria *Chlamydia Trachomatis*. Al igual que con estos dos agentes infecciosos, el papel del virus de Epstein-Barr ha permanecido controversial, ya que algunos autores lo relacionan con tener un papel en el desarrollo de cáncer de cuello uterino (Prayitno, 2006; Taylor et al, 1994); mientras otros autores no encuentran ninguna relación entre este virus y el desarrollo de CaCu (O'Leary et al, 1997). En el presente trabajo, se exploró mediante un estudio de casos y controles si el VEB presenta algún papel en el posible desarrollo de cáncer de cuello uterino, y para ello se analizó con diferentes variables, cómo edad de inicio de las relaciones sexuales, número de parejas sexuales, uso de anticonceptivos orales (pasado-presente), uso de condón, embarazo y consumo de cigarrillo.

De las diferentes variables socio-demográficas analizadas se encontró que el inicio de las relaciones sexuales confiere algún riesgo y esto se explica a la exposición temprana para que la mujer sea infectada por el VPH, lo cual ha sido reportado en estudios anteriores (Winer et al, 2008; Winer et al, 2003) . En el caso del uso del condón, los presentes resultados no muestran un valor estadísticamente significativo que indique que este aumenta el riesgo o protege del mismo. Al revisar otros estudios se encuentra que no existe evidencia contundente de que el uso de condón reduzca el riesgo a ser VPH positivo; sin embargo se encuentra que reduce en un 30% el riesgo de verrugas genitales en lesiones intraepiteliales (Manhart & Koutsky, 2002). Esta variable no fue evaluada en nuestro estudio. Al observar el uso de anticonceptivos orales, en este estudio no existe riesgo para el desarrollo de cáncer, sin embargo, estos resultados difieren un poco de estudios realizados por Moreno y colaboradores (Moreno et al, 2002) en donde el uso prolongado de anticonceptivos orales puede ser un co-factor que incrementa el riesgo de carcinoma cervical por hasta cuatro veces más en mujeres que son positivas para VPH. Adicionalmente, otro estudio concluyó que el riesgo es el doble cuando se usan anticonceptivos orales por más de 10 años contrario a la ausencia de uso (Castellsague & Munoz, 2003). La ausencia de esta relación en el presente estudio, se puede explicar por dificultades en la evaluación en la variable de exposición, puesto que el tiempo de uso de anticonceptivos orales no se evaluó, pero además se observó una gran variabilidad del tipo de anticonceptivos orales y tipos de fabricantes de los mismos, que muy probablemente impidieron la evaluación de esta variable adecuadamente. Por otro lado, el embarazo cuando es ajustado por edad presenta un riesgo con un valor estadísticamente significativo y concuerda con estudios que han llegado a conclusiones similares, como el estudio casos y controles publicado en el 2002 por Muñoz y

colaboradores (Muñoz et al, 2002) en el cual se observó que a medida que aumentaba el número de hijos, era más alto el riesgo para el desarrollo de una lesión de alto grado. La posible explicación de esta asociación es porque se mantiene activa la zona de transformación en el exocervix por muchos años y esto facilita la directa exposición a VPH y otros co-factores. Al analizar el uso del cigarrillo, se presenta como un factor de riesgo comparable con otros estudios donde se reporta que fumar se asocia con el incremento del riesgo de cáncer invasivo en mujeres que han sido infectadas con VPH de alto riesgo (oncogénico); dicho estudio de referencia provee una fuerte evidencia ya que fueron aproximadamente 2000 mujeres infectadas con VPH que participaron del estudio (Castle et al, 2002).

Por otra parte, el porcentaje de infección de VPH en los casos del presente estudio, está dentro de lo reportado en algunas investigaciones (Munoz et al, 1992; Walboomers et al, 1999a) en donde se han encontrado más del 90%; de los casos infectados con VPH y el riesgo asociado a este coincide con los estudios de casos y controles patrocinados por la IARC (Agencia internacional para la investigación del cáncer), en el cual se reportan riesgos relativos superiores a 50 para la detección de ADN de VPH y en algunos estudios estas cifras presentan valores superiores a 500 (Castellsague et al, 2006; Munoz et al, 2003). Por ello la consigna que se le ha atribuido, como agente necesario (ausencia de enfermedad en ausencia de infección) e insuficiente (presencia de infección sin presencia de enfermedad), se sigue afirmando con estudios como este.

En contraste, al analizar la infección por VEB se encuentra infectando solo en un 27,1% a los casos y en un 5,9% controles. Resaltando, que el VEB se encuentra en mayor proporción en las personas que tienen cáncer comparado a quienes no lo presentan; probablemente porque quienes presentan CaCu tienen también una conducta sexual de riesgo que incrementa la probabilidad de

la infección tanto del VPH como del VEB. Reportes de la infección de ADN de este virus en el cérvix mencionan frecuencias del 45% en mujeres con presencia de condilomas con un tamaño muestral de 20 mujeres (Voog et al, 1995) , 10% en adenocarcinomas (Lau et al, 2009) con un tamaño muestral de 30 pacientes. Otro estudio reporta prevalencias en lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL) del 11%, lesiones intraepiteliales de alto grado (LSIH) del 30% y cáncer de cuello uterino en un 43% con un tamaño muestral de 60 pacientes (Szostek et al, 2009). No obstante, se encuentran reportados otros estudios donde hay mayor prevalencia del ADN del virus en citología normal que en citología con anormalidades (42% vs 32%, respectivamente) (Taylor et al, 1994). Sin embargo, Voog (1995) realiza un estudio en donde amplifica el virus de VPH y el VEB por PCR de células cervicales de pacientes entre 20 y 58 años, que presentaban señales de condilomas de la vulva y/o vagina, y encuentra co-infección del 14%. La evidencia epidemiológica presentada en este y otros estudios, complementa algunos hallazgos del VEB en estudios in vitro. Específicamente Young (1988) en su estudio con cultivos de células epiteliales ectocervicales, mostró la capacidad del virus de replicarse en el epitelio cervical. Este autor sugiere que puede existir alguna relación o efecto de la infección de estos dos virus, ya que al parecer ambos tienen la capacidad de infectar mucosas. Ambos virus están asociados con lesiones orales y presentan un período de latencia entre la infección primaria y el desarrollo secuencial del tumor (Voog et al, 1995). Adicionalmente, al observar el riesgo relacionado a la infección por VEB en cáncer de cuello uterino, se encuentra un valor estadísticamente significativo el cual es comparable con un estudio realizado en el 2009 por Szostek y colaboradores (Szostek et al, 2009) en el cual analizan el papel de los herpesvirus como posibles co-factores en oncogénesis relacionadas a VPH tipo 16 y encuentran que VEB pueden aumentar

en 7,11 veces el riesgo de infección por VPH. En nuestro estudio no es posible llevar a cabo este análisis, puede que se debe hacer una restricción de los controles para aquellos que son VPH+.

Debido a la disminución de asociación del VEB con el riesgo de desarrollo de cáncer de cuello uterino, se realizó un ajuste con las mismas variables tanto por análisis bivariado como multivariado y se observa que las variables que están causando confusión son los factores sexuales, probablemente porque este virus pueda ser transmitido vía oro-genital. Finalmente, el VEB aparece como un factor de riesgo para el desarrollo de CaCu sin decir que necesariamente sea una relación causal. Aunque algunos autores han reportado que el VEB debe de jugar un papel, ya que se ha encontrado mayor prevalencia desde el desarrollo de alguna neoplasia cervical intraepitelial (CIN) comparado con citologías normales, es decir, existe un estudio que reporta la presencia de algún gen del VEB en el 74% (23/31) de carcinomas cervicales (CC), 87% en lesiones intraepiteliales de alto grado (LIAG) (20/23) y 37%(13/35) concluyendo que existe una frecuente asociación de la expresión de los genes del virus en CC y CIN que en tejido normal, sugiriendo que el VEB es otro factor etiológico para el cáncer cervical (Sasagawa et al, 2000). Adicional, en otro estudio se encontró ADN del VEB en 21,21%(14/66) CIN y 64%(9/14) de CC y 8,99%(8/89) en controles; de esta manera sugieren que el VEB no solo tiene un papel de visitante transitorio (comensal) sino que el VEB está asociado significativamente con cáncer de cuello uterino (Santos et al, 2009). Otro reporte, en donde se tiene el 20%(93/464) de toda la muestra es positivo para ADN del VEB, se realiza un análisis univariado con los factores de riesgo estado civil de la mujer (si la mujer es divorciada, viuda o casada) y edad respecto a la presencia del VEB y se concluye que este es fuertemente asociado con la presencia de CIN o lesiones mayores, sin embargo por el tamaño de la muestra sugiere continuar con estudios para

determinar mejor su papel causal en el desarrollo de la enfermedad o simplemente su comportamiento como un espectador (Silver et al, 2011).

Al analizar la co-infección se encontró que el 25% (24/96) y el 0,5% (1/168) de los casos y controles respectivamente fueron simultáneamente positivos para VEB y VPH. Otros estudios muestran co-infección en 15% (14/91) de muestras clasificadas con señales macroscópicas de condilomas (20) y sin condiloma (71) (Voog et al, 1995), el estudio realizado por Szostek en el 2009, reporta co-infección del 22%(13) de las cuales 3 son lesiones intraepiteliales de bajo grado y 10 cáncer cervical entre 60 mujeres con diferentes diagnósticos (27 lesiones de bajo grado, 23 lesiones de alto grado y 10 cáncer cervical) (Szostek et al, 2009). De los pocos estudios de casos y controles reportados con cáncer de cuello uterino, se encuentra un estudio realizado por Chao (Chao et al, 2009) para determinar la presencia de VEB y VPH en linfopitelioma- carcinoma de cuello uterino (LELC), el cual no encuentra presencia de VEB y por tanto concluye que este no está implicado. Aunque en los controles se observó una alta concordancia y en casos una baja, el valor de kappa permite afirmar que las concordancia observada es precisamente la que se espera a causa del azar (Cerde & Villarroel del P, 2008). Adicional, la concordancia baja está relacionada a la alta prevalencia de VPH y la baja prevalencia de VEB; sin embargo llama la atención la baja concordancia confirmada por el kappa en los controles, ya que la co-infección en los controles es de 0,5% mientras que en los casos es de un 25%, el aumento en la detección de ambos virus parece estar relacionada en la progresión de la enfermedad por tanto son necesarios más estudios para esclarecer su papel en otros tipos de cáncer como el CaCu.

No se descarta que el virus pueda entrar al tejido y causar daño, ya que hay estudios que reportan la interacción del membrana del virus con receptores en la membrana de células epiteliales

(Chesnokova et al, 2009) o como proponen otros autores ingresar a la célula por endocitosis (Sasagawa et al, 2000). Además el VEB puede estar actuando como inmunosupresor y eso facilite a que el VPH presente mayor probabilidad de causar cáncer.

Se propone el desarrollo de más estudios con técnicas que permitan ubicar la infección *in situ* para conocer si la infección se está dando en las células epiteliales o en los linfocitos circulantes.

CONCLUSIONES

El VEB no necesariamente puede estar causando un daño en el tejido, ya que no se descarta la posibilidad de que solo actúe como un factor en una pequeña proporción de casos de CaCu y para ello se necesitaría realizar un estudio de seguimiento que analice si las personas que están infectadas por ambos virus presentan mayor posibilidad de desarrollo de CaCu que presentando un solo virus.

Estos resultados indican que a pesar de que el VEB se encuentra infectando el cérvix de mujeres sanas y con CaCu, muy probablemente esta infección no induce directamente cáncer en este tejido.

Es importante evaluar si la infección con VEB es un factor que interactúa con VPH para modular el riesgo de cáncer de cuello uterino o si la infección del VEB se pueda explicar por la conducta sexual.

CONFLICTOS DE INTERÉS

En la realización del presente trabajo, ninguno de los autores declara conflicto de interés financiero, político o académico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue llevado a cabo con el apoyo económico de la estrategia de sostenibilidad (2011-2012) del grupo Infección y Cáncer. Este proyecto fue en parte financiado por COLCIENCIAS (código proyecto: 1115-343-19317).

A la colaboración del doctor Michael Hagensee, profesor del departamento de Medicina y Microbiología de la escuela de medicina LSU en Nueva Orleans; por la donación de primers y controles positivos para el VEB.

A las clínicas que colaboraron en el estudio inicial, titulado : The role of the molecular variability of *Human Papillomavirus* in Cervical cáncer patrocinado.

A las mujeres participantes del estudio

A los ginecólogos Dres. Mauricio Borrero, Carlos Mario Cordoba, Fredy Rojas, Rene Pareja, y Gonzalo Angel, por su colaboración en el diagnóstico de los casos, recolección de las muestras, asesoramiento en la confirmación de los diagnósticos clínicos.

La estudiante, Monica Gaviria fue joven investigadora del programa jóvenes investigadores de la Universidad de Antioquia 2011-2012.

Contribución del personal del laboratorio

Marcela Gaviria: Autora principal, desarrollo de los experimentos y escritura del manuscrito.

Astrid Bedoya: Investigadora grupo Infección y Cáncer. Acompañamiento en la realización de la tesis.

Victor Florez: Investigador grupo Infección y Cáncer. Colaboración en la revisión de los datos consignados en la base de datos.

Armando Baena: Investigador grupo Infección y Cáncer. Colaboración con los análisis estadísticos.

Ruth Elena Arboleda. Auxiliar de laboratorio del grupo Infección y Cáncer. Colaboración con la recolección de muestras.

Gloria I. Sánchez: Coordinadora grupo Infección y Cáncer. Asesora del proyecto y revisión y aprobación del manuscrito.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Análisis bivariado y multivariado de riesgo de cáncer de Cuello uterino asociado a VPH, VEB y otros factores de riesgo en mujeres del departamento de Antioquia, 2007-2010

Tabla 1. Análisis bivariado y multivariado de riesgo de cáncer de cuello uterino asociado a VPH, VEB y otros factores de riesgo en mujeres del departamento de Antioquia, 2007-2010

Características	Casos		Controles		Análisis bivariado*		Análisis multivariado**	
	n	%	n	%	OR (IC 95%)	Valor-p	OR (IC 95%)	Valor-p
Total	96	100	186	100				
Edad								
24-34	17	17,7	34	18,3	1,0		1,0	
35-44	31	32,3	62	33,3	1,0 (0,5-2,1)		0,2 (0,0-1,4)	
45-54	21	21,9	42	22,6	1,0 (0,5-2,2)	0,977	1,0 (0,1-7,3)	0,917
55-64	14	14,6	28	15,1	1,0 (0,4-2,4)		0,7 (0,1-9,1)	
65+	13	13,5	20	10,8	1,3 (0,5-3,2)		0,4 (0,0-4,8)	
Infección con VEB								
Negativo	70	72,9	175	94,1	1,0		1,0	
Positivo	26	27,1	11	5,9	6,1 (2,8-13,1)	< 0.001	3,4 (0,6-19,3)	< 0.001
Infección con VPH								
Negativo	8	8,3	166	89,2	1,0		1,0	
Positivo	88	91,7	20	10,8	131 (47,7-360)	< 0.001	141,2 (35,7-558)	< 0.001
Edad inicio de relaciones sexuales								
>= 20	11	13,6	61	50,4	1,0		1,0	
16-19	43	53,1	47	38,8	6,3 (2,7-14,5)		3,3 (0,7-14,8)	
<= 15	27	33,3	13	10,7	14,4 (5,3-38,9)	< 0.001	10,8 (1,6-72,0)	0,003
Sin información	15		65					
Parejas sexuales en toda la vida								
1	18	21,4	49	39,2	1,0		1,0	
2	17	20,2	36	28,8	1,4 (0,6-3,2)		1,4 (0,3-7,5)	
3	22	26,2	19	15,2	3,6 (1,5-8,6)	0,001	2,8 (0,5-17,9)	0,792
4+	27	32,1	21	16,8	4,0 (1,8-9,2)		2,4 (0,4-14,3)	
Sin información	12		61					
Uso de condón								
Siempre/A veces	5	7,7	8	15,4	1,0		-	

Nunca	60	92,3	44	84,6	2,5 (0,7-8,8)	0,143		
Sin información	31		134					
Uso de anticonceptivos (presente)								
No	72	83,7	136	76,4	1,0		-	
Sí	14	16,3	42	23,6	0,6 (0,30-1)	0,153		
Sin información	10		8					
Uso de anticonceptivos (pasado)								
Nunca	31	40,3	34	32,1	1,0		1,0	
Alguna vez	46	59,7	72	67,9	0,7 (0,37-1)	0,242	0,4 (0,1-1,8)	0,426
Sin información	19		80					
Embarazo								
Nunca	2	2,1	32	17,4	1,0		1,0	
Alguna vez	93	97,9	152	82,6	11,9 (2,7-53)	< 0.001	22,1(1,6-302,1)	0,008
Sin información	1		2					
Uso de cigarrillo								
Nunca	40	42,6	121	65,4	1,0		1,0	
Alguna vez	54	57,4	64	34,6	2,6 (1,6-4,5)	< 0.001	1,1 (0,3-4,4)	0,882
Sin información	2		1					

*OR ajustadas por edad. **Incluye todas las variables que mostraron alguna asociación en el análisis bivariado

Tabla 2. Riesgo de cáncer de cuello uterino asociado a la co-infección de virus del papiloma humano y virus de Epstein-Barr en mujeres del departamento de Antioquia, 2007-2010.

Tabla 2. Riesgo de cáncer de cuello uterino asociado a la co-infección de VPH y VEB en mujeres del departamento de Antioquia, 2007-2010

Co-infección con VEB y VPH	Casos		Controles		Análisis bivariado*		Análisis multivariado**	
	n	%	n	%	OR (IC 95%)	Valor-p	OR (IC 95%)	Valor-p
Negativo	72	75,0	185	99,5	1		1,0	
Positivo	24	25,0	1	0,5	69,9 (9,2-532,7)	< 0.001	34,5 (4,0-298,4)	< 0.001

*OR ajustada por edad. **OR ajustada por todas las variables, excepto uso de condón

Tabla 3. Análisis de concordancia entre Infección por el virus de Epstein-Barr y el virus de papiloma humano en mujeres sanas del departamento de Antioquia, 2007-2010.

Tabla 3. Análisis de concordancia entre infección por el VPH y VEB en mujeres sanas del departamento de Antioquia, 2007-2010.

Infección con VPH	Infección con VEB		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	1	19	20
Negativo	10	156	166
Total	11	175	186

Concordancia (intervalo de confianza del 95%) = 84.4 (78.5-88.9)

Índice Kappa = 0.0

Tabla 4. Análisis de concordancia entre Infección por el virus de Epstein-Barr y el virus de papiloma humano en casos de mujeres del departamento de Antioquia, 2007-2010.

Tabla 4. Análisis de concordancia entre infección por el VPH y VEB en casos de mujeres del departamento de Antioquia, 2007-2010

Infección con VPH	Infección con VEB		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	24	64	88
Negativo	2	6	8
Total	26	70	96

Concordancia (intervalo de confianza del 95%) = 31.2 (22.9-41.1)

Índice Kappa = 0.005

Tabla 5. Razones de odds (OR) ajustadas del riesgo de cáncer de cuello uterino asociado a infección por virus de Epstein-Barr en mujeres del departamento de Antioquia.

Tabla 5. Razones de odds (OR) ajustadas del riesgo de cáncer de cuello uterino asociado a infección por VEB en mujeres del departamento de Antioquia, 2007-2010

Variable de ajuste										OR*(IC 95%)	Tipo de ajuste
VEB	VPH	EIRS	PSV	CON	EDAD	ACO	ACO P	EMB	CIG		
X										5,91 (2,77-12,60)	Crudo
X	X									5,94 (1,67-21,09)	**
X		X								4,04 (1,59-10,22)	**
X			X							4,37 (1,78-10,74)	**
X				X						4,25 (1,29-13,98)	**
X					X					6,10 (2,84-13,11)	**
X						X				6,03 (2,71-13,40)	**
X							X			5,20 (2,06-13,16)	**
X								X		6,40 (2,85-14,35)	**
X									X	5,49 (2,53-11,89)	**
X	X	X	X	X						1,08 (0,11-10,51)	***
X	X	X	X							3,37 (0,72-15,64)	***
X		X	X	X						3,60 (0,94-13,73)	***
X		X	X							3,45 (1,29-9,250)	***
X					X	X	X	X	X	5,33 (1,77-16,11)	***
X					X		X	X	X	4,66 (1,66-13,09)	***
X					X	X		X	X	6,13 (2,52-14,89)	***
X		X	X	X	X	X	X	X	X	6,77 (1,08-42,62)	***
X		X	X	X	X		X	X	X	4,44 (0,90-22,07)	***
X		X	X	X	X	X		X	X	5,45 (1,16-25,70)	***
X		X	X		X	X	X	X	X	3,91 (1,10-13,87)	***
X		X	X		X		X	X	X	2,81 (0,89-8,910)	***
X		X	X		X	X		X	X	4,63 (1,55-13,85)	***
X	X				X	X	X	X	X	3,45 (0,58-20,54)	***
X	X				X		X	X	X	3,14 (0,59-16,65)	***
X	X				X	X		X	X	7,41 (1,48-37,09)	***
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	
X	X	X	X	X	X		X	X	X	-	
X	X	X	X	X	X	X		X	X	1,88 (0,07-53,31)	***
X	X	X	X		X	X	X	X	X	2,16 (0,28-16,55)	***

x	x	x	x		x		x	x	1,56 (0,26-9,280)	***
x	x	x	x		x	x		x	5,57 (0,77-40,10)	***

*Nivel de referencia: VEB negativo. "x" representa las variables incluidas en la estimación de la OR. **Análisis bivariado. ***Análisis multivariado. EIRS: Edad inicio de relaciones sexuales, PSV: Parejas sexuales en toda la vida, CON: Uso de condón, EDAD: edad, ACO: Uso de anticonceptivos (presente), ACOP: Uso de anticonceptivos (pasado), EMB: Embarazo, CIG: Uso de cigarrillo. – No fue posible calcular, demasiadas variables para la cantidad de datos disponibles.

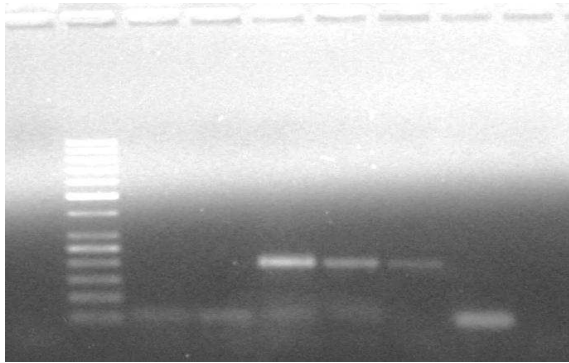


Figura 1. PCR para el VEB con controles internos de la prueba, m: marcador, c1-2 casos, c3-4-7 controles internos.

REFERENCIAS

Aguayo F, Khan N, Koriyama C, González C, Ampuero S, Padilla O, Solís L, Eizuru Y, Corvalán A, Akiba S (2011) Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in breast cancer from Chile. *Infect Agent Cancer* **6**: 7

Albà MM, Das R, Orengo CA, Kellam P (2001) Genomewide function conservation and phylogeny in the Herpesviridae. *Genome Res* **11**: 43-54

Baena A, Almonte M, Valencia ML, Martínez S, Quintero K, Sánchez GI (2011) [Trends and social indicators of both mortality breast cancer and cervical cancer in Antioquia, Colombia, 2000-2007]. *Salud Publica Mex* **53**: 486-492

Baseman JG, Koutsky LA (2005) The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**: S16-24

Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV (2002) The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* **55**: 244-265

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV, International Biological Study on Cervical Cancer study G (1995) Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective. *J Natl Can Inst* **87**: 796-802

Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Herrero R, de Britton RC, Gaitan E, Tenorio F, Garcia M, Rawls WE (1990) Oral contraceptive use and risk of invasive cervical cancer. *Int J Epidemiol* **19**: 4-11

Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Munoz N, Herrero R, Franceschi S, Peeling RW, Ashley R, Smith JS, Snijders PJ, Meijer CJ, Bosch FX (2006) Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst* **98**: 303-315

Castellsague X, Munoz N (2003) Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 20-28

Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, Rush BB, Schussler JE, Schiffman M (2002) A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst* **94**: 1406-1414

Cendales R, Wiesner C, Murillo RH, Pineros M, Tovar S, Mejia JC (2010) [Quality of vaginal smear for cervical cancer screening: a concordance study]. In *Biomedica* Vol. 30, pp 107-115. Colombia

Cerda J, Villarroel del P L (2008) Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa *Revista chilena de pediatría* **1**

Chao A, Tsai CN, Hsueh S, Lee LY, Chen TC, Huang SL, Chao FY, Lai CH (2009) Does Epstein-Barr virus play a role in lymphoepithelioma-like carcinoma of the uterine cervix? *Int J Gynecol Pathol* **28**: 279-285

Chesnokova LS, Nishimura SL, Hutt-Fletcher LM (2009) Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins alphavbeta6 or alphavbeta8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 20464-20469

Clarke PA, Sharp NA, Clemens MJ (1990) Translational control by the Epstein-Barr virus small RNA EBER-1. Reversal of the double-stranded RNA-induced inhibition of protein synthesis in reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* **193**: 635-641

Cohen JI (2006) Virology and Molecular Biology of Epstein-Barr Virus. In *Epstein-Barr virus*, Tselis A, Jenson H (eds), 2, pp 21-38. New York, NY, USA: Taylor & Francis group, LLC

Corvalan A, Ding S, Koriyama C, Carrascal E, Carrasquilla G, Backhouse C, Urzua L, Argandoña J, Palma M, Eizuru Y, Akiba S (2006) Association of a distinctive strain of Epstein-Barr virus with gastric cancer. *Int J Cancer* **118**: 1736-1742

Corvalan A, Koriyama C, Akiba S, Eizuru Y, Backhouse C, Palma M, Argandoña J, Tokunaga M (2001) Epstein-Barr virus in gastric carcinoma is associated with location in the cardia and with a diffuse histology: a study in one area of Chile. *Int J Cancer* **94**: 527-530

de-Thé G, Geser A, Day NE, Tukei PM, Williams EH, Beri DP, Smith PG, Dean AG, Bronkamm GW, Feorino P, Henle W (1978) Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature* **274**: 756-761

Enbom M, Strand A, FALK K, Linde A (2001) Detection of Epstein-Barr Virus, but not Human Herpesvirus 8, DNA in Cervical Secretions From Swedish Women by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Sexually transmitted diseases* **28**

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010a) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**: 2893-2917

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. (2010b) GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

Glaser SL, Hsu JL, Gulley ML (2004) Epstein-Barr virus and breast cancer: state of the evidence for viral carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**: 688-697

González Saldaña N, Monroy Colín VA, Piña Ruiz G, Juárez Olguín H (2012) Clinical and laboratory characteristics of infectious mononucleosis by Epstein-Barr virus in Mexican children. *BMC Res Notes* **5**: 361

Gornick MC, Castellsague X, Sanchez G, Giordano TJ, Vinco M, Greenson JK, Capella G, Raskin L, Rennert G, Gruber SB, Moreno V (2010) Human papillomavirus is not associated with colorectal cancer in a large international study. *Cancer Causes Control* **21**: 737-743

Hippocrate A, Oussaief L, Joab I (2011) Possible role of EBV in breast cancer and other unusually EBV-associated cancers. *Cancer Lett* **305**: 144-149

Howley PM, Lowy DR (2007) Papillomavirus. In *Fields Virology*, Howley PM, Lowy DR, Knipe DM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (eds), 5 edn, pp 2299-2354. Philadelphia, USA: Lippincot Williams & Wilkins

IARC (2007) Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **90**: 1-636

IARC. (2012) Biological agents. A review of human carcinogens. *IARC Monographs Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* **100 B**: 32

Khan G, Philip PS, Al Ashari M, Houcinat Y, Daoud S (2011) Localization of Epstein-Barr virus to infiltrating lymphocytes in breast carcinomas and not malignant cells. *Exp Mol Pathol* **91**: 466-470

Kieff E, Rickinson AB (2007) Epstein-Barr virus and its replication. In *Fields Virology*, Howley PM, Lowy DR, Knipe DM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (eds), Vol. II, Fifth edn, 68a, pp 2603-2654. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer. Lippincott Williams & Wilkins

Labrecque LG, Barnes DM, Fentiman IS, Griffin BE (1995) Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. *Cancer Res* **55**: 39-45

Lau HY, Twu NF, Chen PC, Lai CR, Juang CM, Yen MS, Chao KC (2009) The relationship between human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in relation to age of patients with cervical adenocarcinoma. *Taiwan J Obstet Gynecol* **48**: 370-374

Le Gales-Camus C, Beaglehole R, Epping-Jordan J. (2005) Preventing chronic diseases: a vital investment: WHO global report. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Manhart LE, Koutsky LA (2002) Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sex Transm Dis* **29**: 725-735

Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S (2002) Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* **359**: 1085-1092

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* **348**: 518-527

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Martos C, Ascunce N, et al (1992) The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* **52**: 743-749

Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L (2006) Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* **24S3**: S1-S10

Muñoz M, S F, Cristina B, Victor M, Rolando H, S SJ, V SK, M MCJL, Xavier BF (2002) Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study *THE LANCET* **359**: 9

O'Leary JJ, Landers RJ, Crowley M, Healy I, Kealy WF, Hogan J, Cullinane C, Kelehan P, Doyle CT (1997) Genotypic mapping of HPV and assessment of EBV prevalence in endocervical lesions. *J Clin Pathol* **50**: 904-910

Owen TJ, O'Neil JD, Dawson CW, Hu C, Chen X, Yao Y, Wood VH, Mitchell LE, White RJ, Young LS, Arrand JR (2010) Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 enhances RNA polymerase III-dependent EBER expression through induction of EBER-associated cellular transcription factors. *Mol Cancer* **9**: 241

Pordeus V, Barzilai O, Sherer Y, Luiz RR, Blank M, Bizzaro N, Villalta D, Anaya JM, Shoenfeld Y (2008) A latitudinal gradient study of common anti-infectious agent antibody prevalence in Italy and Colombia. *Isr Med Assoc J* **10**: 65-68

Prayitno A (2006) Cervical cancer with human papilloma virus and Epstein Barr virus positive. *J Carcinog* **5**: 13

Preciado MV, Chabay PA, De Matteo EN, Gonzalez P, Grinstein S, Actis A, Gass HD (2005) Epstein-Barr virus in breast carcinoma in Argentina. *Arch Pathol Lab Med* **129**: 377-381

Santos NB, Villanova FE, Andrade PM, Ribalta J, Focchi J, Otsuka AY, Dale Silva I (2009) Epstein-Barr virus detection in invasive and pre-invasive lesions of the uterine cervix. *Oncol Rep* **21**: 403-405

Sasagawa T, Shimakage M, Nakamura M, Sakaike J, Ishikawa H, Inoue M (2000) Epstein-Barr virus (EBV) genes expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer: a comparative study with human papillomavirus (HPV) infection. *Hum Pathol* **31**: 318-326

Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K (2005) Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer* **15**: 727-746

Shibata D, Weiss LM (1992) Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* **140**: 769-774

Silver MI, Paul P, Sowjanya P, Ramakrishna G, Vedantham H, Kalpana B, Shah KV, Gravitt PE (2011) Shedding of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus from the genital tract of women in a periurban community in Andhra Pradesh, India. *J Clin Microbiol* **49**: 2435-2439

Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Munoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, Castellsague X, Meijer CJ, Van den Brule AJ, Franceschi S, Ashley R (2002a) Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* **94**: 1604-1613

Smith JS, Munoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S, Bosch FX, Walboomers JM, Peeling RW (2002b) Evidence for Chlamydia trachomatis as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis* **185**: 324-331

Stanley M (2010) HPV - immune response to infection and vaccination. *Infect Agent Cancer* **5**: 19

Swan D, Tucker R, Tortolero-luna G, Mitchell M, Wideroff L, Unger E, Nisenbaum R, reeves W, Icenogle J (1999) Human Papillomavirus (HPV) DNA Number is Dependent on Grade of Cervical Disease and HPV Type. *J Clin Microbiol* **37**: 1030-1034

Szarewski A, Jarvis MJ, Sasieni P, Anderson M, Edwards R, Steele SJ, Guillebaud J, Cuzick J (1996) Effect of smoking cessation on cervical lesion size. *Lancet* **347**: 941-943

Szostek S, Zawilinska B, Kopec J, Kosz-Vnenchak M (2009) Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis. *Acta Biochim Pol* **56**: 337-342

Takada K (2000) Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Mol Pathol* **53**: 255-261

Tamim H, Finan RR, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY (2002) Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and Chlamydia trachomatis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **43**: 277-281

Taylor Y, Melvin WT, Sewell HF, Flannelly G, Walker F (1994) Prevalence of Epstein-Barr virus in the cervix. *J Clin Pathol* **47**: 92-93

Thompson MP, Kurzrock R (2004) Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* **10**: 803-821
van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ (2002) GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* **40**: 779-787

Voog E, Ricksten A, Löwhagen GB (1995) Prevalence of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in cervical samples from women attending an STD-clinic. *Int J STD AIDS* **6**: 208-210

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N (1999a) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology* **189**: 12-19

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N (1999b) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**: 12-19

Werness BA, Levine AJ, Howley PM (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**: 76-79

Winer RL, Feng Q, Hughes JP, O'Reilly S, Kiviat NB, Koutsky LA (2008) Risk of female human papillomavirus acquisition associated with first male sex partner. *J Infect Dis* **197**: 279-282

Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA (2003) Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* **157**: 218-226