

Associação do vírus Epstein-Barr (EBV) com tumores sólidos

Association of Epstein-Barr virus (EBV) with Solid Tumors

Marcos Antonio Pereira de Lima ¹, Sílvia Helena Barem Rabenhorst²

Resumo

O gama-herpes vírus Epstein-Barr (EBV) é um vírus ubíquo, que estabelece infecção persistente em mais de 90% da população mundial adulta. O EBV está associado a várias desordens proliferativas benignas e malignas de origem linfóide, tais como mononucleose infecciosa, linfoma de Burkitt, doença de Hodgkin e doença linfoproliferativa pós-transplante, nas quais o seu papel oncogênico tem sido largamente estudado. Em tumores sólidos, a relação do EBV é bem documentada em carcinomas de nasofaringe. Contudo, novos achados têm demonstrado que o EBV apresenta um espectro de infecção celular mais amplo do que se conhecia, sendo detectado em células de outros tipos de tumores sólidos, com evidências que apontam para a sua participação na tumorigênese dessas neoplasias. O presente artigo inicia com uma breve descrição da biologia do EBV e tem como objetivo realizar uma compilação dos achados encontrados na literatura, concernentes à associação do EBV a neoplasias sólidas, apontando as evidências do envolvimento viral e as características das infecções que são encontradas em cada tecido.

Palavras-chave: : Vírus de Epstein-Barr; Tumores sólidos; Oncogênese.

Abstract

The gamma-herpes Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous viral agent that causes persistent infection in more than 90% of the world adult population. EBV is associated with several lymphoproliferative disorders such as infectious mononucleosis, Burkitt's lymphoma, Hodgkin's disease, and post-transplant lymphoproliferative disease. The oncogenic role of EBV in tumors of lymphoid origin has been widely investigated. With respect to solid tumors, the role of EBV is well documented in nasopharyngeal carcinoma. However, new findings have shown that the spectrum of cellular infection of EBV is broader, having been detected in cells from other kinds of solid tumors, thus indicating its involvement in tumorigenesis of these tumors. The current article begins with a brief description of EBV biology and aims to provide a summary of new findings concerning the association between EBV and solid tumors, highlighting evidence of the viral role and characteristics of infections in each tissue.

Key words: Epstein-Barr virus; Solid tumors; Oncogenesis.

Departamento de Microbiologia Médica - Universidade Federal do Ceará.

¹ Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica - Universidade Federal do Ceará.

² Professora de Genética Molecular do Departamento de Patologia e Medicina Legal - Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará.

Endereço para correspondência: Sílvia Helena Barem Rabenhorst - Rua Marcos Macedo, 1301, Apt.: 802 - Aldeota - Fortaleza - CE CEP: 60150-190 tel.: (085) 3267-3840 / (085) 9994-5689. E-mail: silviarabenhorst@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um gama-herpes vírus constituído de DNA linear fita dupla, envolvido por um capsídeo icosadeltaédrico composto de 162 capsômeros, recoberto por um envelope glicoprotéico.¹ É amplamente distribuído no mundo e estima-se que mais de 90% da população mundial adulta está infectada por esse vírus.²

O EBV é transmitido pela saliva, infectando inicialmente as células epiteliais da orofaringe, nasofaringe e glândulas salivares, por receptores ainda não identificados, onde freqüentemente ocorre replicação. Posteriormente, os vírus alcançam tecidos linfóides adjacentes e infectam linfócitos B através da ligação entre a glicoproteína viral gp350/220 e o receptor CD21 (CR2) do componente C3d do sistema complemento.³ Após essa associação, o vírus penetra nos linfócitos B por fusão do envoltório com a membrana celular e o capsídeo é então liberado no citoplasma. O genoma antes linear é transportado para o núcleo tornando-se circular, permanecendo em estado latente, sob a forma de DNA episomal extracromossômico.⁴ O genoma viral apresenta um comprimento de cerca de 172 Kpb, o qual foi dividido em regiões, com base na posição no mapa de restrição da endonuclease *Bam*HI (*Bacillus amyloliquefaciens* H), e nomeadas de acordo com o tamanho do fragmento, indo de A à Z, sendo o fragmento *Bam*HI A o maior deles.⁵

Devido a estímulos ainda não totalmente esclarecidos, o EBV pode iniciar um ciclo lítico. O primeiro gene a ser expresso nesse ciclo é o BZLF1 (*Bam*HI *Z left-ward open reading frame 1*), também conhecido como ZEBRA.⁶ Esse gene codifica uma proteína que apresenta função de ativador transcricional, iniciando uma cascata de eventos que determinam a expressão de algumas proteínas, tais como os antígenos precoces (EAs), BHRF1 (*Bam*HI *H right-ward open reading frame 1*) e BCRF1 (*Bam*HI *C right-ward open reading frame 1*), incluindo a expressão da DNA polimerase viral.⁷

Durante as infecções latentes, é possível verificar a expressão de alguns genes virais que codificam: seis proteínas conhecidas como antígenos nucleares do EBV, EBNA-1, 2, 3A, 3B (também conhecido EBNA-4), 3C e LP (também designada EBNA-5); três proteínas latentes de membrana LMP-1, LMP-2A e LMP-2B; duas pequenas moléculas de RNA não-poliadeniladas, EBER-1 e 2; alguns transcritos com múltiplos splices, da região *Bam*HI A do genoma viral, BARF0 (*Bam*HI *A right-ward open reading frame*) e BARF1.^{7,8,9}

Esses genes, no entanto, não são expressos concomitantemente nas diversas células de tecidos ou linhagens tumorais EBV-positivas, sendo proposta a existência de quatro tipos de latência, com padrões distintos de expressão dos genes virais, os quais estão descritos na tabela 1.

De acordo com a International Agency for Research on Cancer - IARC, o Epstein-Barr Vírus é classificado como um carcinógeno do grupo I. Não obstante, diversos autores investigam a função das proteínas virais expressas e a participação dessas no desenvolvimento das neoplasias. Alguns estudos tentam correlacioná-las com a superexpressão ou mesmo inibição de proteínas celulares envolvidas em processos oncogênicos. A seção a seguir descreve alguns achados relevantes relativos aos genes latentes do EBV.

GENES LATENTES: MECANISMOS TUMORIGÊNICOS

A oncoproteína EBNA-1, codificada pelo gene homônimo, é responsável pela manutenção do genoma viral, já que ao se ligar à região oriP permite a replicação pela DNA polimerase celular.¹⁰ Atua, também, como fator de transcrição do gene viral LMP-15 e supressor, em nível transcricional, da expressão do oncogene *c-erbB-2* celular.¹¹

O EBNA-2, por sua vez, transativa genes virais, tais como LMP-1, LMP-2 e genes celulares como CD21, CD23 e o *c-myc*.^{12,13} Também, induz a proliferação/transformação de linfócitos B.^{14,15} Ademais, interage com o fator transcricional RBP-Jκ, regulando positivamente sua atividade.¹⁶ Juntamente com EBNA-LP, são as primeiras proteínas a serem observadas, sendo essas suficientes para induzir a transição da fase G0 para G1 do ciclo celular em linfócitos-B, possivelmente por aumentarem a expressão de Ciclina D2.^{5,17}

A família EBNA-3 parece ter importante papel na transformação de células B.¹⁰ Podem induzir a expressão de genes virais (LMP-1) e celulares (CD21) e se combinar com a proteína Rb, favorecendo a transformação celular.⁵ Os EBNA-3 também se associam à proteína RBP-Jκ, mas ao contrário da EBNA2 regulam negativamente sua atividade.¹⁶

Em relação aos EBERs, tem sido relatado que esses conferem resistência à apoptose em células de linfoma de Burkitt e tumorigenicidade em camundongos SCID. Induzem, ainda, a transcrição de IL-10 em células de Linfoma de Burkitt.¹⁸ Niller et al¹⁹ demonstraram uma região de ligação para a proteína c-Myc, cerca de 130pb fita acima do gene EBER-1, o qual, por sua vez, tem sido demonstrado ser capaz de bloquear os efeitos pró-apoptóticos da proteína c-Myc.¹⁵

Tabela 1. Genes expressos do EBV quanto aos tipos de latência e tecido associado.

Tipo de Latência	TECIDO ASSOCIADO	Genes expressos pelo EBV											
		EBNA-1	-2	-3A	-3B	-3C	LP	LMP1	LMP2A	LMP2B	EBERs	BARFO	BARF1
I	Linfoma de Burkitt	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	Carcinoma Gástrico	+	-	-	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+
II	Carcinoma de Nasofaringe	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Doença de Hodgkin; Linfoma de células T	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
III	Doença Linfoproliferativa Pós-transplante; Linfoma não-Hodgkin associado à AIDS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
IV	Linfócitos B circulantes de indivíduos sadios portadores	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+		
Outros	Hepatocarcinoma	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	Leiomiossarcoma em indivíduos imunocomprometidos		+					-			+		

Referências ^{3,7,8,10,18,26,27,29}

Alguns efeitos da LMP-1, ainda, são motivo de controvérsias entre alguns autores. De acordo com Dolcetti et al²⁰, a LMP-1 demonstra um efeito imortalizador sob os linfócitos, decorrente da indução da expressão do oncogene bcl-2, correlação essa não observada por outros autores.^{21,22} Entretanto, a LMP-1 atua como membro da família de receptores TNF, ativando o fator transcricional NF-κB, induzindo a expressão de receptores celulares (CD40, CD23, EGFR), moléculas de adesão (CD57, ICAM-1, LFA 1 e 3) e citocinas (IL-6 e IL-10).^{10,23,24} Já a LMP-2A regula negativamente a atividade de proteínas tirosino-quinases citoplasmáticas (PTK), tais como as da família Syk. Promove a sobrevivência de linfócitos B e inibe a reativação viral.^{5,10,25} Também, pode induzir transformação em células epiteliais.⁵

O BARF1 é descrito como gene latente exclusivamente em neoplasias de origem epitelial, sendo descrito como um gene lítico precoce nas infecções de linfócitos-B. Atua como homólogo funcional do receptor do fator estimulador de colônia 1 (CSF-1) humano.¹⁰ Exerce efeitos imortalizantes em células epiteliais primárias humanas *in vitro* e induz tumorigenicidade em linhagens de fibroblastos.⁹

METODOLOGIA

Os artigos utilizados nesta revisão foram selecionados nos portais CAPES, PUBMED e SCIELO e obtidos na íntegra nos referidos portais ou solicitados por meio da BIREME, quando não disponíveis na Internet. Todos foram organizados de acordo com os sítios tumorais e sintetizados para compilação das informações, as quais foram então discutidas na atual revisão.

TÉCNICAS DE DETECÇÃO

As técnicas utilizadas para demonstrar o EBV em espécimes tumorais e que, subsequentemente, permitiram analisar a participação do referido vírus no desenvolvimento das várias neoplasias associadas, incluem: amplificação de seqüência do genoma viral através de reação em cadeia da polimerase (PCR); hibridização *in situ* (HIS), utilizando sondas complementares tanto na seqüência do genoma viral, quanto nos segmentos de RNAm viral; imunohistoquímica e imunofluorescência, utilizando anticorpos monoclonais específicos para proteínas virais expressas; Western blotting; e Southern blot.^{3,8,26}

A técnica de Southern blot é, também, aplicada para

avaliar a clonalidade do EBV encontrado nas neoplasias, a presença de infecção lítica e investigar a ocorrência de integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira.^{8,27} A clonalidade do vírus é verificada através da manutenção do número de repetições de 500pb, descritas como TR (*tandem repeat*), que se encontram nas extremidades do genoma viral. Dentro deste conceito, a verificação de uma única banda de mais de 8,0 Kpb indica a presença de epissomos com mesmo número de TR, sugerindo um padrão monoclonal do genoma viral.³ Contrariamente, a constatação de bandas de mais de 8,0 Kpb dispostas em escada aponta para um padrão policlonal. Adicionalmente, a demonstração de bandas de cerca de 4,0 Kpb indica a presença de genoma linear e subseqüentemente, infecção lítica.⁸

A associação do EBV a neoplasias de origem linfóide tem sido amplamente estudada. Contudo, os relatos da presença do referido vírus em neoplasias sólidas têm sido cada vez mais freqüentes. Segue abaixo, uma revisão da literatura existente até o momento, nos portais PUBMED, CAPES e SCIELO, concernente à associação do EBV em tumores sólidos.

EBV EM TUMORES SÓLIDOS

Carcinoma de Nasofaringe

O Carcinoma de Nasofaringe (CNF) foi a primeira neoplasia de origem epitelial a ser associada ao EBV, relatada por Wolf et al²⁸, em 1973, e, desde então, tem sido vastamente estudada no mundo. Até o momento dessa revisão, foi possível encontrar mais de 700 artigos, associando CNF e EBV no portal PUBMED. Nesses tumores, o percentual de associação com o EBV parece não apresentar variações em todas partes do mundo.⁸ Virtualmente, todos os casos de CNF indiferenciados (também descritos como linfoepitelial ou linfoepitelioma) são EBV-positivos, sendo o referido vírus pouco observado em tipos diferenciados.²³

Níveis plasmáticos elevados de DNA viral são observados em pacientes de estágio inicial e avançado de CNF, sendo sugerido que a quantificação do DNA do EBV pode ser útil no diagnóstico e monitoramento como, também, um indicador de risco para recorrência.²⁹

Nesse tipo tumoral, o EBV desenvolve uma latência do tipo II (tabela 1) e o genoma viral obtido apresenta caráter monoclonal.²³ A presença do vírus, em todas as células tumorais (detectado pela técnica de hibridização *in situ*), aliado ao elevado percentual de associação e a

monoclonalidade, é uma das principais indicações do papel tumorigênico do EBV em CNF.³⁰ Sarac et al²¹ demonstraram uma correlação positiva entre a expressão de LMP-1 e bcl-2, sendo que a expressão de bcl-2 não foi dependente da expressão de LMP-1. Adicionalmente, Niemhoma et al.³¹, verificaram uma superexpressão de bcl-2 e p53 em casos EBV-positivos, sugerindo que o vírus possa estar envolvido na regulação desses dois oncogenes, atuando como um importante fator etiológico nos CNF.

Carcinoma Gástrico

Além da função bem estabelecida do *Helicobacter pylori*, a participação do EBV no desenvolvimento de carcinoma gástrico (CG) tem sido recentemente demonstrada. A associação do vírus Epstein-Barr aos CGs apresenta uma distribuição mundial, variando de 2 - 18%.³² No Japão, o percentual de associação é de 7%, na Rússia 8,7%, na Alemanha 18%, no México 8,2% e nos Estados Unidos 16%.³³ Segundo Hausen et al⁹, o EBV também está associado a cerca de 80-100% dos carcinomas gástricos do tipo linfoepitelial.

Os carcinomas gástricos EBV-positivos desenvolvem uma latência do tipo I (tabela 1). Apesar da presença da LMP-2A não ser característica desse tipo de latência, pouca quantidade pode ser expressa em determinadas situações.^{3,9} É interessante notar que o gene LMP-1, um dos principais oncogenes conhecidos do EBV, não é expresso nesse tipo de carcinoma. No entanto, recentemente foi demonstrado que outro gene viral, o BARF1, expresso nesse tipo de neoplasia, exerce efeitos imortalizantes em células epiteliais *in vitro*, o que pode indicar uma via alternativa na oncogênese de carcinomas gástricos mediada pelo EBV.⁹

A indicação de que o EBV esteja relacionado ao processo oncogênico nos CGs, assim como nos CNFs, é baseada no significativo percentual de associação com esses tumores, bem como na presença do vírus em quase todas as células tumorais dos carcinomas gástricos EBV-positivos e o caráter monoclonal dessas células. Contudo, Hausen et al³⁴ não constataram EBV em lesões pré-neoplásicas, sugerindo a ocorrência da infecção viral após o desenvolvimento da neoplasia.

Alguns estudos apontam para ocorrência de metilação de supressores tumorais induzida pelo EBV como um dos mecanismos virais nesse processo.^{35,36,37} Um achado interessante vem dos estudos de Chong et al³⁷, no qual demonstraram que apesar da elevada freqüência de metilação encontrada nos genes p14, p15, p16, TIMP-

3, E-caderina, DAPK, GSTPi e MGMT em CGs EBV-positivos observaram a supressão da expressão de DNA metiltransferases, uma enzima responsável pela metilação do DNA, sugerindo uma via alternativa do vírus para metilação desses genes.

Neoplasias da Musculatura Lisa

A presença do EBV, também, foi relatada em leiomiomas e leiomiiossarcomas, em pacientes imunossuprimidos.³ Inicialmente, o EBV foi demonstrado nesses tumores, em crianças aidéticas, através da técnica de HIS por MacClain et al³⁸ Contudo, a análise da clonalidade do genoma viral por Southern blot revelou um caráter policlonal, sendo também observados elevados níveis de receptores CD21 na superfície das células tumorais. Adicionalmente, Lee et al²⁷, estudando três casos de tumor de músculo-liso após transplante, verificaram a expressão de EBNA-2, EBER-1 e ausência de LMP-1 e de receptores CD21. Nesse estudo, a demonstração da expressão de uma das principais oncoproteínas virais, o EBNA-2, e a origem monoclonal do genoma viral são evidências da participação do EBV no desenvolvimento desse tipo de neoplasia. Apesar dos estudos contraditórios quanto à presença do receptor CD21, a participação do EBV parece estar associada à imunossupressão, já que pacientes imunocompetentes não desenvolvem leiomiiossarcoma EBV-positivo.³

Carcinoma Intracervical

Apesar da infecção por Papilomavírus Humanos (HPV), especialmente pelos tipos 16 e 18, ser considerada atualmente o principal fator de risco para o desenvolvimento de Carcinoma Intracervical, alguns estudos têm demonstrado que o EBV possa, também, ter participação nesse processo. Landers et al³⁹, realizando HIS-DNA e PCR, verificaram a presença de EBV em 43% dos carcinomas cervicais estudados e uma menor associação em lesões pré-malignas NIC-II e NIC-III, não sendo detectado em lesões NIC-I e tecidos normais. Recentemente, Shimakage et al¹² também observaram a presença do EBV em carcinoma cervical, neoplasia cervical intra-epitelial (NIC-I, II, III) e ausência em tecido normal, utilizando as técnicas de imunofluorescência indireta para o EBNA-2 e de hibridização *in situ* com sondas complementares ao RNAm de EBNA-2 e de *Bam*HI-W. Esse último foi, também, detectado em casos de cervicite crônica, sugerindo que a expressão de *Bam*HI W isoladamente não seja capaz de induzir o desenvolvimento de neoplasias cervicais. Em contrapartida, Hording et al⁴⁰,

fazendo uso da técnica de PCR, investigaram a presença de genoma dos vírus HPV (16, 18) e EBV em espécimes de pacientes da Groelândia e Dinamarca, obtendo positividade apenas para HPV.

Mesmo com os poucos estudos, Shimakage et al¹² defendem que o EBV é um fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma cervical, independente do HPV. Ademais, a demonstração da expressão de EBNA-2 é um importante achado relativo ao papel do EBV na tumorigênese cervical, considerando alguns dos efeitos descritos dessa proteína.

Carcinoma Hepatocelular

Apesar de algumas controvérsias, alguns estudos demonstram que além do vírus da hepatite B (HBV), o vírus Epstein-Barr pode, também, estar associado à gênese do Carcinoma Hepatocelular (CHC).

Sugawara et al²⁶ detectaram a presença do genoma viral em 13/35 (37%) dos espécimes clínicos provenientes de pacientes japoneses submetidos à hepatectomia, com expressão de BARF0 e EBNA1 em apenas um pequeno percentual de células tumorais (7-13%) e ausência de EBNA-2, -3, -LP, LMP-1, LMP-2A e LMP-2B. Os EBERs que são normalmente expressos nos quatro padrões de latência (tabela 1), também não foram detectados nas amostras positivas para o EBV. Foi verificado, ainda, o caráter monoclonal do genoma viral, bem como um elevado percentual de associação do EBV com o vírus da hepatite C (9 dos 13 casos EBV-positivos), sugerindo um sinergismo entre esses vírus no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. Recentemente, Li et al⁴¹ verificaram a presença da LMP-1 em células tumorais de 15/78 casos de pacientes chineses, através de imuno-histoquímica. Nos dois referidos estudos, não foi verificada correlação significativa entre o EBV e o HBV.

Contrariamente, em estudos realizados na Holanda, Hausen et al⁴² detectaram fraca positividade para o fragmento *Bam*HI W do EBV, pela técnica de PCR-ensaio imunoenzimático em 5 das 16 amostras estudadas. Não foram observadas as expressões de EBNA-1, BARF1, LMP-1, EBERs e ZEBRA, o que, segundo os autores, se contrapõem ao papel do EBV na oncogênese hepática, levando a acreditar que o resultado fracamente positivo para o DNA viral, fosse decorrente de amplificação a partir de genoma viral presente em linfócitos infiltrados. Junying et al⁴³, analisando espécimes de CHC oriundos da Alemanha e Reino Unido, e Akhter et al⁴⁴ da América do Norte, não detectaram a presença de EBV. Nesse último estudo,

apenas HBV e/ou HCV (vírus da hepatite C) foram detectados durante a investigação.

No entanto, Chu et al⁴⁵, analisando 41 espécimes obtidos de pacientes norte-americanos, demonstraram quatro casos positivos. Dois foram evidenciados pela presença de EBER1 e ZEBRA, mas restritos a raros linfócitos do infiltrado. Os outros dois casos envolviam as células tumorais e foram caracterizados pela presença de EBNA-1 e ausência de EBER-1, EBNA-4, LMP-1 e ZEBRA, ocorrendo em pacientes de etnia asiática. Esses achados corroboram com Sugawara et al²⁶, e apontam para a possibilidade de indivíduos asiáticos serem mais suscetíveis a desenvolver CHC, quando infectados pelo EBV, o qual atuaria como co-fator nesse processo.

Câncer da Mama

Os primeiros a relatarem a presença do EBV, em câncer da mama, foram Labrecque et al⁴⁶, os quais utilizando a técnica de PCR, amplificando as regiões BamHI W e BamHI C, obtiveram 19/91 (21%) casos positivos. Subseqüentemente, empregando as técnicas de HIS, nos 19 casos positivos, obtiveram 12 (63%) casos com células tumorais marcadas, quando utilizando sondas complementares à seqüência de DNA viral e 6 (31,5%) casos, quando utilizando sondas para EBER-1.

Bonnet et al⁴⁷, através de PCR, demonstraram a presença de EBV em 51 de 100 casos de carcinoma invasivo primário da mama. Tomando alguns espécimes positivos, puderam constatar através de imuno-histoquímica, a expressão de EBNA-1 em uma fração de células tumorais e a ausência da expressão de EBERs, através da técnica de HIS. Recentemente, Grinstein et al⁴⁸ observaram a presença de EBV em 14/33 (42%) carcinomas, através de PCR e imuno-histoquímica, caracterizados também pela expressão de EBNA-1 e ausência de LMP-1, ZEBRA e EBER-1. Adicionalmente, o EBV foi detectado em lesões pré-malignas, o que aponta para a participação do vírus na carcinogênese mamária. Tanto Bonnet et al⁴⁷ como Grinstein et al⁴⁸ não analisaram a clonalidade do genoma viral, o que poderia fornecer mais evidências referentes ao papel do EBV no desenvolvimento desses tumores. Mais recentemente, Ribeiro-Silva et al⁴⁹, empregando imuno-histoquímica, demonstraram positividade para EBNA-1 em 32/85 (37,6%) casos de carcinoma da mama em pacientes brasileiras, sendo mais freqüentemente associado a carcinomas ductais pouco diferenciados. Não sendo observada a expressão de EBNA-1 em fibroadenomas e tecidos normais.

Os estudos de Chu et al⁵⁰ e Herrmann & Niedobitek⁵¹

são contrários aos anteriormente citados. Esses autores, fazendo uso das técnicas de HIS-EBER e imuno-histoquímica para EBNA-1, não detectaram os referidos expressos virais em nenhum dos espécimes estudados, sugerindo que os dois referidos genes não estivessem sendo expressos. Adicionalmente, Herrmann & Niedobitek⁵¹ obtiveram positividade em quatro dos 59 casos estudados, fazendo uso da técnica de PCR. Contudo, nesse caso é possível que a positividade tenha sido decorrente de amplificação, a partir de linfócitos infectados presentes no infiltrado, e ao considerar o elevado percentual de positividade observado por Bonnet et al⁴⁷, é possível que esse último evento também tenha ocorrido em seus experimentos.

Câncer de Pulmão

O EBV tem sido também associado a carcinoma pulmonar do tipo linfóepitelioma (LELC). As primeiras evidências de sua participação decorrem de estudos de Pittaluga et al⁵², em cinco pacientes chineses, nos quais foi demonstrada a presença do EBV, através da técnica de HIS, apenas em células epiteliais. Sendo essa infecção de caráter monoclonal.

Corroborando esses achados, Wong et al⁵³ observaram a presença de EBV (através de HIS-EBER) de caráter monoclonal em nove dos 167 casos (5,4%) de carcinoma pulmonar do tipo linfóepitelioma em pacientes chineses. Ademais, foram observadas a presença de LMP-1 e ausência de EBNA-2 em 4 dos 9 casos, através da técnica de imuno-histoquímica. Recentemente, Grinstein et al⁴⁸, estudando 54 casos de carcinomas, observaram positividade para EBNA-1 em quatro casos (7,4%), sendo a positividade restrita a apenas uma fração das células tumorais (5-30%).

Contrariamente, Castro et al⁵⁴, utilizando a técnica de hibridização in situ para EBERs, não demonstraram EBV em nenhum dos seis casos de LELC obtidos de pacientes ocidentais, sugerindo que o EBV é mais freqüentemente demonstrado em casos de câncer pulmonar de indivíduos asiáticos. Entretanto, o "n" estudado pelo referido autor foi insuficiente, considerando que em estudos prévios o EBV demonstrou baixa freqüência de associação.

Carcinoma de Glândula Salivar

A presença do EBV tem sido também demonstrada em carcinoma de glândula salivar. Raab-Traub et al³⁰ verificaram, através da técnica de HIS, a expressão de RNAm de LMP-1, BARF-0 e EBER-1 em carcinoma indiferenciado de glândulas parótidas, limitado ao tecido

tumoral. É importante ressaltar, que o EBV é frequentemente observado nesse sítio desenvolvendo infecção lítica, contudo, não foi verificada a presença de formas lineares. Posteriormente, Leung et al⁵⁵ relataram HIS-EBER fortemente positiva e presença de LMP-1, através de imuno-histoquímica, em 10/10 (100%) casos de carcinoma linfoepitelial de glândulas salivares. Em ambos os estudos, o caráter monoclonal do genoma viral foi demonstrado.

Carcinoma Oral

O EBV, também, tem sido demonstrado em carcinoma oral de células escamosas.⁵⁶⁻⁶¹ Na maioria desses, foi verificado um elevado percentual de associação, variando de 25 a 86%, utilizando a técnica de PCR. Entretanto, Higa et al¹⁴ verificaram a expressão de LMP-1, EBNA-2 (através de imuno-histoquímica) e EBER1 (através de HIS) em 49/95 (51%) casos de pacientes japoneses. Enquanto, Kobayashi et al⁶² e Gonzalez-Moles et al⁶³ demonstraram a presença da LMP-1, através de imuno-histoquímica, respectivamente em 6/46 (13%) e 15/78 (19,2%) dos casos estudados. Em ambos trabalhos, a HIS-EBER foi negativa. Contudo, Shimakage et al⁶⁴ verificaram a expressão de EBER1 em 16/24 (66,6%) casos, através de HIS.

Achados conflitantes vêm do estudo de Cruz et al⁶¹, que, analisando 36 casos PCR-positivo, constataram a não expressão dos transcritos EBNA-1, EBNA-2, LMP-1, LMP-2, BHRF1 e BARF0, através da técnica de RT-PCR. As reações de imuno-histoquímica para ZEBRA, EBNA-1 e LMP-1, também foram negativas.

Apesar de controversos, os estudos denotam que o EBV pode estabelecer infecção latente com expressão de genes latentes em células de carcinoma oral, indicando que o mesmo possa participar no desenvolvimento deste tipo neoplásico ou, como sugerido por Sand et al⁵⁹, atuar junto de fatores de risco conhecidos, tais como fumo e consumo de álcool.

Outras Neoplasias Associadas

Leung et al⁶⁵ verificaram a expressão de EBER, através de HIS, em sete de 29 casos de carcinoma sinonasal de pacientes chineses, sendo que dois dos sete casos positivos também expressavam LMP-1. Esses mesmos autores descreveram a presença do vírus em um caso de carcinoma indiferenciado de glândula lacrimal.⁶⁶ Shimakage et al⁶⁷ relataram a expressão de EBNA-2, LMP-1 e EBERs em 27/27 (100%) de tumores testiculares. Grinstein et al⁴⁸ demonstraram o EBV em um dos 19 casos de carcinoma de cólon, com uma fração

de células tumorais expressando EBNA-1. Também, verificaram EBV em sete de 19 amostras de câncer prostático de diversos graus de malignidade, com núcleos das células tumorais fortemente marcados. Kekis et al⁶⁸ relataram a presença de EBV, através da técnica de HIS-EBER, em apenas um caso de carcinoma linfoepitelial pancreático. No estudo realizado por Leung et al⁶⁹, 2/7 casos de carcinoma de ouvido médio (respectivamente, carcinoma de células escamosas não-queratinizado e carcinoma indiferenciado) foram positivos para EBER. A análise, através de imuno-histoquímica, demonstrou ausência de LMP-1 e EBNA-2, ambos os casos apresentavam histologia compatível com o tipo linfoepitelioma.

CONCLUSÕES

A associação do vírus Epstein-Barr a muitas das neoplasias sólidas, tem sido demonstrada em estudos recentes, o que justifica a pouca quantidade de literatura e as evidências algumas vezes inconclusivas a respeito da participação viral no processo oncogênico de alguns tumores. Entretanto, a verificação da clonalidade do EBV, na maioria desses tumores, sugere que as infecções tenham precedido o processo tumorigênico, apontando fortemente para a participação do vírus nesse processo. A detecção de EBV policlonal ou a expressão parcial de antígenos virais, em apenas uma fração das células, podem sugerir mecanismos distintos no processo tumorigênico. Bonnet et al⁴⁷ e Hausen et al³⁴ atribuem a expressão de EBNA-1, em apenas uma fração de células tumorais, relatada em alguns trabalhos, a uma baixa expressão dessa proteína ou uma menor sensibilidade da técnica por alguns autores. Entretanto, como discorrido por Ambinder⁷⁰, esse fenômeno pode ser decorrente da perda do genoma viral durante o processo tumorigênico, decorrente de um mecanismo viral do tipo "hit and run".

Um achado interessante refere-se a maior frequência de alguns tipos tumorais EBV-positivos em indivíduos de etnia asiática, sugerindo que fatores comportamentais e genéticos contribuam para o desenvolvimento dessas neoplasias. A imunossupressão, assim como nas doenças linfoproliferativas pós-transplante (DLPT) e linfomas não-Hodgkin, em pacientes aidéticos, parece favorecer o desenvolvimento de neoplasias sólidas associadas ao EBV, particularmente os leiomiomas e leiomiossarcomas, permitindo a disseminação do vírus para diversos tecidos, bem como a expressão de vários genes latentes nas células portadoras.

A diversidade de padrões de expressão de genes latentes observados denota a complexidade da infecção pelo EBV. Evidências da heterogeneidade de expressão do EBV associadas ao tecido infectado vêm com os estudos de Sugawara et al²⁶ e Chu et al⁴⁵ referentes a CHC e os de Bonnet et al⁴⁷ e Grinstein et al⁴⁸, relativos a câncer da mama. Os achados desses autores apresentaram características comuns: a presença de EBNA-1 e ausência de EBERs e apontam para a possibilidade de que o EBV estabeleça uma infecção latente com padrão semelhante nesses dois tipos neoplásicos, diferindo de todos os padrões já conhecidos, pela ausência de EBERs.

Devido a essa diversidade de expressão, é possível que o vírus esteja associado a neoplasias de outros sítios, mas não tenha sido detectado pela falta de expressão do alvo da técnica empregada. Em alguns estudos, observa-se a necessidade de mais de uma abordagem técnica para confirmação da frequência do EBV. A presença do vírus nos infiltrados linfocíticos, também, deve ser considerada quando se usa a técnica de PCR. Essa técnica, entretanto, torna-se uma ferramenta importante para detecção em tumores, em que não se tem conhecimento do padrão de latência. Associada à hibridização *in situ* e à imuno-histoquímica, pode posteriormente confirmar e estabelecer o padrão de latência. O comportamento do EBV e o mecanismo pelo qual contribui para o seu desenvolvimento em algumas neoplasias, ainda requerem mais estudos, mas certamente possuem participação relevante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fundamental Virology*. 3th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 1109-63.
- Callan MF. The immune response to Epstein-Barr virus. *Microbes Infect*. 2004;6(10):937-45.
- Tsuchiya S. Diagnosis of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002;44(3):227-38.
- Hsieh WS, Lemas MV, Ambinder RF. The biology of Epstein-Barr virus in post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis*. 1999;1(3):204-12.
- Murray PG, Young LS. Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med*. 2001;15:1-20.
- Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *J Mol Diagn*. 2001;3(1):1-10.
- Okano M. Haematological associations of Epstein-Barr virus infection. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 2000;13(2):199-214.
- Ambinder RF, Mann RB. Detection and characterization of Epstein-Barr virus in clinical specimens. *Am J Pathol*. 1994;145(2):239-52.
- 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 BARTF1 gene. *Cancer Res*. 2000;60(10):2745-8.
- Ohga S, Nomura A, Takada H, Hara T. Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002;44(3):203-15.
- Chuang TC, Way TD, Lin YS, Lee YC, Law SL, Kao MC. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 may act as a transforming suppressor of the HER2/neu oncogene. *FEBS Lett*. 2002;532:135-42.
- Shimakage M, Sasagawa T. Detection of Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen-2 mRNA by *in situ* hybridization. *J Virol Methods*. 2001;93(1-2):23-32.
- Kaiser C, Laux G, Eick D, Jochner N, Bornkamm GW, Kempkes B. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol*. 1999;73(5):4481-4.
- Higa M, Kinjo T, Kamiyama K, Iwamasa T, Hamada T, Iyama K. Epstein-Barr virus (EBV) subtype in EBV related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island, in southern Japan, compared with Kitakyushu and Kumamoto in mainland Japan. *J Clin Pathol*. 2002;55:414-23.
- Niller HH, Salamon D, Ilg K, Koroknai A, Banati F, Schwarzmann F, et al. EBV-associated neoplasms: alternative pathogenetic pathways. *Med Hypotheses*. 2004;62(3):387-91.
- Cludts I, Farrell PJ. Multiple functions within the Epstein-Barr virus EBNA-3A protein. *J Virol*. 1998;72(3):1862-9.
- Knecht H, Berger C, al-Homsi AS, McQuain C, Brousset P. Epstein-Barr virus oncogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1997;26(2):117-35.
- Takada K, Nanbo A. The role of EBERs in oncogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2001;11(6):461-7.
- Niller HH, Salamon D, Ilg K, Koroknai A, Banati F, Bauml G, et al. The *in vivo* binding site for oncoprotein c-Myc in the promoter for Epstein-Barr virus (EBV) encoding RNA (EBER) 1 suggests a specific role for EBV in lymphomagenesis. *Med Sci Monit*. 2003;9(1):HY1-9.
- Dolcetti R, Boiocchi M. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Biomed Pharmacother*. 1998;52:13-25.
- Sarac S, Akyol U, Kanbur B, Pouraz A, Akyol G, Yilamz T, et al. Bcl-2 and LMP1 Expression in Nasopharyngeal Carcinomas. *Am J Otolaryngol*. 2001; 22(6):377-82.
- Tao Q, Srivastava G, Loke SL, Ho FC. Lack of correlation between expression of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein and bcl-2 oncoprotein *in vivo*. *J Clin Pathol*. 1994;47(7):589-91.

23. Raab-Traub N. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(6):431-41.
24. Niedobitek G. Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Mol Pathol.* 2000;53(5):248-54.
25. Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2001 Oct;1(1):75-82.
26. Sugawara Y, Mizugaki Y, Uchida T, Torii T, Imai S, Makuuchi M, et al. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in hepatocellular carcinoma tissue: a novel EBV latency characterized by the absence of EBV-encoded small RNA expression. *Virology.* 1999 Apr 10;256(2):196-202.
27. Lee ES, Locker J, Nalesnik M, Reyes J, Jaffe R, Alashari M, et al. The association of Epstein-Barr virus with smooth-muscle tumors occurring after organ transplantation. *N Engl J Med.* 1995 Jan 5;332(1):19-25.
28. Wolf H, zur Hausen H, Becker V. EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature.* 1973;244:245-7.
29. Fan H, Gulley ML. Epstein-Barr viral load measurement as a marker of EBV-related disease. *Mol Diagn.* 2001 Dec;6(4):279-89.
30. Raab-Traub N, Rajadurai P, Flynn K, Lanier AP. Epstein-Barr virus infection in carcinoma of the salivary gland. *J Virol.* 1991 Dec;65(12):7032-6.
31. Niemhom S, Kitazawa S, Murao S, Kunachak S, Maeda S. Co-expression of p53 and bcl-2 may correlate to the presence of Epstein-Barr virus genome and the expression of proliferating cell nuclear antigen in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* 2000 Nov 28;160(2):199-208.
32. Chang MS, Kim HS, Kim CW, Kim YI, Lan Lee B, Kim WH. Epstein-Barr virus, p53 protein, and microsatellite instability in the adenoma-carcinoma sequence of the stomach. *Hum Pathol.* 2002 Apr;33(4):415-20.
33. Koriyama C, Akiba S, Iriya K, Yamaguti T, Hamada GS, Itoh T, et al. Epstein-Barr Virus-associated Gastric Carcinoma in Japanese Brazilians and Non-Japanese Brazilians. *Jpn J Cancer Res.* 2001 Sep;92: 911-7.
34. zur Hausen A, van Rees BP, van Beek J, Craanen ME, Bloemena E, Offerhaus GJ, et al. Epstein-Barr virus in gastric carcinomas and gastric stump carcinomas: a late event in gastric carcinogenesis. *J Clin Pathol.* 2004 May;57(5):487-91.
35. Kang GH, Lee S, Kim WH, Lee HW, Kim JC, Rhyu MG, et al. Epstein-Barr virus-Positive Gastric Carcinoma Demonstrates Frequent Aberrant Methylation of Multiple Genes and Constitutes CpG Island Methylator Phenotype-Positive Gastric Carcinoma. *Am J Pathol.* 2002;160(3):787-94.
36. Osawa T, Chong JM, Sudo M, Sakuma K, Uozaki H, Shibahara J, et al. Reduced expression and promoter methylation of p16 gene in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 2002 Nov;93(11):1195-200.
37. Chong JM, Sakuma K, Sudo M, Ushiku T, Uozaki H, Shibahara J, et al. Global and non-random CpG-island methylation in gastric carcinoma associated with Epstein-Barr virus. *Cancer Sci.* 2003 Jan;94(1):76-80.
38. McClain KL, Leach CT, Jenson HB, Joshi VV, Pollock BH, Parmley RT, et al. Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in children with AIDS. *N Engl J Med.* 1995 Jan 5;332(1):12-8.
39. Lander RJ, O'Leary JJ, Crowley M, Healy I, Annis P, Burke L, et al. Epstein-Barr virus in normal, pre-malignant, and malignant lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol.* 1993 Oct;46(10):931-5.
40. Hording U, Daugaard S, Bock JE. Human papillomavirus, Epstein-Barr virus, and cervical carcinoma in Greenland. *Int J Gynecol Cancer.* 1992 Nov;2(6):314-7.
41. Li W, Wu BA, Zeng YM, Chen GC, Li XX, Chen JT, et al. Epstein-Barr virus in hepatocellular carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 2004;10(23):3409-3413.
42. zur Hausen A, van Beek J, Bloemena E, ten Kate FJ, Meijer CJ, van den Brule AJ. No role for Epstein-Barr virus in Dutch hepatocellular carcinoma: a study at the DNA, RNA and protein levels. *J Gen Virol.* 2003 Jul;84(Pt 7):1863-9.
43. Junying J, Herrmann K, Davies G, Lissauer D, Bell A, Timms J, et al. Absence of Epstein-Barr virus DNA in the tumor cells of European hepatocellular carcinoma. *Virology.* 2003 Feb 15;306(2):236-43.
44. Akhter S, Liu H, Prabhu R, DeLuca C, Bastian F, Garry RF, et al. Epstein-Barr virus and human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2003 Mar 20;192(1):49-57.
45. Chu PG, Chen YY, Chen W, Weiss LM. No direct role for Epstein-Barr virus in American hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol.* 2001 Oct;159(4):1287-92.
46. Labrecque LG, Barnes DM, Fentiman IS, Griffin BE. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. *Cancer Res.* 1995 Jan 1;55(1):39-45.
47. Bonnet M, Guinebretiere JM, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, et al. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Aug 18;91(16):1376-81.
48. Grinstein S, Preciado MV, Gattuso P, Chabay PA, Warren WH, De Matteo E, et al. Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites. *Cancer Res.* 2002 Sep 1;62(17):4876-8.
49. Silva AR, Ramalho LN, Garcia SB, Zucoloto S. Does the correlation between EBNA-1 and p63 expression in breast carcinomas provide a clue to tumorigenesis in Epstein-Barr virus-related breast malignancies? *Braz J Med Biol Res.* 2004 Jan;37(1):89-95.
50. Chu JS, Chen CC, Chang KJ. In situ detection of Epstein-Barr virus in breast cancer. *Cancer Lett.* 1998 Feb 13;124(1):53-7.
51. Herrmann K, Niedobitek G. Lack of evidence for an association of Epstein-Barr virus infection with breast carcinoma. *Breast Cancer Res.* 2003;5(1):13-7.
52. Pittaluga S, Wong MP, Chung LP, Loke SL. Clonal Epstein-

- Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol*. 1993; 17(7):678-82.
53. Wong MP, Chung LP, Yuen ST, Leung SY, Chan SY, Wang E, et al. In situ detection of Epstein-Barr virus in non-small cell lung carcinomas. *J Pathol*. 1995;177(3):233-40.
 54. Castro CY, Ostrowski ML, Barrios R, Green LK, Popper HH, Powell S, et al. Relationship between Epstein-Barr virus and lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung: a clinicopathologic study of 6 cases and review of the literature. *Hum Pathol*. 2001;32(8):863-72.
 55. Leung SY, Chung LP, Yuen ST, Ho CM, Wong MP, Chan SY. Lymphoepithelial carcinoma of the salivary gland: in situ detection of Epstein-Barr virus. *J Clin Pathol*. 1995 Nov;48(11):1022-7.
 56. Mao E, Smith C. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in oral smears from healthy individuals and patients with squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 1993;22:12-7.
 57. D'Costa J, Saranath D, Sanghvi V, Mehta A. Epstein-Barr virus in tobacco-induced oral cancers and oral lesions in patients from India. *J Oral Pathol Med*. 1998;27:78-82.
 58. Gonzalez-Moles MA, Galindo P, Gutierrez J, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avilla I, Sanchez-Fernandez E. Expression of the p53 protein in oral squamous cell carcinomas associated with Epstein-Barr virus. *Microbios*. 2000;102(403):147-54.
 59. Sand LP, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. 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*. 2002 May;93(5):586-92.
 60. Szkaradkiewicz A, Kruk-Zagajewska A, Wal M, Jopek A, Wierzbicka M, Kuch A. Epstein-Barr virus and human papillomavirus infections and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Clin Exp Med*. 2002 Nov;2(3):137-41.
 61. Cruz I, Van Den Brule AJ, Brink AA, Snijders PJ, Walboomers JM, Van Der Waal I, et al. No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels. *Int J Cancer*. 2000;86:356-61.
 62. Kobayashi I, Shima K, Saito I, Kiyoshima T, Matsuo K, Ozeki S, et al. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 1999;189:34-9.
 63. Gonzalez-Moles MA, Gutierrez J, Rodriguez MJ, Ruiz-Avilla I, Rodriguez-Archilla A. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) expression in oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 2002 Mar;112(3):482-7.
 64. Shimakage M, Horii K, Tempaku A, Kakudo K, Shirasaka T, Sasagawa T. Association of Epstein-Barr virus with oral cancers. *Hum Pathol*. 2002 Jun;33(6):608-14.
 65. Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Kwong WK, Wong MP, Chan SY. Epstein-Barr virus is present in a wide histological spectrum of sinonasal carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 1995 Sep;19(9):994-1001.
 66. Leung SY, Chung LP, Ho CM, Yuen ST, Wong MP, Kwong WK. An Epstein-Barr virus positive undifferentiated carcinoma in the lacrimal sac. *Histopathology*. 1996 Jan;28(1):71-5.
 67. Shimakage M, Oka T, Shinka T, Kurata A, Sasagawa T, Yutsudo M. Involvement of Epstein-Barr virus expression in testicular tumors. *J Urol*. 1996 Jul;156(1):253-7.
 68. Kekis PB, Murtin C, Kunzli BM, Kappler A, Buchholz B, Buchler MW, et al. Epstein-Barr virus-associated lymphoepithelial carcinoma in the pancreas. *Pancreas*. 2004 Jan;28(1):98-102.
 69. Leung SY, Yuen ST, Ho CM, Kwong WK, Chung LP. Presence of Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinoma of the middle ear. *J Clin Pathol*. 1998;51:602-605.
 70. Ambinder RF. Gammaherpesviruses and "Hit-and-Run" oncogenesis. *Am J Pathol*. 2000 Jan;156(1):1-3.