

## EDITORIAL

### Virus de Epstein Barr y Neoplasia

Uno de los temas más intrigantes de nuestra época en el campo científico, ha sido el de las enfermedades neoplásicas, y dentro de "este, la biología de la célula tumoral, los posibles agentes etiológicos y la respuesta del huésped contra el tumor, constituyen los tópicos más estudiados hasta el momento.

Los resultados de estas investigaciones han demostrado que el cancer, al menos desde el punto de vista experimental es una entidad compleja, producto de diversos factores como: un agente, un huésped ( con un marcado fondo genético ) y un medio ambiente; los cuales al interactuar en una forma determinada pueden hacer que una célula normal se convierta en tumoral. Se han postulado agentes físicos, tales como radiaciones de alta energía; químicos, como algunos compuestos cíclicos y biológicos como algunos virus.

En los animales estos tres tipos de agentes etiológicos del cáncer ya han sido comprobados, mientras que en los humanos se ha sospechado principalmente de los virus sin haber hallado hasta el presente pruebas totalmente concluyentes. Es así como el virus herpes simple tipo 2 ( HSV2 ) ha sido estudiado en relación con el Carcinoma de cuello uterino y otro tipo de virus herpes (1), el virus de Epstein Barr ( EBV ), al hallarse asociado con dos entidades malignas: El Linfoma de Burkitt ( BL ) y el Carcinoma Nasofaríngeo ( NPC ) ha sido intensamente estudiado.

El Linfoma de Burkitt ( BL ) fue descrito en 1961 por Burkitt y O' Connor (2), como una entidad linfoproliferativa maligna, con un área endémica en el Africa Central y una alta incidencia en la primera década de la vida.

Las células de éste tumor pudieron ser artificialmente adaptadas a un prolongado cultivo in vitro y convertidos en líneas celulares permanentes, es decir, que a diferencia de otras células de su misma característica histológica, que en cultivo presentan un periodo de proliferación limitado y posteriormente mueren, las células del BL se multiplican en forma ilimitada, por la cual se les ha denominado líneas celulares " inmortales".

En 1965 Epstein y col. encontraron partículas virales en estos cultivos celulares (3) y este virus, llamado de Epstein Barr (EBV) en honor a sus descubridores, presentaba características muy similares a las de los virus de herpes en Microscopía Electrónica; posteriormente se encontraron además, en los sueros de pacientes con BL africano.

títulos elevados de anticuerpos dirigidos contra el EBV y anticuerpos en títulos considerables contra distintos antígenos celulares determinados por el virus, en las células malignas de BL, los cuales, aparentemente, eran el resultado de la infección de los linfocitos por el EBV ( 4 - 8 ).

Estudios realizados por zur Hausen y Schulze- Holthausen (9) en 1970 revelaron que el ácido desoxirribonucleico (DNA) del EBV estaba incorporado en el núcleo de las células del BL africano y en las líneas celulares linfoblastoides establecidas a partir de biopsias de este linfoma ( BL ). Trabajos similares en NPC mostraron altos niveles séricos de anticuerpos contra EBV y también DNA del virus incorporado en el núcleo de las células epiteloides malignas, pero solamente en NPC anaplásico y pobremente diferenciado (10).

En 1968 Henle (11), gracias a un hallazgo fortuito, postuló al EBV como agente etiológico de la Mononucleosis Infecciosa ( IM ), al estudiar 2 muestras de sueros de una de sus tecnólogas: Una tomada antes de que sufriera IM no presentaba anticuerpos contra EBV y otra obtenida después de la enfermedad, los presentaba a títulos altos. Estudios prospectivos llevados a cabo por el mismo autor, en un grupo de estudiantes, comprobaron al EBV o un virus relacionado, como el agente etiológico de la IM ( 12 ). Estos estudios mostraron el papel protector de los anticuerpos contra el EBV ya que sólo algunos de los estudiantes que eran seronegativos es decir sin anticuerpos contra EBV, pudieron sufrir IM, mientras que ninguno de los seropositivos presentó la enfermedad. Además, la transfusión de sangre contaminada con EBV a un individuo seronegativo le hizo sufrir la enfermedad y lo convirtió en seropositivo.

#### Virus de Epstein Barr

El EBV, es un virus de forma esférica, mide 100 mm. de diámetro y pertenece al grupo de los virus herpes. Consta de una cubierta, una nucleocapside y un tegumento. Su genoma está constituido por un DNA linear de doble cadena ( 13 ). Es el agente causal de IM (12 ) y tiene la capacidad de transformar los linfocitos B ( dependientes de la medula ósea) de los humanos y de algunos simios ( 14 ) en líneas celulares de crecimiento permanente (15 - 18 ) y de inducir en estas células antígenos determinados por el mismo virus ( 4 - 8 ); en el mono lechuza el EBV puede inducir un tumor linforreticular, en forma directa ( 19 ).

Existen por lo menos dos cepas distintas de EBV en base a características biológicas ( 20 ). Una cepa (21 ), la B95 - 8, tiene la capacidad de transformar los linfocitos B ( 22 ) mientras que la otra cepa ( 23 ), la P3-HRI, no presenta esta capacidad, ya que al infectar la célula, la induce a sintetizar partículas virales completas

con la consecuente muerte celular ( 24 ). Al estudiar ambos genomas virales, se observó que el DNA del B95-8 es más corto y no tiene una determinada secuencia de nucleótidos ( 25 ) siendo por consiguiente un virus defectivo o una variante anormal. El EBV aislado por medio de lavados de garganta en pacientes con IM en su fase más aguda, presenta características biológicas semejantes al de la cepa B95-8 es decir es un virus que presenta la capacidad de inducir transformación celular ( 26 ) en células anormales.

El DNA del EBV se puede encontrar en dos formas en el núcleo de las células transformadas: integrado al genoma celular, o como un círculo de doble cadena unido covalentemente al mismo ( 27 ). Además se cree que en los individuos seropositivos el EBV permanece latente en el tejido linfoide por un tiempo muy prolongado o durante toda la vida ( 28 ).

#### Características de las líneas celulares linfoides

Las líneas celulares linfoides (LCL) "inmortales" pueden ser obtenidas (1,29) a partir de cultivo de biopsias de BL (llamándoseles líneas del linfoma de Burkitt, BLL) o mediante el cultivo de linfocitos de individuos seropositivos (28), llamándose líneas celulares linfoblastoides ( LCL ).

También pueden obtenerse ( 28 ) frecuentemente LCL infectando linfocitos del cordón umbilical del recién nacido con EBV de la cepa B95-8. El virus infecta los linfocitos B ( 14 ) por intermedio de una proteína de membrana de las células, que actúa como receptor para el EBV ( 30 ) y que está íntimamente relacionado con otra proteína ( 31 ) que es el receptor para el factor 3 del Complemento o reaptor C'3, haciendo que la célula linfoide madura, con escaso citoplasma, al tener incorporado en su núcleo el DNA del EBV o genoma viral, se transforma en linfoblasto, una célula más grande y con una mayor proporción de citoplasma. Este linfocito así transformado adquiere una capacidad mitótica que le va a permitir la proliferación ilimitada y por lo tanto la inmortalidad.

Estos dos tipos de líneas, BLL y LCL, presentan entonces el DNA del EBV incorporado en sus núcleos ( 9, 32 ) y se ha observado que tanto las LCL como las BLL pueden tener un comportamiento maligno si se trasplantan a otras especies en determinadas condiciones de inmunosupresión ( 33 ). Sin embargo las células de BLL y LCL presentan diferencias importantes: el primer tipo de líneas (BLL) tiene origen monoclonal, es decir, todas sus células son derivadas de una sola célula transformada ( 34 ), mientras que en LCL, las células son de origen policlonal, o sea derivadas de varias células, y de allí su mayor diferencia morfológica ( 35 ). Al hacer estudios de citogenética ( 36 - 38 ) se ha observado que la mayoría de las células de BLL presentan una serie de marcadores genéticos consistentes en una translocación 8q<sup>-</sup>, 14q<sup>+</sup>, es decir que un fragmento del material genético del brazo largo del cromosoma 8 se ha pasado

al brazo largo del cromosoma 14. Un fenómeno semejante ocurre con el cromosoma Philadelphia ( Ph1) en la leucemia mieloide crónica. Estos cambios citogenéticos no se encuentran en LCL y sus células son normalmente diploides, aunque no siempre ( 39 ), pero sin observarse en ellas la translocación  $8q^-, 14q^+$ .

#### Mononucleosis Infecciosa

La Mononucleosis infecciosa (IM) es una enfermedad infecciosa aguda, causada (11) por el EBV, que ataca principalmente a niños y adultos jóvenes; caracterizada clínicamente por fiebre, linfadenopatías generalizadas, esplenomegalia y faringitis; en la sangre periférica se encuentran linfocitos atípicos y en suero títulos altos de anticuerpos heterófilos, dirigidos, por ejemplo contra eritrocitos de carnero. Y otros antígenos de distintas especies animales. Es considerada como una entidad linfoproliferativa benigna, autolimitada, en donde, en los individuos convalecientes se encuentra inmunidad dirigida no sólo contra el EBV, sino también contra las células transformadas por el virus, potencialmente malignas ( 33 ).

Al hacer estudios serológicos se ha encontrado que la gran mayoría de los adultos son seropositivos para EBV, esto es, presentan anticuerpos contra el virus, mostrando una distribución mundial del virus ( 40,41 ), ya que una gran parte de la población presenta la infección sin ninguna característica clínica aparente, pero convirtiéndose seropositiva.

La incidencia de IM está relacionada con la situación socio-económica, en general la sufren sólo los adolescentes de nivel socio-económico aceptable; la mayoría de los niños de estratos socio-económicos bajos son infectados sin presentar la enfermedad adquiriendo desde muy pequeños la inmunidad contra el EBV ( 42 - 44 ) y tal vez portando el mismo desde etapas tempranas de la vida en forma latente.

Se ha hallado que los linfocitos atípicos que se observan en esta entidad son T ( timo dependientes ) en su mayoría y que muy posiblemente son el resultado de la respuesta inmune contra los linfocitos B transformados por el EBV ( 45,46 ).

Existen cinco entidades malignas en las cuales se encuentran niveles altos de anticuerpos contra EBV, ellas son: BL, NPC, Enfermedad de Hodgkin ( HD ), Leucemia Linfocítica Crónica (CLL) y Linfoma Linfocítico (LL) ( 47-50 ). Se ha observado ( 51 ) que solo el BL, pero del tipo Africano, y el NPC anaplásico o pobremente diferenciado presentan en todos los pacientes títulos altos de anticuerpos contra EBV ( aproximadamente unas 10 veces mayores que en la población control) mientras que en las otras tres entidades ( HD, CLL y LL ) los resultados no son tan constantes y los títulos son solamente de una a cuatro veces mayores que en la población control. Estos datos sumados al hecho de que el DNA

del EBV está presente en los núcleos de las células de BL y NPC y no constantemente en el HD, CLL y LL; han sugerido un tipo de asociación distinta para con el virus ( 52, 53 ).

#### Linfoma de Burkitt

Este tumor linfoproliferativo maligno que ataca principalmente el maxilar inferior, órbitas, ovarios y región retroperitoneal, tiene un patrón microscópico que ha sido llamado de "cielo estrellado", debido a que sobre la población de células linfoblastoides aparecen algunos macrófagos. Es además una neoplasia muy sensible a la quimioterapia y a la radiación; tanto que se puede considerar curable en la gran mayoría de los casos.

En 1969 Burkitt postuló una estrecha correlación entre la incidencia de BL y malaria, basándose en: a ) la distribución endémica común para ambas entidades, b) la semejanza entre la edad de mayor incidencia del tumor y la de mayor parasitemia por el plasmodio y c) disminución de la incidencia de BL por tratamiento antimalárico. Cierta soporte experimental a esta hipótesis se ha obtenido al observar que la estimulación crónica del sistema inmunitario y y reticuloendotelial, como en el caso de la malaria, induce la aparición de linfomas en ratones y también que la infección por plasmodium aumenta la susceptibilidad a infecciones por virus oncogénicos en algunos animales de experimentación ( 54 )

#### Antígenos determinados por el EBV

Estos antígenos se encuentran en las células de BL, NPC, IM, BLL y LCL pero no siempre están todos presentes y son: a) Antígeno nuclear (EBNA o Epstein Barr Nuclear Antigens), determinado por EBV. b) antígeno soluble (S), c) antígeno temprano (EA o Early Antigen), d) antígeno de membrana (MA o Membrane Antigen) y e) antígeno de capsida viral (VCA o Viral Capside Antigen), se detectan mediante anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes con BL, NPC o IM mediante técnicas de inmunofluorescencia, citotoxicidad o precipitación en geles, principalmente (55).

a) EBNA: Este antígeno descubierto por Reedman y Klein (8) en 1973 tiene una localización nuclear y se relaciona estrechamente con la presencia del DNA del EBV en el núcleo de la célula transformada (56,57)., Es una proteína de los cromosomas (8) alterada por virus, que tiene tres características principales. 1) se correlaciona en forma marcada con la presencia del genoma viral (56,57), 2) en el núcleo de las células EBNA positivas, el genoma viral se presenta en varias copias (57,58) y 3) el EBNA sólo se ha encontrado en dos entidades malignas: BL y NPC anaplásico (52,53).

Aproximadamente, el 97% de BLL son EBNA positivas, es decir, llevan incorporado el DNA del EBV, pero existe una línea de BLL, la BJA-B, derivada de un BL Africano que es EBNA negativa (74)

en donde tampoco se han encontrado por diferentes métodos, copias del genoma viral del EBV.

A diferencia de los BL Africanos, la mayoría de los Burkitt-like o BL no africanos, (americanos, europeos y asiáticos), son EBNA negativos aun cuando a partir de 1976 se han identificado dos BL no africanos (americanos) que son EBNA positivos (59). Así pues la mayoría de los BL africanos son EBNA positivos esto es llevan una o varias copias de EBV en el núcleo, a diferencia de los BL no Africanos, (americanos, principalmente) en donde la gran mayoría son EBNA negativos o sea el EBV no se encuentra presente.

b) Antígeno S: este antígeno soluble, encontrado por Old y col. (6,60) en 1966 se halla en el sobrenadante de las líneas celulares que son portadoras del genoma viral y presenta la misma especificidad antigénica del EBNA (61).

EBNA y S son los únicos antígenos que están presentes en las líneas celulares portadoras de DNA del EBV que no producen partículas virales. Estas líneas han recibido el nombre de No Productoras a diferencia de las llamadas Productoras, que además de tener incorporado el genoma viral son capaces de producir nuevas partículas virales, y están expresando además otros antígenos como el EA, MA y VCA, pero solo en aquellas células que van a permitir un ciclo viral completo, o sea las que van a producir nuevas partículas virales de EBV. Por otra parte, este ciclo viral es mortal para la célula que lo sufre, ya que al producir nuevas partículas virales, las células mueren (Ciclo Productivo).

c) Antígeno Temprano. EA: Es un complejo antigénico descrito por Henle y col (7) en 1970, cuya aparición indica que la célula esta sufriendo un daño irreversible, como consecuencia del cual va a morir (62). Se observa este antígeno antes de la formación del DNA viral y va seguido de una disminución progresiva en la síntesis de moléculas indispensables para la vida de la célula. El EA puede presentarse de dos maneras: I) Restringida (R), si se halla solo en el citoplasma y II) Difusa (D), si cubre además del citoplasma, el núcleo de las células (63).

La aparición o no de EA ha servido para clasificar las líneas celulares portadoras del genoma viral y no productoras, como la línea Raji, en Sensibles y Resistentes a la super infección, esto es que son sensibles aquellas líneas que se dejan infectar por determinada concentración del virus de la cepa P3 HR-1 y por lo tanto sintetizan EA, mientras que otras las resistentes, no permiten la infección y no forman EA (64,65).

Una clasificación similar se ha realizado en base a la inducción de EA, en líneas portadoras del genoma viral no productoras

mediante sustancias como la iododeoxiuridina (IUDR), obteniéndose líneas inducibles, capaces de sintetizar EA y líneas no inducibles, que no lo forman; se observó así la correlación importante y de que las líneas sensibles eran inducibles y las resistentes no lo eran (66,67), implicando la existencia de mecanismos de control celular que permiten la transformación de algunas células hacia clones con potencial maligno o que inducen la célula portadora del virus hacia una realización del ciclo viral completo, con infección y, la consecuente muerte celular por parte del EBV, convirtiendo, el fenómeno en un episodio agudo, en vez de un fenómeno con potenciales neoplásicos.

Estos mecanismos no son bien conocidos pero están siendo estudiados gracias a los fenómenos de superinfección e inductibilidad.

d) Antígenos de Membrana. MA: son un complejo antigénico descubierto por Klein y col. (4) en 1966, que se localiza a nivel de membrana de las células de las líneas productoras (68). Gracias a los estudios realizados por Ernberg (69) se encontró que el MA es un complejo antigénico que consta un antígeno temprano de membrana (EMA) y un antígeno tardío de membrana (LMA) en donde el EMA se encuentra en las células que no están comprometidas en la producción de nuevas partículas virales completas; mientras que LMA se encuentra en aquellas células que si las producen.

También se ha observado una estrecha homología entre LMA y algunos componentes de la cubierta del EBV. ya que los sueros que detectan el LMA en las líneas productoras, tienen anticuerpos neutralizantes contra el virus, es decir, que anulan su capacidad infecciosa, debido posiblemente a que están dirigidas contra su cubierta (70 - 72 ).

e) Antígenos virales de la capsida.VCA: Este antígeno, descrito por Henle, y Henle(50)en 1966 se encuentra en el núcleo y en el citoplasma de las células productoras de partículas virales. En general cuando se habla de anticuerpos contra EBV, se trata de anticuerpos contra VCA, los cuales permiten el estudio epidemiológico del virus (11,43).

En todas las células que presentan el VCA se han observado en microscopía electrónica partículas virales completas o incompletas, por lo tanto, el VCA de las células presenta una identidad antigénica con las proteínas de la capsida del virus (73).

La importancia de estos antígenos estriba en que el sistema inmune monta una respuesta contra ellos y por lo tanto intervienen en el rechazo y la destrucción de las células cancerosas. Así

pues siendo las células de LCL potencialmente malignas (33), los pacientes con IM además de sintetizar anticuerpos contra estos antígenos celulares inducidos por el virus, presentan linfocitos T asesinos capaces de destruir las células linfoides transformadas, es decir, las que portan el genoma viral, pero no los linfocitos normales del mismo paciente (74,75).

#### Carcinoma Nasofaríngeo

El carcinoma nasofaríngeo anaplásico o pobremente diferenciado ha sido otra de las neoplasias que se ha visto íntimamente relacionada con EBV (52,53). Este es un tumor, que a diferencia de BL, no tiene un área endémica específica (76,77). Pero si se ha encontrado una alta incidencia en poblaciones de origen chino (78). Los pacientes presentan un título elevado de anticuerpos dirigidos contra el virus, el cual también, se ha observado en los núcleos de las células epiteliales malignas, siendo por lo tanto EBNA positivas (79,80).

Las células de este carcinoma han podido mantenerse viables y separarse de células contaminantes como linfocitos y fibroblastos, mediante trasplante de biopsias del tumor a ratones inmunodeficientes (27).

Un aspecto muy interesante del BL y NPC es el hecho de encontrarse dos células distintas, el linfocito y la célula epitelial, en íntima relación con EBV.

Así, se ha estudiado un tumor, el linfoma de Burkitt, como un producto de diversos factores: Un agente (EBV), un huésped (con una traslocación genética) y un medio ambiente (con una alta incidencia de malaria).

La respuesta del sistema inmune contra las células cancerosas será tratado en otro artículo de esta misma publicación.

En resumen, el estudio de los antígenos tumorales y la defensa contra ellos ha mostrado resultados muy interesantes y está conduciendo a un tratamiento completamente específico y biológico contra la célula tumoral, en donde la capacidad de los individuos de responder contra las células neoplásicas sea la principal arma.

Los diferentes métodos actuales de tratamiento contra el cáncer como cirugía, quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia, etc. han disminuido la mortalidad en las enfermedades malignas, pero es bien sabido que en muchos casos son insuficientes o pueden ser más peligrosas que la misma enfermedad. La Inmunología está dando muchas respuestas sobre la relación Huésped-Célula Tumoral y abre un gran campo para el diagnóstico, pronóstico y la prevención del cáncer que

permitirá en un futuro no muy lejano, acabar con este flagelo de la humanidad.

**George Klein**  
**Manuel Patarroyo**  
**Manuel E. Patarroyo**

#### **Bibliografía**

- 1.- Oncogenesis and Herpes Viruses, eds. de Thé and H. Zur-Hausen (Neuremberg Symp., Agency for research on cancer, Lyon).
- 2.- Burkitt, D. P. and O' Conor G. T.: Malignant lymphoma in African Children: A clinical syndrome. *Cancer* 14:258-264, 1961.
- 3.- Epstein, M. A., Henle, G., Achong B. G. and Barr, Y. M.: Morphological and biological studies on a virus in culture lymphoblasts from Burkitt's lymphoma *J. Exp. Med.* 121:761-770, 1965.
- 4.- Klein, G., Clifford, P., Klein, E. and Stjernsward. J.: Search for tumor-specific immune reactions in Burkitt's lymphoma patients by the membrane immunofluorescence reaction. *Proc.Nat. Acad. Sci. USA.* 55:1628-1635, 1966.
- 5.- Henle, G. and Henle, W. Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bact.* 91:1248-1256,1966.
- 6.- Old, L. J., Boyse, E. A., Dettgen, H. F., de Herven, E., Geering, G., Williamson. B. and Clifford, P.: Precipitating antibody in human serum to an antigen present in culture Burkitt's lymphoma cell. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 56: 1699, 1966.
- 7.- Henle, W., Henle,G.,Zajac, B.A., Pearson, G., Warubke, R. and Seriba, M.: Differential reactivity of human serum with early antigens induced by Epstein-Barr Virus. *Science* 169:188-190, 1970.
- 8.- Reedman, B. M. and Klein, G.: Cellular localization of an Epstein Barr virus (EBV) associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int.J. Cancer* 11:499, 1973.
- 9.- zur Hausen, H. and Schulte-Holthausen, H: Presence ofEB virus nucleic acid homology in a "virus free" line ofBurkitt tumor cells. *Nature (London)* 277:245-248, 1970.
- 10.- Klein, G., Giovanella, B. C., Lindhl, T., Fialkow, P. J. Singh, J., and Stehlin, J. S.: Direct evidence for the presence of Epstein Barr virus DNA and nuclear antigen in malignant epithelial cells from patients with poorly differentiated carcinoma ofthe nasopharynx. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71:4737,1974.
- 11.- Henle, G., Henle, W. and Diehl, V.: Relation of Burkitt's tumor-associated herpes type virus to infectious mononucleosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 59:94-101, 1968.
- 12.- Henle, G. and Henle, W.: EB virus in infectious mononucleosis. *Hospital Practice* 5:33-41, 1970.
- 13.- Epstein, M. A. and Achong, B.G.: The EB virus. *Ann. Rev. Microbiol*, pp. 413-436, 1973.

- 14.- Jondal, M. and Klein, G.: Surface markers of human B and T lymphocytes. II- Presence of Epstein-Barr virus receptor on B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 138:1365-1378, 1973.
- 15.- Chang, R. S. and Golden, D. H.: Transformation of human leucocytes by throat washing from infectious mononucleosis patients. *Nature (London)* 234:359-360, 1971.
- 16.- Gerber, P., Whang-Peng, J. and Monre, J. H.: Transformation and chromosome changes induced by Epstein-Barr virus in normal human leucocyte cultures. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 63: 740-747, 1969.
- 17.- Miller, G.: Human lymphoblastoid cell lines and Epstein-Barr virus, a review of their interrelationships and their relevance to the etiology of leukoproliferative states in man. *Yale J. Biol. Med.* 43:358-384, 1971.
- 18.- Miller, G., Lisco, H., Kohn, H. L. and Stitt, D.: Establishment of cell lines from normal adult human blood leukocytes by exposure to Epstein - Barr virus and neutralization by human sera with Epstein-Barr virus antibody. *Proc. Soc. Exp. Med.* 137:1459-1465, 1971.
- 19.- Epstein, M. A, Hunt, R. D. and Rabin, H.: Pilot experiments with EB virus in owl monkeys I. Reticuloproliferative disease in an inoculated animal. *Int. J. Cancer* 12:309-318, 1973.
- 20.- Menezes, J, Leibold, W. and Klein, G.: Biological differences between Epstein-Barr virus (EBV) strains with regard to lymphocyte-transforming ability, super-infection and antigen induction. *Exp. cell. Res.* 92: 478-484, 1975.
- 21.- Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D. and Lipman, M.: Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 69:383-387, 1972.
- 22.- Menezes, J., Leibold, W. and Klein, G: A micromethod for the establishment of human lymphoid cell lines. In: Program of Abstracts, 8th leukocyte Culture Conference Uppsala, University of Uppsala, (Abstract 135), 1973.
- 23.- Hinuma, Y. and Grace, J. T.: Cloning of immunoglobulin-producing human leukemia and lymphoma cells in long-term cultures. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 124:107-111, 1967.
- 24.- Klein, G., Dombos, L. and Gothoskar, B: Sensitivity of Epstein-Barr virus (EBV) producer and non-producer human lymphoblastoid cell lines to super-infection with EBV. *Int. J. Cancer* 10:44-57, 1972.
- 25.- Pritchett, R.R., Hayward, S.D. and Kieff, E.D.: DNA of Epstein-Barr virus. *Int. J. Virology* 15: 556-569, 1975.
- 26.- Gerber, P., Nonoyama, M., Lucas, S., Perlin, E. and Goldstein, L. I.: Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet* 2:988-989, 1972.
- 27.- Kaschka-Dierich, C., Adams, A., Lindahl, T., BorKarmm, G. W., Bjursell, G., Klein, G., Giovanella, B.C. and Singh, S.: Intra cellular forms of Epstein-Barr virus DNA in human tumor cells in vivo. *Nature* 260:302, 1976.
- 28.- Nilsson, K., Klein, G., Henle, W. and Henle, G.: The establishment of lymphoblastoid lines from adult and fetal human lymphoblastoid tissue and its dependence on EBV. *Int. J. Cancer* 8:443-450, 1971.

- 29.- Epstein, M.A., Achong, B. G. and Barr, Y. M.: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1:702-703, 1964.
- 30.- Greaves, F.M., Brown, G. and Rickinson, A.B.: EBV binding sites on lymphocyte subpopulation and the origin of lymphoblast in culture lymphoid cell lines and in the blood of patients with infectious mononucleosis. *Clin. Immunol. Immunopath.* 3: 514-524, 1975.
- 31.- Menezes, J., Seigheurin, J.M., Patel, P., Bourkas, A. and Lenoir, G.: *J. Virology* 22: 816, 1977.
- 32.- zur Hausen, H., Diehl, V. Wolf, H., Schulte-Holthausen, H. and Schneider, U.: Occurrences of Epstein-Barr virus viral genomes in human lymphoblastoid cell lines. *Nature New Biol.* 237:189,1972.
- 33.- Nilsson, K., Giovanella, B.C., Stehlin, J. S. and Klein, G.: Tumorigenicity of human hematopoietic cell lines in athymic nude mice. *Int. J. Cancer* 19:337-344. 1977.
- 34.- Fialkow, P.J., Klein, G., Gortler, S.M. and Clifford, P.: Clonal origin for individual Burkitt tumours. *Lancet* 1:384-386, 1970.
- 35.- Bechet, J.M. Fialkow, P. J., Nilsson, K., Klein, G. and Singh, S.: Immunoglobulin synthesis and glucose-6-phosphate dehydrogenase as cell markers in human lymphoblastoid cell lines. *Exp. cell Res.* 89:275-282, 1974.
- 36.- Manolov, G. and Manolova, Y.: Marker band in one chromosome 14 from Burkitt's lymphomas. *Nature (London)* 237:33-34, 1972.
- 37.- Jarvis, J. E., Ball, G., Rickinson, A. B. and Epstein, M. A.: Cytogenetic studies on human lymphoblastoid cell lines from Burkitt's lymphomas and other sources. *Int. J. Cancer* 14: 716-721, 1974.
- 38.- Zech, L., Haglund, U., Nilsson, K. and Klein, G.: Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid cell lines from patients with Burkitt and non Burkitt lymphomas. *Int. J. Cancer* 17:47-56, 1976.
- 39.- Nilsson, K. and Panten, J.: Classification and biological nature of established human hematopoietic cell lines. *Int. J. Cancer* 15: 321-341, 1975.
- 40.- Henle, G., Henle, W., Klein, G., Gunven, P., Clifford, P., Morrow, R. H. and Ziegler, J. L.: Antibodies to early Epstein-Barr virus-induced antigens in Burkitt's lymphoma. *J.Nat. Cancer Inst.* 46:861-871, 1971.
- 41.- Niederman, J. C., Evans, A. S., Subrahmanyam, L. and McCollum, R. W.: Prevalence, incidence and persistence of EB virus antibody in young adults. *New Engl. J. Med.* 282: 361-365, 1970.
- 42.- Evans, A. S., Niederman, J. C., and McCollum, R. W.: Seroepidemiologic studies of infectious mononucleosis with EBV virus. *New Engl. J. Med.* 279:1121-1127, 1968.
- 43.- Henle, W. and Henle, G.: Epstein-Barr virus and infectious mononucleosis. *New Engl. J. Med.* 288:263- 264,1973.
- 44.- Niederman, J. C., McCollum, R. W., Henle, G. and Henle, W.: Infectious mononucleosis. Clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *J. A. M. A.* 203: 205-209, 1968.

- 45.- Sheldon, P. J., Papamichail, M., Hemsted, E. H. and Holborow, E. J.: Thymic origin of atypical lymphoid cells in infectious mononucleosis. *Lancet* 1:1153-1155, 1973.
- 46.- Pattengale, P. K., Smith, R. W. and Perlin, E.: Atypical lymphocytes in acute infectious mononucleosis, identification by multiple T and B lymphocyte markers. *New Engl. J. Med.* 291:1145-1148, 1974.
- 47.- Henle, G., Henle, W., Clifford, P., Diehl, V., Kafuko, C. W., Kiria, B. C., Morrow, R. H., Munube, C. M. R., Pike, P., M. and Ziegler, J. L.: Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J. Nat. Cancer Inst.* 43: 1147-1157, 1969.
- 48.- Henle, W. and Henle, G.; Epstein-Barr virus related Serology in Hodgkin's disease. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 36: 79-84, 1973.
- 49.- Johansson, B., Klein, G., Henle, W. and Henle, G.: Epstein-Barr virus associated antibody patterns in malignant lymphoma and leukemia I. Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer* 7:450-462, 1970.
- 50.- Johansson, B., Klein, G., Henle, W. and Henle, G.: Epstein-Barr virus-associated antibody patterns in malignant lymphoma and leukemia. II. Chronic lymphocytic leukemia and lymphocytic lymphoma. *Int. J. Cancer* 8: 475-486, 1971.
- 51.- Gunven, P., Klein, G., Henle, W. and Clifford, P.: Antibodies to EBV associated membrane and viral capsid antigens in Burkitt lymphoma patients. *Nature* 228:1053-1056, 1970.
- 52.- zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P. and Santesson, L.: EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinoma of the nasopharynx. *Nature* 228:1056-1058, 1970.
- 53.- Nonoyama, M., Huang, C. H., Pagano, J. S., Klein, G. and Singh, S.: DNA of EBV detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70:3265-3268, 1973.
- 54.- Burkitt, D. P.: Etiology of Burkitt's lymphoma: an alternative hypothesis to a vectoral virus. *J. Nat. Cancer Inst.* 42:19-28, 1969.
- 55.- Klein, G.: Virus-induced, antigens, A review In: *Oncogenesis and Herpes viruses II*, de Thé G., Epstein, M. A. and Zur-Hausen, H. Eds. Lyon (IARC Scientific publications No. 11) 1975.
- 56.- Klein, G.: Studies on the EBV genome and the EBV determined nuclear antigen in human malignant disease. *Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 39:783-790, 1975.
- 57.- Lindahl, T., Klein, G., Reedman, B. M., Johansson, B. and Singh, S.: Relationship between EBV DNA and EBNA in Burkitt lymphoma biopsies and other lymphoproliferative malignancies. *Int. J. Cancer* 13:764-772, 1974.
- 58.- Nonoyama, M. and Pagano, J. S.: Detection of Epstein-Barr viral genome in non-productive cells. *Nature New Biol.* 233:103, 1971.
- 59.- Pagano, J. S., Huang, C. H. and Levine, P.: Absence of EBV DNA in American Burkitt's lymphoma. *New Engl. J. Med.* 289: 1395-1399, 1973.

- 60.- Gerber, P. and Deal, D. R.: EBV-induced viral and soluble complement fixing antigens in Burkitt lymphoma cell cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 134: 748-751, 1970.
- 61.- Ohno, S., Luka, J., Lindahl, T. and Klein, G.: Identification of a purified complement-fixing antigen as the EBV determined nuclear antigen (EBNA) by its binding to metaphase chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74: 1605-1609, 1977.
- 62.- Gergely, L., Klein, G. and Ernberg, I.: Appearance of Epstein-Barr virus-associated antigens in infected cells. *Virology* 45:22, 1971.
- 63.- Henle, G., Henle, W. and Klein, G.: Demonstration of two distinct components in the early antigen complex of Epstein-Barr virus infected cell. *Int. J. Cancer* 8:272, 1971.
- 64.- Klein, G., Dombos, L. and Gotnoskar, B.: Sensitivity of EBV producer and non producer human lymphoblastoid cell lines to super-infection with EBV virus. *Int. J. Cancer* 10:3357, 1972.
- 65.- Adams, A. and Klein, G.: Superinfection with EBV of human lymphoid cell lines of different origin. *Nature New Biol.* 242:234-236, 1973.
- 66.- Klein, G., and Dombos, L.: Relationship between the sensitivity of EBV carrying lymphoblastoid lines to superinfection and the inducibility of the resident viral genome. *Int. J. Cancer* 11:327-337, 1973.
- 67.- Hampar, B., Derge, J. G., Mortos, L. M. and Walkers, J. M.: Synthesis of EBV after activation of viral genome in a virus negative human lymphoblastoid cell (Raji) made resistant to 5-bromodeoxyuridine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 69:78-82, 1972.
- 68.- Klein, G., Pearson G., Henle, W., Henle, G., Goldstein, G., and Clifford P. J. Antibody reactions to Herpes virus saimiri (HVS)-induced early and late antigens (EA and LA) in HVS - infected squirrel, marmoset and owl monkeys. *Exp. Med.* 129:697, 1969.
- 69.- Ernberg, I., Klein, G., Kourilsky, F. M. and Silvestre, D.: Differentiation between early and late membrane antigens of human lymphoblastoid cell lines infected with Epstein Barr virus. I. Immunofluorescence. *J. Nat. Cancer Inst.* 53:61, 1974.
- 70.- Pearson, G., Dewey, F., Klein, G., Henle, G. and Henle, W.: Relation between neutralization of Epstein-Barr virus and antibodies to membrane antigens induced by the virus. *J. Nat. Cancer Inst.* 45:898, 1970.
- 71.- Silvestre, D., Kourilsky, F. M., Klein, G., Yata, Y., Neauport-Sautes, C., and Levy J. P.: Relationship between the EBV- associated membrane antigen on Burkitt lymphoma cells and the viral envelope demonstrated by immunoferritin labeling. *Int. J. Cancer* 8:222 - 223, 1971.
- 72.- De Schriyver, A., Klein, G., Hewetson, J., Rocchi, G., Henle, G., Henle, W., Moss, J. and Pope, J. : Comparison of neutralization tests based on abortive infection or transformation of lymphoid cells and their relation to membrane reactive antibodies (anti - MA). *Int. J. Cancer* 13:353 - 362. 1974.
- 73.- Epstein, M. A. and Achong, B.F.: Formal Discussion Immunologic relationships of the herpes-like EBV of cultured Burkitt lymphoblasts *Cancer Res.* 27:2489-2493, 1967.

- 74.- Klein, G., Lindahl, T., Jondal, M., Leibold, W., Menezes, J., Nilsson, K. and Sundström, Ch.: Continuous lymphoid cell lines with characteristics of B cells ( Bone-marrow derived) lacking the EBV genome and derived from three human lymphomas. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash). 71:3283-3286, 1974.
- 75.- Svedmyr, E. and Jondal, M.: Cytotoxic effector cells specific for B cell lines transformed by EBV are present in patients with infectious mononucleosis Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72:1622-1626, 1975.
- 76.- Desgranges, C., Wolf, H., de Thé, G., Shanmugaratman, U., Cammoun, N., Ellouz, R., Klein, G., Lennert, K., Muñoz, N. and zur Hausen, H.: Nasopharyngeal carcinoma X. Presence of EBV genomes in separated epithelial cells of tumours in patients from Singapore, Tunisia and Kenya. Int. J. Cancer 16: 7-15, 1975.
- 77.- De Schryver, A, Friberg, S. Jr., Klein, G., Henle, W., Henle, G. de Thé, G., Clifford, P. and Ho, J. H. C.: Epstein-Barr virus - associated antibody patterns in carcinoma of the post- nasal space. Clin. Exp. Immunol. 5 : 443-459, 1969.
- 78.- Ho, J.H.C.: Nasopharyngeal carcinoma (NPC) Adv. Cancer Res. 15:57-92, 1972.
- 79.- Huang, D. P., Ho, J. H. C., Henle, W. and Henle, G.: Demonstration of EBV associated nuclear antigen in NPC cells from fresh biopsies. Int. J. Cancer 14:580-588. 1970.
- 80.- Wolf, H., zur Hausen, H. and Becker, V.: EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. Nature New Biol. 244:245-247, 1973.