

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS EPSTEIN BARR POR HIBRIDIZACIÓN *IN SITU*
EM BIOPSIAS DE PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO QUE ASISTEN AL
INSTITUTO DE CANCEROLOGÍA –INCAN-**

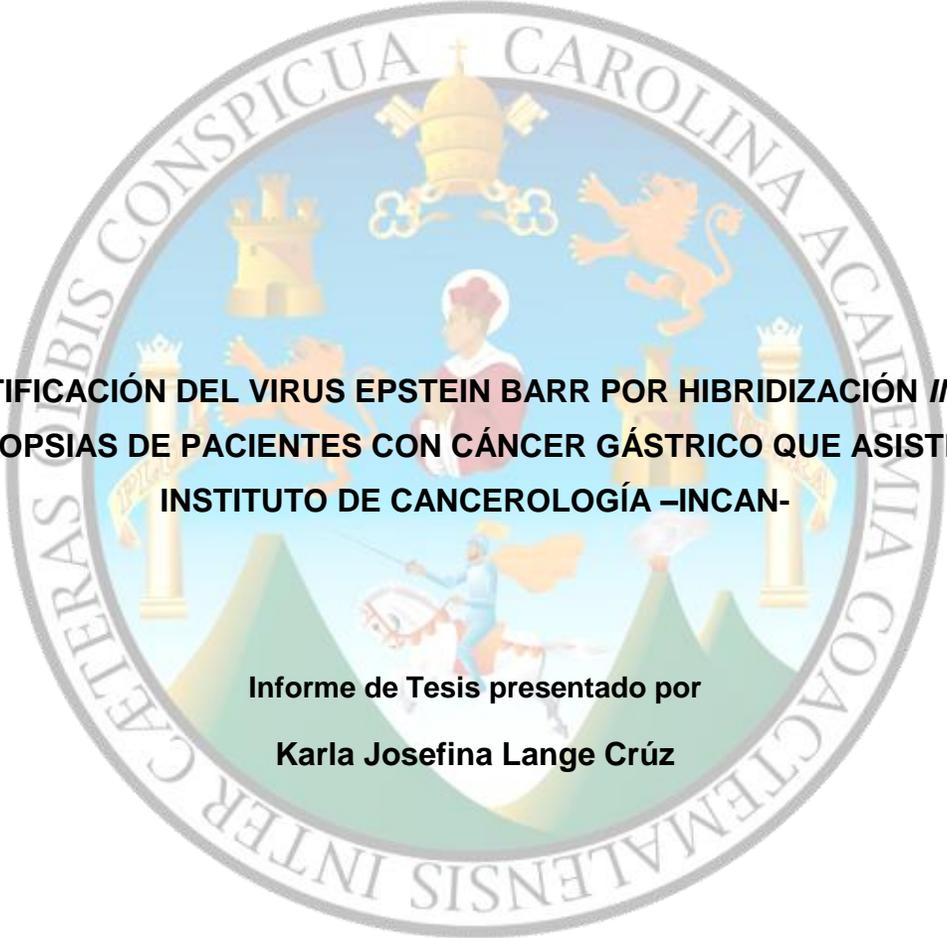
Karla Josefina Lange Cruz

Maestría en Microbiología de Enfermedades Infecciosas

Guatemala, mayo de 2019

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man on horseback, holding a staff, set against a background of green hills and a blue sky. Above the figure are various symbols, including a golden dome, a lion, and a castle. The text "UNIVERSITAS CAROLINA ACADÉMICA COACTEMALENSIS" is written around the perimeter of the seal.

**IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS EPSTEIN BARR POR HIBRIDIZACIÓN *IN SITU*
EM BIOPSIAS DE PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO QUE ASISTEN AL
INSTITUTO DE CANCEROLOGÍA –INCAN-**

Informe de Tesis presentado por

Karla Josefina Lange Cruz

Para optar al grado de Maestro en Ciencias

Maestría en Microbiología de Enfermedades Infecciosas

Guatemala, mayo de 2019

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

MA. Pablo Ernesto Oliva Soto	DECANO
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	SECRETARIA
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	VOCAL I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	VOCAL II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	VOCAL III
Br. Byron Enrique Pérez Díaz	VOCAL IV
Br. Pamela Carolina Ortega Jiménez	VOCAL V

CONSEJO ACADÉMICO
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Pablo Ernesto Oliva Soto, MA.
Tamara Ileana Velásquez Porta, MSc.
Jorge Mario Gómez Castillo, MA.
Clara Aurora García González, MA.
Silvia Marisol Archila Jiménez, MSc.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, en particular a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Estudios de Postgrado, quienes me brindaron una excelente formación académica y apoyaron durante la Maestría.

Al Instituto de Cancerología –INCAN-, por el uso de las instalaciones tanto en el área de registro y estadística como en el departamento de Patología. En especial, al laboratorio de Inmunohistoquímica en donde además de brindar la orientación técnica y profesional, brindaron la calidad humana en atención tanto el Dr Mauricio Siliézar como Técnica Inmunohistoquímica Nelly López Melgar.

A la Dirección General de Investigación por el apoyo económico brindado para realizar esta tesis.

DEDICATORIA

A Dios padre y madre, quien me sostiene, guía y ama.

A mi familia, a mi mamá Josefina Cruz de Lange ejemplo de fortaleza y resiliencia, a mis Hermanos, Ana Ingrid, Karin, Maco, Federico, Rosana e Ignacio; apoyo y ejemplo de vida, especialmente a mi hijo José Pablo quien con paciencia y cariño me apoyó y ayudó en esta etapa, espero formarte bien más con el ejemplo que con las palabras.

A mis amigos, a la familia que Dios me permitió escoger en la tierra, a mi familia de Citohistología, Vivian, Shený, Margarita, Isabel, Keila, Eliseo, Claudia, Carmen, Gerardo, Jorge, a mis amigas de siempre; Gudrid, Larisa, Diana, Susy, Rita, Virginia, Swuanny, Anna, Cecilia, Carolina, Padre Maco.

A los Maenfi, tanto a los catedráticos Dalia, Carolina, Ely, Ricardo, Sheilee, Rebeca, Flora, Sergio, Nancy, Tamara y Elizabeth, gracias por su compromiso y entrega. Principalmente a los compañeros que se hicieron amigos, agradezco su apoyo en los desvelos, ayuda tecnológica y científica; Marina, Alejandra, Fabiola, Ana, Carlos y Fernando. Lo logramos.

Con especial admiración y cariño a mi asesora, PhD. Vivian Matta de García, quien me ha acompañado desde hace varios años, pero con especial dedicación y cariño en este tiempo. Mil gracias.

RESUMEN EJECUTIVO

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que el cáncer gástrico es el cuarto tipo de cáncer que ocasiona mayor número de fallecimientos a nivel mundial. El Virus Epstein Barr (EBV) está relacionado como agente oncogénico en el desarrollo de esta neoplasia, atribuyéndole el 10% de los casos de cáncer gástrico a nivel mundial. El método de identificación del micro ARN EBER de EBV por hibridización *in situ*, permite identificar la presencia de este agente oncogénico en las neoplasias, considerándolo como la metodología de elección.

A la fecha, no existe ninguna publicación que evalúe la prevalencia de expresión del micro ARN EBER de EBV en los pacientes con cáncer gástrico en Guatemala. Por lo que en este estudio se evaluaron 71 pacientes con cáncer gástrico que asistieron al Instituto de Cancerología (INCAN), se identificó la prevalencia en la expresión de este virus en 15 pacientes (21.13 %) (IC 95% 10.93 %-31.33 %), frecuencia mayor que la reportada en otros estudios latinoamericanos. Por lo que es recomendable evaluar a nivel nacional la prevalencia en la expresión del micro ARN EBER de EBV en biopsias de pacientes con cáncer gástrico y asociar variables étnicas y ambientales en la población.

Al determinar la asociación entre la expresión del EBER del EBV, la variable con asociación significativa fue el género masculino OR=4.95 (IC 95 % 1.39-17.54) $p<.05$. Además, los factores asociados fueron el padecer diarrea OR 5.74 (IC 95 % 1.45-12.64) $p<.05$, y la infección por *Helicobacter pylori* diagnosticada por examen de laboratorio, OR 7.19 (IC 95 % 1.07-18.87) $p<.05$.

Además, se identificó que los pacientes que expresan el micro ARN EBER de EBV presentan riesgo de desarrollar cáncer gástrico del tipo difuso, OR= 2.48 (IC 95 % 1.05-8.20) $p < .05$.

ÍNDICE

RESUMEN		
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	
A.	Herpesvirus	2
B.	Virus Epstein Barr	4
1.	Células blanco	5
2.	Ciclo de vida	6
3.	Transmisión y factores de riesgo	10
4.	Persistencia, latencia e historia natural	10
5.	Neoplasias asociadas a EBV	12
6.	Interacciones entre EBV y otros agentes	15
7.	Marcadores biológicos y estadio de la infección	18
8.	Epidemiología de la infección	21
C.	Cáncer gástrico	22
1.	EBV y cáncer gástrico	25
2.	Factores asociados a cáncer gástrico	27
3.	Epidemiología del cáncer gástrico	29
4.	Tratamiento	30
D.	Instituto de Cancerología INCAN	31
1.	Historia	32
III.	JUSTIFICACIÓN	33
IV.	OBJETIVOS	34
V.	HIPÓTESIS	35
VI.	METODOLOGÍA	36
A.	Diseño de la Investigación	36
B.	Definición de la Población	36
C.	Elementos de muestreo y unidad de análisis	36
D.	Tamaño y selección de muestra	36
E.	Criterios de Inclusión y exclusión	37
F.	Procedimientos	37

G.	Interpretación de Resultados	39
H.	Plan de Análisis	40
I.	Limitaciones del estudio	40
J.	Consideraciones éticas	40
VII.	RESULTADOS	41
VIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
IX.	CONCLUSIONES	53
X.	RECOMENDACIONES	54
XI.	REFERENCIAS	55
XII.	ANEXOS	63
A.	Ficha epidemiológica	63

I. INTRODUCCIÓN

El virus de Epstein Barr (EBV) es un virus ubicuo, presente en el 90 % de la población mundial, adquirido principalmente por aerosoles. La edad en la que tiene lugar la infección primaria depende de las condiciones de desarrollo socioeconómico como hacinamiento, higiene, servicios de drenajes, entre otros. En las áreas de menor desarrollo, la mayoría de los niños de 3 a 5 años presentan anticuerpos séricos, indicativos de infección previa. Este virus puede cursar asintomático, cuando es adquirido en la infancia y adolescencia; desarrollar una fase sintomática con mononucleosis infecciosa o estar implicado en algunas neoplasias, como linfoma Hodgkin y cáncer gástrico (Young & Rickinson, 2004).

El cáncer gástrico se ubica dentro de los cinco principales tipos de cáncer a nivel mundial, con predominio en el sexo masculino. Según reportes del Instituto de Cancerología (INCAN) en Guatemala, su frecuencia ha aumentado de 1999 a 2013 con tasas que varían entre 15.89 a 18.73 x 100,000 habitantes. Los principales factores de riesgo asociados a nivel mundial son las infecciones por *Helicobacter pylori*, a la que se atribuye más del 80% de los casos y por el Virus Epstein Barr, el cual a nivel mundial es responsable del 10% de casos de este tipo de neoplasia (Matta & De León, 2015; Thompson & Kurzrock, 2004; Waldheim & Villeda, 2014).

En este estudio se evaluó la presencia del micro ARN EBER del virus de Epstein Barr por hibridización *in situ*, en biopsias de pacientes diagnosticados con cáncer gástrico, previo consentimiento informado y ficha epidemiológica para identificar a este virus como agente etiológico de cáncer gástrico y se estableció la característica histológica asociada al tipo de cáncer desarrollado. No existen estudios previos en el país que analicen a este microorganismo como agente causal de cáncer gástrico, por lo cual es necesario establecer la importancia de evaluarlo dentro del protocolo de diagnóstico en los pacientes con esta neoplasia.

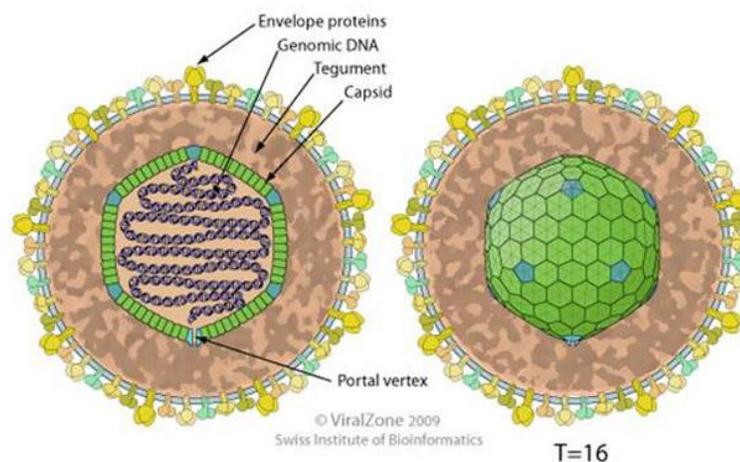
II. ANTECEDENTES

A. Herpesvirus

Los herpesvirus (*herpesviridae*) se caracterizan por ser partículas largas que miden entre 150 a 250 nm, están compuestos por una envoltura de naturaleza lipídica que deriva de la célula hospedera. Esta envoltura cuenta con espículas formadas por proteínas y glucoproteínas, las cuales participan en la fijación del virus a la célula para mediar la fusión de ambas membranas. La integridad de la envoltura es necesaria para la infectividad viral. Entre la envoltura del virus y la cápside, se encuentra un espacio denominado tegumento, el cual es un complejo de proteínas virales de estructura fibrilar que asegura la unión entre la envoltura y la cápside (IARC, 1997).

Su naturaleza lipídica le da la posibilidad de ser degradable por los agentes fisicoquímicos, lo cual hace a este tipo de virus lábil en el medio externo. La porción más interna está formada por una cápside icosaédrica de 100 nm de diámetro constituida por 162 capsómeros. Un *core* que contiene ADN viral, bicatenario lineal que se encuentra enrollado alrededor de una bobina proteica, como se observa en la figura 1 (IARC, 1997).

Figura 1. Estructura de herpesvirus



Fuente: Viral Zone, Swiss Institute of Biomarkers, disponible en http://coast.pink/herpesviridae_1944552.html

Todos los herpesvirus permanecen en sus hospederos naturales y son responsables de infecciones latentes y de reactivaciones, las que a menudo son asintomáticas. Estas infecciones latentes se caracterizan por una expresión limitada de una pequeña cantidad de genes virales (Rickinson & Kieff, 1996).

Los herpesvirus pueden causar daño en general en el hospedero por tres mecanismos: destrucción directa de los tejidos, estimulación de respuesta autoinmune y transformación a la célula normal en neoplásica (Damania, 2004).

Los miembros de la familia *Herpesviridae* cuentan con más de 130 especies conocidas que infectan a un amplio espectro de animales, de ellas, solo ocho infectan a los humanos, herpes simplex 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2 o herpesvirus humano HHV-1 y HHV-2), virus de la varicela zoster (VZV o HHV-3); Epstein Barr virus (EBV o HHV-4); citomegalovirus humano (HCMV o HHV-5), herpesvirus humano 6 y 7 (HHV-6 y HHV-7) y sarcoma de Kaposi asociado a herpesvirus (KSHV o HHV-8). Todos los herpesvirus muestran un origen evolutivo común, lo que se demuestra en su alta similitud en la secuencia de aminoácidos observada a través de varios productos génicos virales (Rickinson & Kieff, 1996).

Las especies que infectan a los humanos se clasifican en tres subfamilias de acuerdo a la homología y organización de su genoma, las cuales son: *alphaherpesviridae*, *betaherpesviridae* y *gammaherpesviridae*. Varios de los gamma herpesvirus poseen la habilidad de inducir enfermedad neoplásica en el hospedero, entre ellos el virus Epstein Barr (Damania, 2004).

1. Gamma Herpesvirus

Son virus linfotrópicos con capacidad de presentar replicación lítica en fibroblastos y células epiteliales. Estos virus establecen un período de latencia en el hospedero, con períodos intermitentes de replicación lítica. Los gamma herpesvirus han sido detectados en varias especies animales (Damania, 2004).

Se han identificado dos subfamilias: los linfocriptovirus (γ -1) y el rhadinovirus (γ -2). EBV es un linfocriptovirus, mientras que el virus herpes Saimirí (HVS) y KSHV son rhadinovirus que pueden infectar monos. Estos virus poseen la habilidad de producir neoplasias en el hospedero natural (Damania, 2004).

Los tres virus están asociados con diferentes tipos de malignidades en el hospedero, así como a enfermedades linfoproliferativas de células T o B. Adicionalmente EBV es asociado con cáncer epitelial como el carcinoma nasofaríngeo y carcinoma gástrico, mientras que KSHV está ligado a sarcoma vascular (Damania, 2004).

B. Virus Epstein Barr

El virus Epstein Barr (EBV) es el primer virus que fue descubierto en células neoplásicas humanas. Fue identificado en 1964, por microscopía electrónica de células cultivadas provenientes de un linfoma Burkitt por Epstein, Achong y Barr. Cuatro años después, se demostró que EBV es el agente etiológico de la mononucleosis infecciosa. Estudios posteriores han identificado al virus en una variedad de neoplasias como el carcinoma nasofaríngeo y leucoplaquia oral en pacientes inmunocomprometidos con linfoma no Hodgkin, carcinoma gástrico, linfomas de células T y enfermedad de Hodgkin. De acuerdo a la nomenclatura sistemática adoptada, la designación formal del virus Epstein Barr es Herpesvirus humano 4 (HHV-4) (Cohen, 2000; Fukayama, & Ushiku, 2011).

El ADN de EBV es lineal, en doble hebra, contenido en la nucleocápside, cuyo tamaño es de 172 Kb que codifican más de 85 genes y cerca de 100 proteínas. La nomenclatura para EBV en su patrón abierto de lectura (ORFs [acrónimo en inglés *open reading frame*]), está basado en los fragmentos de restricción *Bam*HI, así mismo está dividido en genes líticos y latentes, o en genes inmediatos, tempranos y tardíos, la mayoría de los cuales se traduce en proteínas. Varios genes líticos codifican para proteínas homólogas en humanos, en contraposición varios

genes latentes no se traducen; además EBV también codifica por lo menos 17 micro ARNs (Koshiol et al 2007).

Dos tipos principales de EBV han sido detectados en humanos EBV-1 y EBV-2 (también conocidos como tipos A y B), que difieren en la secuencia de los genes que codifican para los antígenos nucleares de EBV (Damania, 2004).

1. Células blanco

Los virus de la familia *gammaherpesviridae* se replican y permanecen ocasionando infección latente en los linfocitos, en los que inducen proliferación. La infección de linfocitos B por EBV es mediada a través de la interacción de la glicoproteína viral gp350/220 con el receptor celular del complemento C3d (CD21), lo que puede causar linfomas, leucemias y trastornos linfoproliferativos en animales de experimentación. Después de la unión con la partícula viral a la superficie de la célula hospedera se internaliza por endocitosis. La envoltura viral se fusiona con la membrana de la célula hospedera por un mecanismo que envuelve tres glicoproteínas virales gp85, gp25 y gp42, gp42 es enlazada por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II, mecanismo que usa EBV como cofactor en la infección de linfocitos B (IARC, 1997; Young & Rickinson, 2004).

Se considera a EBV como un virus linfotrópico B, capaz de infectar también a linfocitos T y células epiteliales, como demuestran los hallazgos en linfomas de células T y varias enfermedades epiteliales, incluyendo carcinoma gástrico, nasofaríngeo y leucoplaquia oral (Koriyama, Akiba, Minakami, & Eizuru, 2005).

La infección de EBV en portadores crónicos del virus, se restringe a células B, debido a su habilidad para transformar células B en línea celulares linfoblastoides latentes (LCLs). Sin embargo, en ciertas situaciones puede ser detectado en células epiteliales, ya que estas células constituyen un sitio importante de replicación y amplificación de EBV, más que un lugar de infección persistente latente (IARC, 1997; Young & Rickinson, 2004).

Junto con *Helicobacter pylori*, EBV es considerado actualmente como microorganismo causal de carcinoma gástrico (CG); pero su participación es considerablemente diferente. *H. pylori* se mantiene fuera de las células gástricas y juega un papel importante en los primeros estadios de carcinogénesis en varios CG. En cambio EBV -al cual se le atribuyen 10% de CG- se internaliza en las células de la mucosa, el carcinoma consiste en el crecimiento monoclonal de células infectadas por EBV. Aunque, EBV no está integrado dentro del ADN del hospedero, se mantiene así mismo en forma circular en el núcleo de células infectadas (episomas) sin que produzcan estas células partículas virales, durante el período de latencia. EBV se replica simultáneamente a la división celular, posteriormente daña la membrana celular y se disemina a células vecinas (Fukayama & Ushiku, 2011).

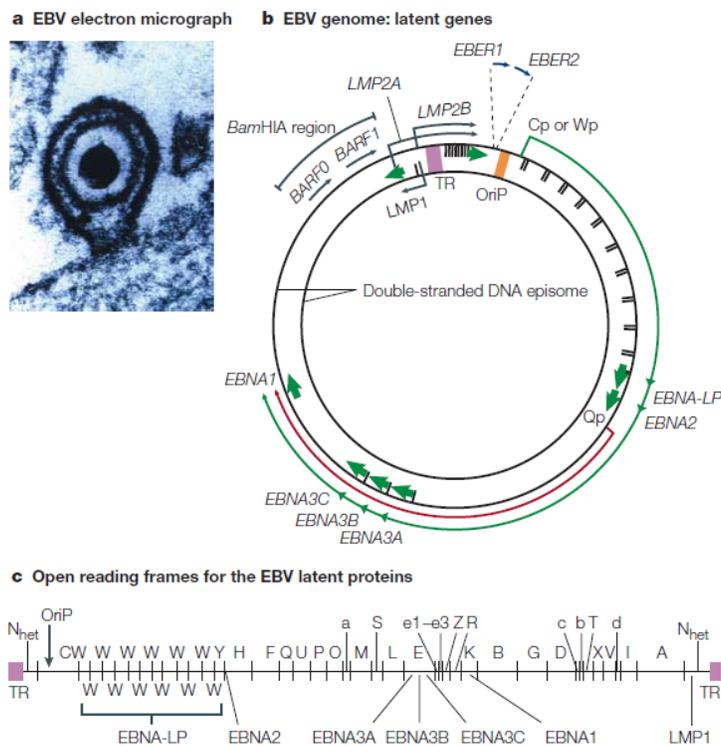
2. Ciclo de vida

EBV, es probablemente el virus humano transformante en cultivo más potente, sin embargo, es conocido por infectar y persistir en más del 90% de los humanos durante toda su vida, sin causar enfermedad (Young & Rickinson, 2004).

La forma de transmisión tradicionalmente aceptada sostiene que el EBV infecta inicialmente a las células epiteliales de la orofaringe y posteriormente pasa a los linfocitos B del tejido linfoide adyacente. Por medio de la saliva, EBV ingresa al epitelio del anillo de Waldeyer situado en la orofaringe, siendo probablemente donde inicia la infección lítica que permite la amplificación del virus. El virus, entonces infecta las células B nativas en el tejido linfoide, por el receptor CD21, lo cual estimula a los linfoblastos por activación del factor de transcripción, compuesto por tres proteínas EBNA-3A, EBNA-3B y EBNA-3C, quienes autorregulan la expresión de los factores de crecimiento. Esto permite a la célula migrar dentro del folículo e iniciar la reacción germinal y establecer el programa de transcripción que activa a los linfocitos B de memoria. Después de superar esta etapa, el virus pasa a un período de latencia (Burke, Yen, Shekita & Sobin, 1990).

Durante este período el ADN lineal se convierte en ADN circular o episoma; las LCLs transformadas por EBV portan múltiples copias extracromosómicas del episoma viral (Figura 2) y expresan constitutivamente un pequeño número de productos genéticos virales, denominado proteínas de latencia, las cuales comprenden los factores virales de transcripción (EBNAs 1, 2, 3A, 3B, 3C y LP), así como las tres proteínas de membrana (LMPs 1, 2A y 2B), transcritas desde la región *Bam*HI del genoma viral.

Figura 2. Genoma del Virus Epstein Barr



Obtenido de: Young & Rickinson (2004). Epstein Barr virus: 40 years on. *Nature Reviews Cancer*. 4, 757-769.

a. Micrografía electrónica del virión de EBV b. Diagrama que muestra la localización y transcripción de los genes latentes de EBV en el episoma de ADN de doble hebra. El origen de replicación (OriP) se muestra en naranja. Las flechas verdes representan a los exones codificantes de proteínas de latencia, que incluyen EBNAs 1, 2, 3A, 3B y 3C y EBNA-LP) y las tres proteínas de membrana (LMPs 1, 2A y 2B). Las flechas azules superiores representan el área de transcripción de lo microARNs *EBER1* y *EBER2*, manifiestos en infección latente. c. Localización de marco de lectura de proteína de EBV latente en el mapa de restricción-endonucleasa *Bam*HI.

Además de ello, también manifiestan a los micro ARNs *EBER1* y *EBER2* en la región BART del genoma; cuya función aún no es clara, lo cual sucede en los períodos de latencia I y II, en los que se ha demostrado la presencia de ARNs no codificantes y precursores para micro ARNs. En contraste, en la latencia III, ya hay activación y modulación de la expresión génica celular, con coactivación de EBNA2 y mimetismo de la señal de CD40+. En este período de latencia, continúan los virus en las células B de memoria, las cuales mantienen su homeostasis normal. Cuando las células se dividen, expresan el gen EBNA-1. Eventualmente estas células regresan a las amígdalas, y pueden diferenciarse como células plasmáticas y permitir la replicación viral, lo que permite liberar por la saliva el virus a otras personas o infectar a otras células B (Burke, Yen, Shekita & Sobin, 1990; Young & Rickinson, 2004).

La infección primaria de EBV desencadena una fuerte respuesta inmune celular la cual mantiene en condiciones normales la infección bajo control, si las células son infectadas nuevamente pueden ser neutralizadas eficientemente. Sin embargo, los virus persisten latentes de por vida en el hospedero en las células B de memoria, en las que no hay expresión de proteínas virales. Para comprender el papel neoplásico del EBV, es necesario conocer que después de la infección primaria, nunca es erradicado completamente del organismo, permaneciendo presente en una población de linfocitos B en una situación de relativa inactividad conocida como infección latente (Camargo et al, 2011).

Sin embargo, EBV tiene la capacidad de transformar *in vitro* a los linfocitos B, transformándolos en líneas celulares linfoblastoides. Esta capacidad es codificada por 11 genes que se expresan de forma latente en estas líneas celulares infectadas. Se trata de seis antígenos nucleares denominados EBNA, tres antígenos de membrana llamados LMP y dos ARNs de pequeño tamaño localizados en el núcleo y que se conocen como EBER (Bellas, Santón & Plaza, sf).

Dependiendo de los genes expresados en la célula hospedera, se han descrito tres formas diferentes de latencia del EBV, que se detallan en la Tabla 1.

Cuadro 1. Genes de Latencia del Virus Epstein Barr: Funciones y patrones de expresión en las malignidades asociadas

Gen EBV	Función	Latencia I Linfoma Burkitt Ca. gástrico	Latencia II HL, NPC, Nasal, T/NK- linfoma	Latencia III PTLD, PCNSL, DLBCL asociado a VIH
EBNA-1	Mantenimiento del genoma episomal de EBV	+	+	+
EBNA-2	Activación de EBV y expresión génica celular	-	-	+
EBNA 3A, -3B, -3C	Modulación de EBV y expresión génica celular	-	-	+
EBNALP	Coactivación con EBNA2	-	-	+
LMP1	Mimetiza señal CD40	-	-	+
LMP2A	Mimetiza señal de receptores de linfocitos B	+/-	+	+
EBERs	ARNs no codificantes	+	+	+
BARTs	Precursores para micro ARN	+	+	+

Tomado de Fukayama, Ushiku (2011).

DLBCL, linfoma difuso de células B largas, HL, linfoma Hodgkin, PCNSL linfoma primario del sistema nervioso central, PTLD desorden linfoproliferativo post-transfusional.

Los símbolos en las columnas representan + presencia o –ausencia.

La forma de latencia I se observa en el linfoma Burkitt, carcinoma gástrico y en los linfocitos B infectados que circulan en la sangre periférica. En esta forma de infección la expresión del genoma viral queda limitada a los EBERs y a la proteína EBNA-1 cuya función es indispensable para mantener el episoma pero que carece de capacidad inmunógena. Este patrón tan restringido de expresión génica permite a las células infectadas escapar a la vigilancia inmune, favoreciendo así la persistencia de la infección latente (Fukayama, Ushiku, 2011; Bellas, Santón & Plaza, sf).

La forma de latencia II se asocia fundamentalmente a neoplasias. En esta forma se expresan las proteínas EBNA-1 y LMP-1, LMP-2A y 2B y los EBERs y la forma de latencia III es la que caracteriza a las líneas linfoblastoides y se observa también en la mononucleosis infecciosa y en la gran mayoría de los trastornos

linfoproliferativos B asociados a inmunodeficiencia. La inmunosupresión permite que los linfocitos B infectados expresen todas las proteínas asociadas a la infección latente sin que sean reconocidos y eliminados (Bellás, Santón & Plaza, sf).

3. Transmisión y factores de riesgo

La ruta oral es la principal vía de transmisión, sin embargo, hay casos documentados por transfusión sanguínea. En países en desarrollo, la infección se adquiere antes del primer año de vida. La práctica de pre-masticación de los alimentos de los infantes puede contribuir a la infección. En países desarrollados, la infección se adquiere usualmente después de un año de vida hasta la adolescencia. Cerca del 50% de infección primaria en adultos resulta en mononucleosis infecciosa (Hjalgrim, Friborg & Melbye, 2007; CDC, 2006).

La mononucleosis infecciosa se adquiere usualmente por transferencia de saliva en adultos jóvenes. Woodman y su equipo (2005), realizaron un estudio de cohorte en mujeres jóvenes sexualmente activas, en quienes se encontró asociación entre el número de parejas sexuales y la infección por EBV; adicionalmente se detectó ADN viral en muestras citológicas del cérvix.

4. Persistencia, latencia e historia natural de la infección

El virus logra la persistencia de por vida en el hospedero humano, gracias a su habilidad de evadir la respuesta inmune por medio de la infección de linfocitos B y su capacidad de replicarse en la mucosa oral. Después de la infección primaria, el virus ingresa a las células B, y se mantiene en ellas, en muchos casos indetectable, en estado latente de por vida. EBV puede también infectar las células epiteliales de la mucosa, en las cuales produce una replicación viral intermitente. Las células B actúan como reservorio del virus en estado latente en portadores sanos, algunas expresan genes virales latentes, permitiendo la persistencia del virus y evitando la acción citotóxica de los linfocitos T. Aunque, existen poblaciones

celulares que esporádicamente expresan los genes asociados a la transformación y crecimiento viral (Neparidze & Lacy, 2014).

Cuando se asocia EBV a neoplasias se sospecha que deriva de la reactivación viral, la cual se debe a la interacción con factores externos adicionales (Young, 2008).

En estado latente, EBV expresa las siguientes proteínas: EBNA-2, EBNA-3 y EBNA-LP (factores de transcripción); LMP1 y LMP2A (proteínas de señalización), y EBNA-1 (factor de segregación cromosómica). Estas proteínas juegan un papel muy importante en la transformación celular; LMP1 es una proteína integral de membrana que pertenece a la familia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), es capaz de inducir el desarrollo de linfomas en ratones transgénicos y afecta la replicación cuando se expresa en fibroblastos. Además, LMP1 actúa como un activador constitutivo del factor de transcripción NF- κ B y de las proteínquinas activadoras de mitógenos (cinasas de MAP). Por otro lado, LMP2A confiere características transformadoras cuando se expresa en células epiteliales en cultivo, por lo que podría ser un factor importante en la oncogenicidad de EBV relacionada con cáncer gástrico. EBNA-1 promueve la inestabilidad genómica, actividad que podría explicar la translocación myc-BCR que caracteriza al linfoma de Burkitt vinculado con EBV (Rickinson & Kieff, 1996; Kulwichit, Edward, Davenport, Baskar, Godfrey et al, 1998; Allen, Young & Dawson, 2005).

Debido a que EBV establece una infección persistente que daña el epitelio del tubo digestivo y respiratorio de forma constante, se ha propuesto que de forma análoga a *Helicobacter pylori*, la reacción inflamatoria contribuye al cáncer. Sin embargo, los elementos de la respuesta inflamatoria que participan en este proceso se comprenden en menor medida (Fuentes, Camorlinga & Maldonado, 2009).

5. Neoplasias asociadas a EBV

El virus Epstein Barr ha sido asociado con una amplia variedad de neoplasias linfoideas asociadas a linfocitos B, entre ellos linfoma de Burkitt, linfoma no Hodgking, linfoma de células T/NK, linfoma de Hodgking, linfomas asociados a pacientes post-transplantados o con VIH, carcinoma nasofaríngeo y cáncer gástrico (Neparidze & Lacy, 2014).

EBV infecta linfocitos B y T, células dendríticas, células del músculo liso, epitelio plano de orofaringe y nasofaringe y epitelio glandular de tiroides, estómago y glándulas salivales. Sin embargo, los linfocitos B son el mayor reservorio para la persistencia de EBV (Neparidze & Lacy, 2014).

Las características de la infección latente con capacidad de transformación en malignidades están asociadas al mantenimiento de un número estable de genomas episomales extracromosómicos y la alta expresión de genes virales. Los genes virales de latencia codifican seis proteínas nucleares (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C y – LP), tres proteínas citoplasmáticas latentes en la membrana (LMP1, -2A, -2B) y ARN no traducidos EBER 1 y 2, así como el transcrito en sentido positivo *Bam*HI. De ellos, solo se ha demostrado que EBNA-1, -2, -3A y -3C y LMP1 son esenciales para la transformación de células B en células neoplásicas (Neparidze & Lacy, 2014).

EBNA1 es una fosfoproteína ligada a ADN requerida para la replicación y mantenimiento del genoma episomal de EBV. EBNA-2 y EBNA-3 median la activación transcripcional de los genes celulares y virales. LMP1 es la mayor proteína transformante de EBV y en un oncogen clásico *in vitro*. LMP1 funciona como un miembro activado de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, mimetizando la señal de CD40. Las propiedades pleiotrópicas oncogénicas de LMP1 son mediadas por la activación de varias vías de señalización, incluyendo el factor nuclear kB, regulado a su vez por BCL2. LMP2A mimetiza los receptores de células B (BCR). Debido a la ausencia de expresión de

genes virales líticos, incluyendo ADN polimerasa de EBV, las células con infección latente no son susceptibles a los antivirales análogos de nucleósidos como Aciclovir o Ganciclovir (Neparidze & Lacy, 2014).

Tres distintos patrones de expresión de proteínas virales de latencia son identificados en malignidades asociadas a EBV, según se muestra en el Cuadro 1. El linfoma Burkitt es caracterizado por la expresión únicamente del gen EBNA 1 (latencia I), mientras que la expresión de los 6 EBNA's y LMP1, -2A, y -2B (latencia III) caracteriza los linfomas relacionados con inmunosupresión. En la latencia II, la expresión es limitada a EBNA 1 y los LMPs, como ocurre en linfoma Hodgking y carcinoma nasofaríngeo. Sin embargo, los patrones de latencia específicos están ligados a malignidades relacionadas a EBV, con una heterogenicidad de expresión sobre los tumores del mismo tipo histológico. La respuesta inmune a infección latente por EBV correlaciona con los patrones de expresión latente del virus, lo cual es importante por las implicaciones de la inmunoterapia para malignidades específicas asociadas a EBV (Neparidze & Lacy, 2014).

El papel patogénico de EBV en la oncogénesis es un área bajo investigación. Este virus activa múltiples señales celulares de transcripción que regulan el crecimiento celular y promueven su sobrevivencia. Ha sido detectada variabilidad geográfica en la incidencia de algunos tumores relacionados con este virus. Por ejemplo, el linfoma de Burkitt es endémico en el sur de China y África ecuatorial, pero no es común alrededor del mundo. El linfoma extranodal nasal del tipo NK/linfocitos T muestra una predilección geográfica por regiones de Asia, Sur América, Centro América y rara vez por Norte América y Europa. A la fecha no existe explicación para estas asociaciones geográficas, sin embargo, estudios preliminares implican cofactores ambientales sobre predisposición genética o cepas virales oncogénicas (Neparidze & Lacy, 2014).

EBV también está asociado como factor no queratinizante en carcinoma nasofaríngeo y carcinoma gástrico. El papel patogénico de este virus en la

carcinogénesis epitelial aún no es bien dilucidado. Como EBV está asociado a linfomas, la infección en estos epitelios neoplásicos es latente, con expresión de EBNA 1 así como EBERs y BARTs no traducidos. Las oncoproteínas LMP se cree que juegan un papel oncogénico directo, promoviendo la expresión de genes, crecimiento celular y escape de apoptosis. Los descubrimientos recientes de los micro-ARNs codificados por EBV muestran una función reguladora y pueden jugar un papel importante en la carcinogénesis (Neparidze & Lacy, 2014; Fukayama & Ushiku, 2011).

La infección por EBV sola no es suficiente para transformar las células epiteliales, por otro lado, múltiples anormalidades epigenéticas y genéticas han sido descritas asociadas a este virus en cáncer gástrico (Neparidze & Lacy, 2014).

El papel de EBV en el cáncer gástrico fue sugerido por primera vez en un estudio realizado en pacientes asiáticos. El genoma de EBV fue identificado dentro del carcinoma gástrico y el epitelio displásico adyacente, pero no se encontró en los linfocitos circundantes, células del estroma, células de metaplasia intestinal y mucosa normal. Además, la detección de episomas monoclonales de este virus en cáncer gástrico, sugieren fuertemente el papel etiológico en esta neoplasia. El cáncer gástrico asociado a EBV está caracterizado en la región promotora de la isla de metilación CpG en varios genes relacionados al cáncer, algunos silenciados como PTEN, p16 y E-caderinas. Histopatológicamente existen dos subtipos de EBV asociados a cáncer gástrico, el linfoepitelioma similar a carcinoma y el adenocarcinoma gástrico convencional (Neparidze & Lacy, 2014).

EBV es detectado entre el 5 – 10 % de casos de cáncer gástrico alrededor del mundo. El carcinoma gástrico asociado a EBV se caracteriza por presentar un infiltración linfoide y localización proximal, distinguible de otros tipos de carcinoma gástrico que ocurren en personas jóvenes con características histopatológicas propias. El patrón latente de EBV en carcinoma gástrico corresponde a un estadio de latencia intermedia regulada por EBNA-1, EBERs, BARF-0, LMP-2A y micro

ARNs, además se pueden expresar algunos genes líticos como BART-1 y BHRF-1. La principal anomalía molecular en el cáncer gástrico asociado a EBV es la isla de metilación CpG en la región promotora de varios genes relacionados al cáncer. Esta metilación se atribuye a LMP-2A, lo cual ocasiona la represión del gen supresor tumoral PTEN (Fukayama & Ushiku, 2011; Luo et al, 2005).

En cultivos celulares en biopsias de pacientes con cáncer gástrico EBV expresa proteínas de latencia, que le confiere resistencia a apoptosis inducida por un proceso de privación. En este proceso se expresan varias proteínas como HTLV-1 Tax, HPV-16E6, HBx regulan la sobrevivencia celular, como ocurre en otras neoplasias, como mecanismo común expresado por virus oncogénicos (Hino et al, 2008).

Aún existen discrepancias en la literatura en cuanto a las características clínico-patológicas y el pronóstico en el cáncer gástrico asociado a EBV. Se considera que existen diferencias clínicas y moleculares en ambos tipos de cáncer gástrico asociados a este virus. Por lo que se necesitan futuras investigaciones para determinar el curso clínico y la sobrevivencia de pacientes, así como las implicaciones terapéuticas relacionadas con la presencia de EBV (Neparidze, Lacy, 2014).

6. Interacciones entre EBV y otros agentes

El virus Epstein Barr permanece en estado de latencia en los humanos a lo largo de la vida del hospedero, sin manifestar consecuencias. Esto sugiere fuertemente que existen factores capaces de reactivar la replicación viral con potencial carcinogénico asociado.

EBV puede ser reactivado desde un estado latente por varios mecanismos que le permiten desarrollar patologías, los factores identificados son:

a. Antígenos externos

En portadores sanos, EBV se mantiene latente expresando únicamente EBERs en linfocitos B de memoria. La replicación viral puede ocurrir únicamente en los períodos en los que las células están en división, lo cual puede ocurrir ya sea cuando estos linfocitos se dividen o cuando se diferencian en células plasmáticas debido a que son activadas ante la presencia de antígenos externos, como parte de la respuesta inmune. Lo cual significa que cualquier infección adicional puede potencialmente reactivar al EBV en estas células (Laichalk & Thorley, 2005).

b. Inmunodeficiencia

La infección por VEB está estrictamente regulada bajo estrecho control por la inmunidad mediada por células en individuos inmunocompetentes. Las inmunodeficiencias iatrogénicas como en receptores trasplantados, congénitas o relacionadas con VIH permiten la diseminación descontrolada de EBV reactivados desde linfocitos B infectados, los cuales pueden ocasionar varios desórdenes linfoproliferativos (IARC, 1997).

c. Malaria

La infección con ambos agentes EBV y *Plasmodium falciparum* juntos, son reconocidos por generar el linfoma Burkitt en niños entre los 5 a 9 años de edad que viven en áreas endémicas para malaria con una carga elevada de EBV en linfocitos T; los cuales coinciden con los picos de elevación de la enfermedad. Además, la malaria aguda permite el incremento de niveles circulantes de EBV que se agudiza tras el tratamiento anti malaria. Un mecanismo molecular directo ha sido demostrado entre *P. falciparum* y EBV. Una proteína de membrana del *P. falciparum*, la CIDIR1 α , que posee un dominio rico en cisteína, ha demostrado que actúa como un activador de linfocitos B e induce el ciclo lítico de EBV (Chêne et al, 2007).

d. Alimentos

En la región sur de la República Popular de China, en donde el carcinoma nasofaríngeo es una malignidad muy común, la ingestión de pescado salado ha demostrado ser un importante factor de riesgo para desarrollar esta neoplasia. En Túnez, alimentos preservados con varias especies también han sido asociados con el carcinoma nasofaríngeo (Shao et al, 1988).

e. Inflamación

El factor de crecimiento beta $TGF\beta$ -1 es una citosina multifuncional que se expresa durante inflamación e induce la reactivación de EBV en líneas celulares de carcinoma gástrico infectadas con este virus, por inducción inmediata de BZLF-1 y sus proteínas (Fukuda et al, 2001).

f. Agentes químicos y drogas

Existen varios compuestos químicos que pueden activar del período de latencia del virus a un período lítico en cultivos celulares. Entre estos grupos se incluyen ésteres, los cuales son agonistas de proteinquinasa C; el butirato de sodio y la tricostatina A actúan como inhibidores de histona diacetilasa; el 5-aza-2-deoxycitidina, el cual es un inhibidor de ADN metiltransferasa, y la inmunoglobulina G, la cual activa receptores en linfocitos B (Fukuda et al, 2001).

7. Marcadores biológicos y el estadio de la infección

a. Respuesta a anticuerpos anti EBV

La detección de anticuerpos anti EBV en fluidos biológicos es el método de diagnóstico más utilizado. Distintos patrones de respuesta de anticuerpos han sido identificados entre la infección primaria, infección latente, portadores sanos, reactivación viral y varias enfermedades asociadas a EBV.

En la mononucleosis infecciosa, al inicio de los síntomas clínicos de la enfermedad hay una elevación sustancial de los títulos de anticuerpos IgM dirigidos

hacia la cápside viral (ACV). Esta IgM desciende a partir de las 4 a 6 semanas del inicio de la sintomatología y desaparece alrededor del tercer mes. Sin embargo, es poco específica y las infecciones por otros virus del grupo herpes pueden inducir la aparición de este anticuerpo. Así mismo, las enfermedades con gran activación inmune también pueden producir su aparición. Aparece en el 60% de los niños mayores de 12 años y adultos (IARC, 1997).

En los primeros seis meses, después de la infección, se observan picos de elevación de anticuerpos IgG hacia antígenos de expresión temprana (EA), los cuales se dividen en antígeno temprano difuso (EA-D), el cual codifica para BMRF-1 y el antígeno temprano restringido (EA-R) que codifica para BHRF-1 y para antígenos de la cápside viral, algunas veces aparecen anticuerpos IgA para esos antígenos. Mientras los títulos de anticuerpos IgM anti- ACV desaparecen a los pocos meses, los títulos de anticuerpos IgG-ACV se elevan, mientras que los anticuerpos IgG anti-EA se vuelven indetectables. Los anticuerpos neutralizantes a las glicoproteínas de envoltura gp350 son detectables durante la fase aguda de la mononucleosis infecciosa, pero pueden tornarse indetectables con el paso del tiempo (IARC, 1997; Da Silva, García & González 2010).

La serología para los anticuerpos anti-EBNA (antígenos del núcleo viral), presentan un patrón interesante en la mononucleosis infecciosa, en cuanto que durante la fase aguda de la infección los pacientes muestran respuesta hacia EBNA-2, algunas veces hacia EBNA-3A, -3B y -3C, mientras que la respuesta de IgG anti-EBNA-1 es usualmente indetectable hasta la convalecencia de la enfermedad. La producción de estos anticuerpos anti-EBNA-1 se elevan al progresar la enfermedad, manteniéndose elevados por más tiempo que los anticuerpos anti-EBNA-2 (IARC, 1997).

En portadores sanos, los anticuerpos neutralizantes anti-gp350 y EBNA-1 se detectan continuamente en el suero, el título de estos anticuerpos es estable a través del tiempo, pero presenta variaciones entre individuos. Aunque los

anticuerpos para EBNA-1 y anti-ACV (cápside) persisten durante toda la vida, parece que no tienen un papel protector (Moss et al, 1992).

En neoplasias asociadas a EBV no se ha definido un patrón específico que pueda definir el pronóstico en estos pacientes. Sin embargo, IgA anti-ACV fue propuesto como un marcador pronóstico para cáncer nasofaríngeo (Lo, et al., 2004).

Se ha desarrollado una prueba rápida y fácil de realizar mediante la técnica de inmunofiltración (IMFA) que detecta anticuerpos IgM contra el factor ZEBRA (acrónimo de las proteínas de superficie BZLF1, Zta, Z, EB1), las cuales se expresan únicamente durante el período de latencia. Posee 92.5 % de sensibilidad y especificidad del 97.3 %, lo que permite sustituir la técnica de detección de anticuerpos heterófilos en niños menores de 5 años (Bravo, et al., 2009).

b. Detección de EBV en tejidos y sueros

En portadores sanos, EBV está presente en forma latente como ADN episomal o circular en linfocitos B. La frecuencia de EBV en sangre periférica varía de 1 copia de ADN episomal en $1 \times 10^5 - 10^7$ células mononucleares, o 1 copia en 1×10^4 linfocitos B, permaneciendo esta cantidad constante a lo largo de la vida. Se ha calculado que se requiere menos de 1 en 40 células infectadas por EBV para replicarlo en sangre periférica en portadores sanos, por lo cual se requiere de pruebas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para detectarlos (IARC, 1997).

El genoma de EBV puede ser detectado en células tumorales por PCR o hibridización *in situ* usando el fragmento viral BamH1 como sonda. Sin embargo, el uso de sondas específicas para ARNs que codifican segmentos cortos nucleares como EBER-1 o EBER-2, han mejorado la detección debido a que son altamente expresadas en neoplasias. Además, la hibridización *in situ* de la región codificante EBER de EBV es la metodología de elección para la detección en biopsias. Varios estudios demuestran que las tinciones de los núcleos de células infectadas por EBV,

remarcan la cromatina y presentan nucléolos periféricos. Aunque en varios países el diagnóstico de malignidades asociadas a EBV se enfoca en la detección de ADN viral o los productos de los genes en células neoplásicas, se prefiere la detección de sondas específicas de ARNs que indican la replicación activa (Neparidze & Lazy, 2014).

La detección del transcrito EBER por hibridización *in situ* es considerado el método estándar de oro para localizar EBV latente en muestras tisulares, ya que este transcrito se expresa universalmente en todos los tumores asociados con EBV. La detección inmunohistoquímica de la expresión de LMP1 en células tumorales no se expresa en todos los tumores, por lo que es un débil marcador de este tipo de neoplasias (IARC, 1997; Neparidze & Lazy, 2014; Fukayama & Ushiku, 2011).

La determinación del ADN de EBV en sangre completa, células mononucleares de sangre periférica, plasma o suero por PCR, ha sido extensamente evaluada como un potencial marcador de malignidades asociadas a este virus. Este tipo de detección es particularmente útil para predecir el desarrollo de desórdenes linfoproliferativos post-transplante (PTLD) y el monitoreo de respuesta al tratamiento (Neparidze & Lazy, 2014).

Por otro lado, para el diagnóstico de carcinoma nasofaríngeo, se recomienda la detección de ADN genómico de EBV por PCR usando genes EBV (EBNA-1, EBNA-2 y LMP-1) como blanco en muestras de tejidos obtenidas de biopsias por aspiración con aguja fina (Yap et al, 2007).

El ADN del EBV extracelular ha sido detectado en plasma y suero de pacientes con malignidades severas asociadas a EBV, como enfermedad de Hodgkin, linfoma de células T/NK, linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo y carcinoma gástrico. El ADN de EBV en plasma puede ser cuantificado por PCR-tiempo real, constituyéndose en un marcador útil para diagnóstico, monitoreo y predicción de estas enfermedades asociadas a EBV (Lo et al, 2001).

Aun cuando no se detecte ADN viral en individuos portadores sanos, se puede detectar el ADN de EBV en sus linfocitos, debido a que dicho ADN viral no suele encontrarse en suero en ausencia de enfermedad activa. Sin embargo, en casos de reactivación de las enfermedades, el ADN puede detectarse séricamente como ocurre en infecciones primarias, lo que permite el diagnóstico de reactivación en pacientes inmunocomprometidos (IARC, 1997).

8. Epidemiología de la infección

En la década de 1970 la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC acrónimo en inglés) demostró que más del 90 % de adultos alrededor del mundo están infectados por EVB, basados en la detección de anticuerpos anti-EBV (especialmente anticuerpos para cápside viral (ACV) y fijación del complemento. Varios estudios epidemiológicos, han demostrado desde entonces la alta prevalencia de EBV, inclusive en poblaciones que habitan en áreas remotas (IARC, 1997; Young, 2008).

La edad de la primera infección varía sustancialmente y la exposición al EBV está asociada a factores socioeconómicos, como hacinamiento y malas condiciones sanitarias. Por ejemplo, mientras más del 80% de niños en Uganda fueron detectados seropositivos para EBV al año de edad, a esa misma edad el 45% de niños en áreas rurales de Estados Unidos de América estaba infectados (Hsu & Glaser, 2000).

Sin embargo, la infección primaria por EBV durante el período de la infancia temprana, es usualmente subclínica o presenta síntomas similares a afecciones respiratorias, al contrario de lo que ocurre cuando es adquirida por primera vez en infancia tardía y adolescencia manifestándose con mononucleosis infecciosa (Hsu & Glaser, 2000).

Chan y colaboradores (2001), determinaron en una región de Hong Kong, la edad de primera infección por EBV a los ocho meses de edad, lo cual implica un

papel protector por anticuerpos maternos y explica parcialmente que durante la infancia temprana no se desarrollen síntomas.

Los principales tipos de EBV, EBV-1 y EBV-2 han sido identificados en diferentes áreas geográficas. Pacientes inmunocomprometidos presentan los dos subtipos de EBV. EBV-2 es más común en África y en hombres homosexuales, pero, otros estudios demuestran que los pacientes con infección por VIH, tienen menores tasas de infección por EBV-2 (Thompson & Kurzrock, 2004).

C. Cáncer gástrico

El cáncer tiene un origen multifuncional y su desarrollo depende de la interacción de determinados genes con el medio ambiente, los que contribuyen con su aparición y progreso. Entre los factores ambientales, se ha encontrado asociación entre el alto consumo de sal, alimentos ahumados y alto consumo de frituras con el desarrollo de adenocarcinomas gástrico, además de los factores clásicos considerados como carcinogénicos, como el tabaco y alcohol (De la Riva, Muñoz & Sola, 2004).

Aun cuando existen etiologías con fuerte componente hereditario en los que la genética del paciente es el principal determinante del desarrollo del cáncer, la mayor parte de las mutaciones son esporádicas, tanto así que se considera que menos del 15 % de estas neoplasias tienen un componente genético heredado. Por ello se considera que el principal desencadenante de estas neoplasias es la exposición a carcinógenos ambientales, o a agentes infecciosos que contribuyen a generar las neoplasias y a quienes se les denomina como agentes carcinógenos (Schottenfeld, Beebe-Dimmer, 2006; McLean, El-Omar, 2014).

El cáncer gástrico (CG) es una de las neoplasias más comunes, se ubica como segunda causa de cáncer alrededor del mundo. Alrededor de 70% de nuevos casos y muertes relacionadas con esta neoplasia ocurren en países en desarrollo. Los mecanismos epigenéticos son esenciales para el desarrollo normal y mantenimiento

de los patrones de expresión genética en mamíferos. Recientes avances en la epigenética del cáncer han mostrado reprogramaciones extensas de cada componente de la maquinaria epigenética en cáncer, incluyendo metilación de ADN, modificaciones de histonas, posicionamiento de nucleosomas, ARNs no codificados y micro ARNs. La metilación aberrante de ADN en las regiones promotoras de genes, las cuales permiten la inactivación de supresores tumorales y otros genes relacionados con cáncer en células cancerosas, siendo el mecanismo mejor explicado en el cáncer gástrico. La ventaja de la metilación genética es utilizar el ADN como blanco para la detección y diagnóstico de cáncer, en muestras de biopsias, así como en lavados gástricos (Qu, Dang & Hou, 2013).

Tradicionalmente se clasifica al cáncer gástrico en dos subtipos principales, intestinal o difuso, basados en la clasificación de Lauren. Estos subtipos se diferencian por sus características moleculares y los patrones en el desarrollo. Por ejemplo, el tipo intestinal generalmente surge de cambios gástricos premalignos, como gastritis crónica atrófica, seguida por metaplasia intestinal y displasia, que desarrolla cambios inflamatorios crónicos. En contraposición, la forma difusa no surge de cambios previos sino que aparece desde una mucosa gástrica normal sin estadios previos de malignidad. Este tipo de neoplasia está asociado con características patológicas como pérdida de la cohesión (McLean & El-Omar, 2014).

Una característica común en la infección por agentes oncogénicos virales y bacterianos es su tendencia a establecer infecciones, que pueden durar toda la vida, en el individuo afectado. La infección por EBV ocurre generalmente en la infancia y las primeras manifestaciones tumorales, usualmente se presentan después de los 50 años de vida. Este tipo de infecciones persistentes desencadenan reacciones inflamatorias crónicas, en las cuales el sistema inmunitario logra confinar la infección a un número limitado de células, ya que no es efectivo para erradicarlas del organismo. Esta respuesta inflamatoria crónica provoca un daño significativo y constante al órgano infectado, que puede propiciar la aparición de cáncer (Fuentes, Camorlinga & Maldonado, 2009).

La respuesta inflamatoria a agentes infecciosos se caracteriza por la expresión local de citosinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, las cuales regulan el reclutamiento secuencial de leucocitos y estimulan fibroblastos y células endoteliales para dividirse y producir componentes de remodelación de tejido y neovascularización. Esta reacción la regula en particular la vía NF-kB, que activa la transcripción de factores de crecimiento, genes antiapoptóticos y otras proteínas como ciclooxigenasa 2 (COX2), sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), citosinas proinflamatorias, moléculas de adhesión, quimiocinas y metaloproteína 9 (MMP9) (Li & Verma, 2002).

En condiciones normales, una reacción inflamatoria se autolimita a través de la disminución de factores proinflamatorios e incremento de antiinflamatorios. Las células inmunitarias sufren apoptosis y son fagocitadas, además de que se revierten los cambios vasculares. Se conoce poco acerca de los mecanismos de resolución de la inflamación y la manera por la cual se evaden infecciones persistentes. Sin embargo, la permanencia de los leucocitos, principalmente linfocitos denotan un proceso de inflamación crónica (Fuentes, Camorlinga & Maldonado, 2009).

En el microambiente del tumor, la interacción entre varios tipos celulares determina el efecto de las citosinas sobre el desarrollo y progresión de las neoplasias. IL-23, TGF- β , IL-6, IL-17 y TNF- α tienen efectos directos sobre el crecimiento celular, la sobrevivencia y las propiedades invasivas de las células tumorales, a la vez que dirigen infiltración del sistema inmunitario que diseminan el tumor en otros microambientes (Fuentes, Camorlinga & Maldonado, 2009).

La relación infección e inflamación con cáncer se comprende mejor en el cáncer gástrico, que resulta por el daño intracelular del epitelio gástrico, o por inducción de transcripción y replicación de células infectadas como ocurre en EBV, ambos de manera constante, probablemente a través de la reacción inflamatoria a la infección. En la actualidad, se reconoce que una gran variedad de neoplasias inicia a partir de procesos de inflamación crónica (Coussens & Werb, 2002).

Los síntomas clínicos de cáncer gástrico tienden a aparecer tardíamente en el desarrollo de la enfermedad, cuando las opciones de tratamiento son limitadas, lo que contribuye a un mal pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, se continúan realizando investigaciones para comprender mejor la patogénesis de esta neoplasia a nivel celular, a fin de identificar biomarcadores que permitan un diagnóstico oportuno y monitorear la progresión o recurrencia (McLean & El-Omar, 2014).

Skaradkiewicz y colaboradores (2015), evaluaron por técnicas inmunohistoquímicas la expresión de las proteínas p53 y bcl-2 en biopsias de carcinoma gástrico, determinando que EBV está asociado con adenocarcinomas y relacionado con resistencia a apoptosis.

1. EBV y cáncer gástrico

El otro agente oncogénico relacionado con cáncer gástrico es el EBV. Se conocen dos mecanismos directos de transformación a partir de la infección viral. El primero se debe a la expresión de oncogenes virales, que alteran diferentes vías de señalización celular o inactivan genes supresores de tumores; el segundo supone la inserción del genoma viral en sitios críticos del genoma celular. En ambos casos, se afecta sobre todo la capacidad de proliferación y la apoptosis celular (Butel, 2000).

EBV asociado a carcinoma gástrico es definido por la presencia de infección latente del virus en células neoplásicas. EBV codifica micro ARNs, y EBER, los cuales son abundantes en las células infectadas por el virus en estado latente (arriba de 10^7 copias por célula). Usando hibridización *in situ* para detección de EBER, todas o por lo menos la mayoría de las células neoplásicas muestran una señal positiva. Por lo que la hibridización *in situ* de EBER ha sido usada como método estándar de oro para identificar a EBV asociado a carcinoma gástrico. Factores étnicos y ambientales han sido implicados en la variabilidad de las frecuencias, pero hasta la fecha no han sido conclusivos. La frecuencia varía del 15% en Chile, 9.9% para Estados Unidos, 9.2 % para Europa y 8.3 % para Asia. Un

estudio de meta análisis reporta una incidencia anual de cáncer gástrico alrededor del mundo de 900,000 casos, con 70,000 a 80,000 nuevos casos cada año (Fukuyama & Ushiku, 2011).

El carcinoma gástrico es una de las neoplasias más frecuentes en países como Japón y es uno de los tumores relacionados con EBV. Sugiura y colaboradores (1996) determinaron que el 7% de los carcinomas gástricos estaban relacionados a infección por EBV, con detección de la expresión de los antígenos nucleares EBNA1 y LMP2A pero no EBNA2 o LMP1. La transcripción de EBNA fue iniciado por uno de los tres promotores Qp, mientras que Cp y Wp fueron silenciados, reflejándose en la ausencia de EBNA2. La proteína latente de membrana (LMP) 2a fue detectada en 42.85% de los casos evaluados. La transcripción de la región BamHI-A fue detectada en todos los casos. El gen de replicación temprana BZLF1 y sus productos no se expresó en ninguno de los casos, lo que sugiere que las células portadoras de EBV estaban en latencia.

Este tipo de neoplasia es altamente prevalente en Asia, particularmente en China, y es una de las mayores causas de muerte por cáncer alrededor del mundo (Qu, Dang & Hou, 2013).

Las características epidemiológicas del cáncer gástrico asociado a EBV incluyen predominio del género masculino y un mayor número de casos en edad juvenil. Frecuentemente se asocia por endoscopía como tumores ulcerados acompañados de daño en la pared gástrica. Muestra un bajo grado de nódulos linfáticos implicados, especialmente durante los estadios tempranos de ubicación en la mucosa. La incidencia de múltiples carcinomas parece ser mayor en cáncer gástrico asociado a EBV (Fukuyama, Ushiku, 2011).

Estudios para esclarecer la histogénesis de cáncer gástrico asociado a EBV están enfocados en dos direcciones, una es caracterizar el linaje de células neoplásicas y trazar una secuencia morfológica de la infección por EBV en las células del epitelio gástrico; mientras que la otra línea de investigación está

orientada en la progresión del carcinoma gástrico, identificando varias moléculas, especialmente inmunomoduladores, los cuales están asociados con el reclutamiento de linfocitos en el estroma gástrico (Fukuyma, Ushiku, 2011).

Al investigar la relación entre *H. pylori* y EBV en enfermedad gastrointestinal, Sanket y col (2011), determinaron que la presencia de ambos agentes fue más alta en los pacientes con cáncer gástrico y úlcera péptica que en los pacientes que presentaban dispepsia no ulcerosa. No se encontró diferencia significativa en pacientes con cáncer gástrico y la presencia de EBV, por lo que se sugiere un posible papel de *H. pylori* en modular la conversión de EBV de su estadio latente al lítico y con ello favorecer el desarrollo de cáncer gástrico.

2. Factores asociados a desarrollo de cáncer gástrico

Considerando la profunda y amplia variedad de eventos involucrados en el desarrollo de cáncer gástrico, como metilación, silenciamiento de genes, se incrementan las evidencias del potencial oncogénico de algunos factores ambientales como la polución química, componentes dietéticos y otros factores exógenos. Es claro que entre los factores de riesgo mayores para el desarrollo de esta neoplasia es la infección por *Helicobacter pylori* y en alguna medida por EBV. Entre los factores asociados al desarrollo de este tipo de cáncer están:

a. Edad

Es un importante factor de riesgo en el desarrollo de cáncer gástrico. Los genes relacionados con tumores raramente son metilados en personas jóvenes, en contraste con personas mayores. La asociación entre disminución global de la metilación de ADN de genes oncogénicos y la edad ha sido reportado tanto en humanos como en modelos animales. Por otro lado, la metilación de genes supresores de tumores aumenta de forma directa con la edad de los pacientes, habitualmente en regiones exónicas relacionadas con secuencias promotoras. Describiéndose un aumento en el número de casos a partir de los 30 años. Sin

embargo, Matta & De León (2015) indican que, para Guatemala el rango de edad más afectado es de 41 a 80 años (Qu, Dang & Hou, 2013).

b. Dieta

Factores nutricionales, como deficiencias de folatos y deficiencia de colina son conocidas como inductoras de hipometilación, principalmente de genes supresores de tumores. Estas deficiencias están asociadas usualmente a deficiencias en metionina, la cual es indispensable para la síntesis de ácido fólico y es provista en frutas y vegetales. Por otro lado, varios estudios han demostrado el papel protector de la ingesta de té verde, se considera que esto es debido a que este té posee varios compuestos polifenólicos que tienen un papel protector sobre el ADN (Qu, Dang & Hou, 2013).

c. Inflamación crónica

Estudios epidemiológicos han identificado que existe una fuerte relación entre las infecciones crónicas y la inflamación con la expresión de genes de latencia de EBV relacionados con cáncer, considerándolos por ello, como el mayor factor de riesgo en varios tipos de cáncer. Existen varios mediadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), la Interleucina 1 (IL-1) y especies reactivas de nitrógeno que están envueltas en la metilación aberrante del ADN durante la génesis del tumor, incluyendo la del cáncer gástrico. Sin embargo, los mecanismos biológicos no están bien dilucidados aún, por lo que se continúa estudiando el tema (Qu, Dang & Hou, 2013).

d. Actividad física

Por otro lado, es bien conocido por estudios epidemiológicos que la actividad física protege de cáncer, incluyendo al cáncer gástrico. Se han encontrado secuencias genéticas supresoras de cáncer metiladas en pacientes con cáncer gástrico y sedentarismo, en comparación con los que realizan alguna actividad

física. De hecho, un gran número de genes relacionados con tumores están metilados en el epitelio gástrico (Qu, Dang & Hou, 2013).

3. Epidemiología del cáncer gástrico

El cáncer es un problema de salud pública, con una considerable cantidad de casos de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo. La OMS calcula que cada año hay cerca de 10 millones de casos nuevos, con incrementos anuales alrededor del mundo. De acuerdo a GLOBOCAN (2012), se estima que 952,000 nuevos casos de cáncer gástrico ocurrieron en 2012 (6.8 % del total de casos de cáncer). Estos hallazgos ubican al cáncer gástrico como la quinta causa más común de malignidad en el mundo, después del cáncer de pulmón, mama, colorrectal y próstata. De estos casos, 70 % ocurren en países en desarrollo, la mitad de los casos totales a nivel mundial ocurren en Asia Oriental (predominantemente China) (Ferlay et al, 2013).

El cáncer gástrico es la tercera causa de cáncer relacionada a mortalidad en ambos sexos, alrededor del mundo (723 000 muertes en 2012, 8.8 % del total de defunciones). Sin embargo, la evidencia publicada en 2013 indica que los casos de cáncer gástrico han disminuido en comparación con las décadas pasadas en muchos países europeos, lo cual se atribuye a un cambio en el estilo de vida y cambios ambientales como disminución del consumo de cigarrillos y erradicación de *H. pylori* (McLean & El-Omar, 2014).

En México, la mortalidad por tumores malignos se ha incrementado de 9.7 % en 1990 a 12.9 % en 2006. Debido al proceso de transición demográfica y epidemiológica actual, se prevé en las próximas décadas un predominio de adultos mayores con el consecuente aumento en el número de casos de cáncer y una mayor presión económica y demanda de servicios médicos (WHO, 2006).

En Guatemala, el registro del cáncer se inició en 1975 y funciona como una dependencia de la Liga Nacional contra el Cáncer, proporcionando las estadísticas hospitalarias a nivel nacional. Este registro cuenta únicamente con el cálculo de tasas de incidencia y mortalidad para el trienio 1995-1997. En estos datos de

incidencia a nivel del país, se observa que el cáncer del estómago ocupa el tercer lugar en frecuencia para ambos géneros, mientras que a nivel del departamento de Guatemala, es el más frecuente en hombres y el tercero en mujeres (INCAN, 2002).

Al revisar expedientes de pacientes con cáncer gástrico del 2004 al 2007 del INCAN, se determinó que al 87 % de los expedientes analizados (248/284) el diagnóstico se realizó por endoscopia y únicamente a 69 (27.8 %) se le investigó presencia de *H. pylori* encontrando positividad en 22 (31.9 %), sin datos referentes a la infección por EBV. Se encontraron 85 casos de cáncer difuso que corresponden al 34.3 % y 134 de tipo intestinal (54 %). El área del estómago más afectada fue el antro gástrico (44.5 %), unión esófago y estómago (15.5 %) y cuerpo (12.3 %). Así mismo se determinó predominio del género masculino (56.7 %) para el tipo intestinal y 55.3 % en el tipo difuso. Al analizar los factores de riesgo, se estableció que la infección por *H. pylori* representa el doble de riesgo de sufrir un cáncer de tipo intestinal que uno difuso (Matta, V. & De León, J., 2015).

Waldheim & Villeda (2014) señalan que, en el INCAN, se diagnosticaron neoplasias malignas a 3,165 pacientes, de los cuales 4.1 % eran por cáncer de estómago.

4. Tratamiento

El tratamiento del cáncer gástrico depende del estadio de la neoplasia, sin embargo, es altamente resistente tanto a la radioterapia como a la quimioterapia, el principal tratamiento es la gastrectomía. Los métodos diagnósticos recientes y los avances en terapéutica han mejorado la expectativa de vida para los pacientes diagnosticados tempranamente con cáncer gástrico, lamentablemente, el diagnóstico es usualmente en estadio avanzado y el pronóstico es malo. Por ello, un mejor entendimiento de la patogénesis y eventos moleculares del cáncer gástrico pueden permitir un mejor diagnóstico, así como estrategias preventivas y terapéuticas para esta enfermedad (Qu, Dang & Hou, 2013).

El tratamiento de elección del cáncer gástrico asociado a EBV es la remoción quirúrgica. El tratamiento endoscópico puede ser aplicado inclusive en algunos casos especialmente, en etapas tempranas, en las cuales únicamente existe invasión a la submucosa, con baja frecuencia de metástasis a nódulos linfáticos. No se ha observado recurrencia en los pacientes así tratados por más de cuatro años. Un estudio clínico patológico en Holanda demostró que el cáncer gástrico asociado a EBV tiene una baja frecuencia de metástasis linfática comparada con el cáncer de estómago no asociado a EBV, resultando así, en un mejor pronóstico para los pacientes con EBV. Aunque es necesario realizar más estudios para identificar los mecanismos asociados al pronóstico de los pacientes (Nishikawa, et al., 2014).

D. Instituto de Cancerología –INCAN-

La Liga Nacional contra el Cáncer es una asociación sin fines de lucro. Tiene como objetivo promover la organización y realización en la República de Guatemala de la lucha contra el cáncer y todas sus manifestaciones, actuando por sí misma y en cooperación con los organismos oficiales y privados, cuyos fines sean análogos a ella. Está conformada por el Instituto de Cancerología y Hospital “Dr. Bernardo del Valle S.” (INCAN), el Departamento de Prevención, Investigación y Educación en Salud (PIENSA), el Patronato y la Farmacia (Liga Nacional contra el Cáncer, sf).

1. Historia

La Liga Nacional contra el Cáncer fue fundado en 1952 por el Club Rotario de Guatemala. La comisión de organización fue presidida por el Doctor Bernardo del Valle Samayoa, y sus estatutos y personalidad jurídica fueron aprobados por Acuerdo Gubernativo el 3 de febrero de 1953. La primera clínica se inauguró el 28 de agosto de 1953 en las instalaciones del Hospital General San Juan de Dios y su presupuesto fue financiado por la Liga.

En 1954 obtuvo del gobierno, un terreno aledaño al Hospital Roosevelt, en donde se construyó el hospital que fue inaugurado en 1969. Inicialmente tenía una capacidad de alojar a 80 pacientes, actualmente esta capacidad ha aumentado a 121 pacientes (Liga Nacional contra el Cáncer, sf).

Actualmente atiende a 80,000 pacientes anuales y detecta en promedio 3,500 casos de cáncer con un presupuesto de 75 millones de quetzales cada año (Liga Nacional contra el Cáncer, sf).

III. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala, el cáncer gástrico ocupa el tercer lugar en frecuencia en ambos géneros, mientras que, a nivel del departamento de Guatemala, es el más frecuente en hombres y el tercero en mujeres. Según datos del Instituto de Cancerología (INCAN), la tasa de incidencia del cáncer de estómago para el trienio de 1997-1999 fue de 5.90 x 100,000 habitantes del Departamento de Guatemala y de 18.38 x 100,000 habitantes a nivel de país (último reporte publicado).

Así también, según reportes del INCAN durante el período de 1999 a 2010 hubo un aumento en el número de casos de cáncer gástrico asociado a la edad de los pacientes. Para el 2011 Waldheim & Villeda (2014), reportan que esta neoplasia representa el 4.1% de casos de cáncer atendidos en el INCAN para ese año, lo cual representa a 130 pacientes.

A nivel mundial, se asocia la infección por el virus Epstein Barr con el 10 % de los casos de cáncer gástrico. Sin embargo, en Guatemala no se han encontrado estudios que investiguen la presencia de este virus en pacientes con cáncer de estómago. Por lo tanto, este estudio permitió identificar la presencia de EBV en este tipo de cáncer y los factores de riesgo asociados. Implementar el diagnóstico de la infección por este virus de manera rutinaria, contribuirá a orientar un tratamiento oportuno y adecuado para prevenir el desarrollo de cáncer gástrico (Kumar, et al, 2011).

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo General

Estimar la prevalencia del Virus Epstein Barr en biopsias de pacientes con cáncer gástrico diagnosticados en el Instituto de Cancerología INCAN de enero a diciembre de 2017.

B. Objetivos específicos

- Detectar por hibridización *in situ* la expresión del micro ARN EBER del Virus Epstein Barr en biopsias de pacientes con diagnóstico de cáncer gástrico.
- Describir las características demográficas, histológicas y clínicas en los pacientes con cáncer gástrico asociado a infección por el Virus Epstein Barr.
- Identificar los posibles factores de riesgo asociados a la expresión del micro ARN EBER del Virus Epstein Barr en pacientes con cáncer gástrico.

V. HIPÓTESIS

No aplica por el tipo de estudio.

VI. METODOLOGÍA

A. Diseño de la Investigación

El presente estudio es de tipo cuantitativo, observacional analítico, prospectivo y transversal.

B. Definición de la Población

La población estuvo constituida por los pacientes con diagnóstico de cáncer gástrico, confirmado por patología en el INCAN (INCAN, 2010, Matta, De León, 2015). Comprendido de enero a diciembre de 2017.

C. Elementos de muestreo y unidad de análisis

La unidad de estudio fueron los pacientes con cáncer gástrico que acuden al INCAN, la unidad de análisis estuvo constituida por las biopsias embebidas en parafina de estos pacientes.

D. Tamaño y selección de muestra

En promedio, el INCAN atiende 180 pacientes con diagnóstico de cáncer gástrico al año. El cálculo de la muestra se realizó utilizando el programa Epidat, versión 3.1, con base en la media del número de pacientes diagnosticados anualmente en el INCAN (180 pacientes) y una frecuencia de Epstein Barr en cáncer gástrico de 10 % reportado en población similar en Costa Rica y un intervalo de confianza del 95 %, precisión de 5.43 %. De acuerdo a la siguiente fórmula:

$$n = [EDFF * Np (1-p)] / [(d^2/Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p * (1-p)].$$

De donde se obtuvo un valor de muestra de 71.

E. Criterios de Inclusión y exclusión

1. Criterios de inclusión:

- Diagnóstico confirmado de cáncer gástrico por patología

- Mayor de edad
 - Consentimiento de participar en el estudio
2. Criterios de exclusión:
- Paciente al que no se le puede realizar endoscopia.
 - Muestra de biopsia en parafina dañada.

F. Procedimientos

Se revisó el expediente del paciente para anotar los datos relacionados con el diagnóstico y clasificación patológica del cáncer gástrico. Se introdujeron los datos en Excel, para tabularlos y analizarlos.

Las biopsias gástricas embebidas en parafina obtenidas por endoscopia (como parte del seguimiento clínico de los pacientes) se montaron en láminas Superfrost plus® con carga positiva, en donde se realizó el proceso de hibridización *in situ*.

1. Hibridización *in situ*

Se siguieron las instrucciones del fabricante para procesar biopsias embebidas en parafina al utilizar el kit Epstein Barr Virus (EBER) con ácido peptidonucleico (PNA) BIO CARE® (Bio care, sf).

a. Fundamento del método

La hibridización *in situ* utilizando sondas de PNA conjugadas con fluoresceína, para la detección del transcrito EBER de EBV se aplica para la detección de infección latente por este virus, en muestras embebidas en parafina o fijadas en formalina. La sonda de ácido péptido nucleico ha sido marcada con el

hapteno de 5-carboxi-fluoresceína para su subsecuente visualización. Esta sonda es complementaria a dos regiones ARNs EBER codificadas por EBV.

La secuencia EBER ha sido asociada con numerosas neoplasias, las cuales incluyen el carcinoma nasofaríngeo, otros linfoepiteliomas, una variedad de desórdenes linfoproliferativos asociados a linfocitos B, linfoma no Burkitt y carcinoma gástrico entre otras. La sensibilidad en la población general es de 95-100% y la especificidad de 98% (Bruu et al., 2000; Dako, sf).

2. Procedimiento

- Con micrótopo se cortaron las biopsias y se colocaron sobre los portaobjetos con carga positiva.
- Se colocaron las muestras en el horno a 65 °C por 12 a 14 horas para derretir la parafina.
- Se hidrataron las muestras progresivamente por inmersión en soluciones de etanol 90 %, al 50 %.
- Se incubaron 5 minutos en la peroxidasa.
- Se lavaron dos veces con agua desmineralizada.
- Se sumergieron en solución de proteinasa K: buffer TBS (proporción 1:2) por 1 minuto.
- Se lavaron 2 veces con buffer fosfato salino.
- Se incubaron durante 15 minutos en solución recuperadora DIVA® a 90 °C.
- Se dejaron enfriar durante 20 minutos.
- Se lavaron 2 veces con buffer fosfato salino.
- Se limpió el exceso de agua alrededor del tejido con papel mayordomo.
- Se aplicó la cantidad necesaria de sonda RISH® que permitiera cubrir la muestra y se cubrieron con cubreobjetos.

- Se colocaron las láminas en el equipo de hibridización (IQ Kinetic Slide Stainer) a 55 °C por 1 hora.
- Se colocaron en buffer fosfato salino a temperatura ambiente y se agitaron para eliminar el cubreobjeto.
- Se incubaron en buffer fosfato salino por 5 minutos a 55°C y luego se trasladaron a buffer fosfato salino a temperatura ambiente durante 5 minutos para lavar las láminas.
- Para la detección de la sonda, se secaron las láminas alrededor del tejido con papel mayordomo y se aplicó el reactivo secundario, con el cual se incubaron las láminas durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se lavaron las láminas 2 veces con buffer fosfato salino.
- Se eliminó el exceso de buffer con papel mayordomo y se adicionó la cantidad suficiente de cromógeno que permitiera cubrir la muestra.
- Se incubaron durante 8 minutos a temperatura ambiente.
- Se lavaron las láminas con agua del grifo.
- Se lavaron con agua desmineralizada.
- Se tiñeron las láminas por 30 segundos con hematoxilina.
- Se sumergieron las láminas por 1 minuto en agua amoniacal.
- Se deshidrataron las muestras por pasajes sucesivos en soluciones crecientes de etanol del 70 % al 95 %, hasta sumergirlas en xilol
- Se montaron las muestras.

G. Interpretación de resultados:

La presencia del micro ARN EBER del Virus Epstein Barr se observó como zonas cafés en el núcleo de células neoplásicas.

Se procesó un control positivo (linfoma Hodgkin) en cada corrida.

H. Plan de análisis

Se determinó la prevalencia y frecuencias por medio de Excel para realizar el análisis descriptivo. Se realizó análisis univariado con cálculo de frecuencias y análisis de ji cuadrado a las variables cualitativas por medio del programa Epidat 3.1, intervalo de confianza de 95 %, con un nivel de significancia de 0.05.

Para establecer las razones de oportunidad, se realizó un análisis bivariado por medio de estimación de OR de prevalencia con sus respectivos intervalos de confianza, por medio del programa Epidat 3.1, con un nivel de significancia de 0.05.

I. Limitaciones del estudio

El estudio presentó limitación en la obtención de segmento de la biopsia con presencia de células cancerosas o degradación del micro ARN EBER por presencia de ARNasas durante la obtención o procesos iniciales de procesamiento.

J. Consideraciones éticas

Los datos obtenidos de las historias clínicas de los pacientes se trataron con confidencialidad. Puesto que el diagnóstico de EBER de EBV no modifica el tratamiento de los pacientes, el presente estudio no representa ningún daño para ellos.

VII. RESULTADOS

En el estudio se analizaron 71 biopsias gástricas para identificar la presencia del micro ARN EBER del Virus Epstein Barr por *hibridización in situ*, en pacientes con diagnóstico de cáncer gástrico que asistieron al INCAN. En 15 (21.13 %) (IC 95 % 10.93 % - 31.33 %), de ellas se identificó la presencia del micro ARN de este virus.

La población analizada estuvo conformada por 37 (52.11 %) hombres y 34 (47.89 %) mujeres, al analizar al grupo con presencia del micro ARN EBER de EBV es notorio el predominio del género masculino 11/15 (73.33%), con una mayor posibilidad de ocurrencia en este género, según OR 4.95 (IC 1.39-17.54) y significancia estadística $p < .05$. Lo cual contrasta con el predominio del género femenino 30/56 (53.57%) en los pacientes que presentaron cáncer gástrico y fueron negativos al micro ARN EBER de EBV (Tabla 1).

El rango etario estuvo comprendido entre 31 a 84 años. La frecuencia de pacientes con cáncer gástrico aumentó con la edad, de tal forma que, el 59% fueron pacientes mayores de 56 años. Similar patrón se observó en los pacientes con presencia de EBER de EBV, ya que fue identificado en 10 casos (66.67 %) de personas mayores de 56 años, pero sin diferencia con el grupo negativo ($p = .08$).

En relación al estado civil, de los 15 individuos con resultado positivo para EBER de EBV, 12 (80 %) refirieron estar casados o unidos, similar a la población con cáncer gástrico sin presencia de EBV, 43/56 (76.78 %), sin diferencia significativa entre grupos ($p = .93$).

De los pacientes evaluados, en el grupo con presencia de EBER de EBV, 3/15 (20.00 %) no tienen escolaridad y 7/15 (46.67 %) dicha escolaridad llega hasta la primaria, similar en quienes no se detectó la presencia de EBER de EBV ya que 17/56 (30.36 %) refirieron ninguna escolaridad y 29/56 (51.79 %) estudiaron hasta la primaria, sin diferencia significativa entre grupos ($p = .72$).

Al analizar la ocupación en los pacientes con diagnóstico de cáncer gástrico sin presencia de EBER de EBV, predominó el género femenino y la ocupación más frecuente fue ama de casa, 24/56 (42.8 %), seguida por los comerciantes 13/56 (23.2 %), cabe decir que 8/56 pacientes indicaron ser desempleados. En contraste en el grupo con diagnóstico de cáncer gástrico y presencia de EBER de EBV, predominan los hombres y ser comerciante 6/15 (40.0 %), seguida de la ocupación ama de casa 4/15 (26.7 %), lo que demuestra que la ocupación no presentó significancia estadística ($p=.30$).

Los pacientes con diagnóstico de cáncer gástrico con y sin la presencia de EBER de EBV, procedían en mayor número de la región metropolitana, que comprende el departamento de Guatemala y la región de oriente que incluye los departamentos de Jalapa, Jutiapa y Santa Rosa, Izabal, Chiquimula y Zacapa, sin diferencia significativa entre resultado positivo y negativo ($p=.25$).

TABLA 1. Frecuencia del micro ARN EBER del Virus Epstein Barr según variables sociodemográficas en pacientes con cáncer gástrico que asisten al INCAN. (N=71)

Variables sodiodemográficas	Presencia de EBER de EBV		Ausencia de EBER de EBV		P
	n	(%)	n	(%)	
Género					0.02
• Masculino	11	73.33	26	46.43	
• Femenino	4	26.66	30	53.57	
Edad (años)					0.08
• 31-35	1	6.67	2	3.57	
• 36-40	1	6.67	2	3.57	
• 41-45	1	6.67	2	3.57	
• 46-50	1	6.67	9	16.07	
• 51-55	1	6.67	6	10.71	
• 56-60	3	20.00	5	8.93	
• 61-65	2	13.33	26	46.43	
• > 65	5	33.33	4	7.14	
Estado civil					0.93
• Casado/Unido	12	80	43	76.78	
• Soltero/Viudo	3	20	13	23.22	
Escolaridad					0.72
• Ninguna	3	20.00	17	30.36	
• Primaria	7	46.66	29	51.79	
• Secundaria	2	13.33	3	5.36	
• Diversificado	2	13.33	5	8.93	
• Universitario	1	6.67	2	3.57	
Ocupación					0.30
• profesional	1	6.67	1	1.78	
• comerciante	6	40.00	13	23.21	
• empleado	2	13.33	3	5.36	
• ama de casa	4	26.67	24	42.86	
• otros*	2	13.33	15	26.79	
Lugar de procedencia					0.25
• metropolitana	5	33.33	15	26.79	
• oriente	4	26.67	14	25.00	
• occidente	2	13.33	13	23.21	
• central	2	13.33	12	21.42	
• norte	2	13.33	2	3.57	

Fuente: Datos obtenidos en el estudio

otros: incluye maestro, agricultor, albañil, desempleado

Al analizar los datos clínicos que manifestaron los pacientes, la diarrea OR 5.74 (IC 95 % 1.45-12.64), $p < .05$ y la infección por *Helicobacter pylori* diagnosticada por examen de laboratorio OR 7.19 (IC 95 % 1.07-18.87) $p < .05$ presentan asociación significativa con la presencia de EBER de EBV.

Todos los pacientes con presencia del ARN EBER de EBV manifestaron disminución en el peso y dolor en el epigastrio, en contraste con los pacientes con cáncer gástrico, pero sin presencia de EBER de EBV en quienes estos síntomas se manifestaron respectivamente en 44/56 (78.57 %) y 48/56 (85.71 %) sin diferencias entre ambos grupos para estas variables ($p > .05$).

La acidez (reflujo) fue referida por 13/15 (86.67 %) de los pacientes con presencia del ARN EBER de EBV, y en 43/56 (76.79 %) de los pacientes sin la presencia de EBV, sin diferencia entre los grupos ($p > .05$). La presencia de gases y vómitos fue referida por igual cantidad de pacientes con presencia de EBER de EBV 11/15 (73.30 %) para cada uno, así como por la mayoría de pacientes sin la presencia de este ARN de EBV 35/56 (62.5 %) y 32/56 (57.14 %) respectivamente, sin diferencia ($p > .05$) en ambos casos.

De los pacientes con diagnóstico de cáncer gástrico y presencia de EBV, 4 (26.7 %) tienen familiares con historial de cáncer gástrico. Mientras que, en los pacientes con diagnóstico de cáncer gástrico sin evidencia de infección por EBV, esta frecuencia fue de 6 (10.7 %), refiriendo que dichos familiares eran los progenitores en la mayoría de los casos, sin diferencia entre grupos.

En lo que respecta al diagnóstico de *H. pylori* por biopsia, solamente 50 de los 71 pacientes tuvieron el reporte del análisis de este microorganismo en su boleta de resultados. En los pacientes con presencia del ARN EBER de EBV se diagnostica co-infección con *H. pylori* en 4 (26.7 %), en contraste con los pacientes sin presencia del EBER de EBV, en quienes se informa la presencia de *H. pylori* en únicamente 5 de ellos (8.9 %).

De los pacientes con cáncer gástrico 7 (9.86 %) fuman, y 2 (13.3 %) en quienes se identificó EBV por hibridización *in situ*, sin diferencia entre grupos.

TABLA 2. Frecuencia del ARN EBER del Virus Epstein Barr según signos y síntomas de pacientes con cáncer gástrico que asisten al INCAN. (N=71)

Signos y síntomas	Presencia de EBER de EBV		Ausencia de EBER de EBV		OR (IC 95 %)
	n	(%)	n	(%)	
Disminución de peso					8.71 (0.49-15.59)
• Sí	15	100	44	78.57	
• No / No refiere			12	21.43	
Gases					1.65 (0.46-5.85)
• Sí	11	73.3	35	62.50	
• No / No refiere	4	26.7	21	37.50	
Vómitos					2.06 (0.58-7.28)
• Sí	11	73.3	32	57.14	
• No / No refiere	4	26.7	24	42.86	
Diarrea					5.74 (1.45-12.64)*
• Sí	12	80.0	23	41.07	
• No / No refiere	3	20.0	33	58.93	
Dolor de estómago					5.43 (0.29-99.62)
• Sí	15	100.0	48	85.71	
• No / No refiere			8	14.29	
Acidez estomacal					1.95 (0.39-9.85)
• Sí	13	86.67	43	76.79	
• No / No refiere	2	13.33	13	23.21	
Diagnóstico de laboratorio <i>H. pylori</i>					7.19 (1.07-18.87)*
• Sí	14	93.33	37	66.07	
• No / No refiere	1	6.67	19	33.93	
Diagnóstico por biopsia <i>H. pylori</i>					3.71 (0.85-16.09)
• Sí	4	26.67	5	8.93	
• No / No refiere	11	73.33	51	91.07	
Familiar con cáncer gástrico					3.03 (0.73-12.58)
• Sí	4	26.67	6	10.71	
• No / No refiere	11	73.33	50	89.29	
Tabaquismo					1.56 (0.27-9.02)
• Sí	2	13.33	5	8.93	
• No / No refiere	13	86.67	51	91.07	

Fuente: datos obtenidos en el estudio

* $p < .05$

Según la clasificación de Lauren, el cáncer gástrico se puede clasificar como difuso, intestinal o mixto. En los 15 pacientes que por hibridización *in situ* se identificó la presencia de los micro ARNs EBER de EBV, 10 (66.67 %) se clasificaron como cáncer difuso. En contraste, en los pacientes con cáncer gástrico sin presencia de EBV el tipo de cáncer que predominó fue el intestinal con 31 casos (55.36 %). Lo cual implica que existe asociación, pero no significativa OR 2.48 (IC 1.05-8.20) para que los pacientes con expresión del micro ARN EBER de EBV presenten cáncer gástrico de tipo difuso (tabla 3).

TABLA 3. Frecuencia del ARN EBER del Virus Epstein Barr según características histológicas de las lesiones neoplásicas en pacientes cáncer gástrico que asisten al INCAN. N=71

Tipo de cáncer gástrico	Presencia de EBER de EBV		Ausencia de EBER de EBV		OR (IC 95 %)
	n	(%)	n	(%)	
• Difuso	10	66.67	25	44.64	2.48 (1.05-8.20)
• Intestinal	5	33.33	31	55.36	

Fuente: datos obtenidos en el estudio

$p > .05$

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cáncer gástrico es la cuarta causa más común de cáncer y la tercera causa de mortalidad asociada al cáncer, contribuyendo con el 6.8 % del total de casos de cáncer y el 8.8 % de muertes asociadas a cáncer alrededor del mundo. *Helicobacter pylori* es el principal agente carcinogénico asociado a la etiología de esta neoplasia, sin embargo, estudios han demostrado que al existir co-infección con EBV el riesgo se incrementa (OMS, 2018).

En este estudio, se estimó una prevalencia de 21.13 % (IC 95 % 10.93 % - 31.33 %), del Virus Epstein Barr en biopsias de pacientes con cáncer gástrico diagnosticados en el Instituto de Cancerología INCAN, mediante la detección por hibridización *in situ* del micro ARN EBER expresado por este virus, la cual es mayor a la reportada en otros países. A nivel mundial se asocia la infección del EBV en 1.7-20.7 % pacientes con cáncer gástrico, la menor frecuencia reportada es en Reino Unido mientras que la más alta en Taiwan, en donde hay también una alta incidencia de linfopitelioma nasofaríngeo asociado a EBV. A nivel latinoamericano, en Brasil reportan prevalencias de 11.2 %, Colombia, 13 %, Chile 16.8 %. Lo cual indica que Guatemala presenta una prevalencia más alta en relación con los estudios alrededor del mundo (Herrera, et al., 2005; Shyam & Hem, 2016).

De forma similar, existen otras neoplasias asociadas a EBV como el linfoma T/NK nasal fenotipo T citotóxico, así como otros desórdenes proliferativos asociados a células T/NK, el linfoma extranodal de cabeza y cuello, los cuales son altamente dependientes de la localización geográfica, con mayor incidencia en Asia y países latinoamericanos como México, Guatemala y Perú. En los que las poblaciones amerindias parecen tener una relación genética con las poblaciones asiáticas, que pueden haber migrado a través de la vía Aleutiana. Por lo que, analizar características genotípicas de la población y filogenéticas del EBV, pueden contribuir a identificar la relación geográfica que existe entre la mayor prevalencia

de las neoplasias asociadas a EBV en estas regiones (Rijn, et al, 1997; Vilcahuamán, Moisés, Sánchez y Carbajal, 2009; Park & Ko, 2014).

Varios estudios reportan la mayor presencia del EBV en pacientes con cáncer gástrico del género masculino, así Nishikawa y col (2013) señalan que la incidencia de este virus en pacientes con cáncer gástrico varía de 11 % en hombres a 6% en mujeres. En Portugal la relación hombre: mujer es de 8:1, con significancia estadística ($p=.037$) muy diferente a la reportada en México, que es de 1.2:1. En este estudio, el 73.33 % de hombres presentó resultado positivo para la expresión de EBER del EBV, con una relación hombre: mujer de 2.75:1 lo cual señala un predominio en el género masculino, similar a la reportada en el resto del mundo (Nogueira, et al., 2017).

Además, se ha evaluado la hipótesis que la exposición continua al efecto de estrógenos ya sea de origen ovárico o exógeno pueden disminuir el riesgo de cáncer gástrico, por lo que se ha propuesto que las hormonas sexuales femeninas tienen un papel protector para esta neoplasia, lo cual se refleja en que en la mayoría de poblaciones ya sea con alta o baja incidencia de CG, la incidencia promedio en hombres es aproximadamente el doble que en mujeres, situación similar a lo que ocurre en el cáncer gástrico asociado a la expresión del micro ARN EBER de EBV, pero sin estudios concluyentes al respecto (Constanza, et al. 2012).

Se ha identificado mayor riesgo de expresar EBV asociado a CG en pacientes mayores de 50 años, con mayor prevalencia en el grupo de 50-68 años. En este estudio el cáncer gástrico en general, y con expresión de EBER de EBV en particular fue más prevalente en hombres mayores de 55 años. Similar a lo reportado por varios estudios en los que el cáncer gástrico predomina en población masculina mayor de 50 años, asociando este predominio no sólo a predisposición genética, sino a exposición a agentes oxidantes que en el caso de EBV pueden reactivar la

infección con expresión de EBER, así como el daño celular (Herrera, et al., 2005; Andrade, et al., 2016).

Referente al estado civil, se identificó que la mayoría de la población con cáncer gástrico refirió estar casados o unidos, sin embargo, este factor no representa diferencia significativa entre los individuos, independiente de la presencia de EBV. En contraste, en China identificaron que estar casados mejoraba el pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico, identificándolo como factor protector, aunque se han evaluado múltiples variables ninguna ha mostrado significancia estadística a excepción de la aceptación a realizarse cirugías por parte de los pacientes casados o unidos (Jie-Jie, et al., 2016).

Con referencia a la escolaridad y la ocupación de los pacientes, no se identificó una asociación con significancia estadística entre el nivel de escolaridad y la ocupación de los pacientes. Sin embargo, es importante resaltar que en la mayoría de la población analizada su escolaridad era nula (20.0 %) o llegaba hasta la primaria (46.67 %), sin diferencia significativa entre grupos ($p=.72$), lo cual puede estar relacionado con el ingreso socioeconómico y por tanto con el riesgo de desarrollo de esta neoplasia. Se ha demostrado que el cáncer gástrico es más prevalente en los países con menor desarrollo económico, menor nivel educativo y actividad ocupacional con menores ingresos económicos, lo cual supone una mayor exposición a agentes patógenos y almacenaje de alimentos sin refrigeración. Inclusive en un estudio de casos y controles en Holanda, determinaron asociación entre la presencia de cáncer gástrico e ingresos económicos bajos, baja escolaridad y ocupación laboral técnica o que incluye trabajo físico fuerte como agricultores, albañiles entre otros (Loon, Goldbohm & Brandt, 1997; Martel, Forman, 2013; Power, Hypponen & Smith, 2005).

El lugar de procedencia de los pacientes es principalmente la región metropolitana con 33.33 % de los casos de cáncer gástrico y presencia de micro ARN EBER de EBV, seguido de la región oriente (26.67 %) sin diferencia significativa ($p=.25$). En el 2011 la residencia del 35.6 % de los nuevos pacientes atendidos en el INCAN provenían del departamento de Guatemala (región metropolitana), lo cual concuerda con los datos de este estudio, lo cual se relaciona con la ubicación de este centro de atención que favorece la movilidad de los habitantes del área metropolitana. Sin embargo, es necesario realizar estudios que incluyan de manera homogénea a pacientes de todo el país a fin de poder llegar a una conclusión sobre la región geográfica y la prevalencia de este virus (Waldheim, Villeda, 2011).

Al evaluar los signos y síntomas clínicos se identificó que, el diagnóstico previo por laboratorio de *H. pylori* representa una razón de oportunidades de 7.19 a desarrollar cáncer gástrico y presencia de EBER de EBV. En Taiwan, identificaron de manera similar la coinfección con EBV y *H. pylori*, identificando que la multiplicidad de agentes oncogénicos ocasiona distintos patrones clinicopatológicos y genéticos. Al investigar la relación entre *H. pylori* y EBV en enfermedad gastrointestinal, Sanket y col (2011), sugieren que *H. pylori* modula la conversión de EBV de su estadio latente al lítico y con ello favorecer el desarrollo de cáncer gástrico (Ming, et al., 2000).

Por otro lado, el 80 % de los pacientes con expresión del micro ARN EBER de EBV refirieron la presencia de diarrea, con asociación de ambos factores $OR=5.74$ (IC 1.45 – 12.64). Sin embargo, la presencia de diarrea junto con otros síntomas como embotamiento, eructos, reflujo y estreñimiento son referidos como inespecíficos para los pacientes con cáncer gástrico en general y se asocia a enfermedad inflamatoria intestinal (Paraskevas & Dimitroulopoulos, 2005).

Todos los pacientes con cáncer gástrico y presencia de EBER de EBV refirieron disminución de peso y gastralgia sin asociación significativa al compararlos con los pacientes con cáncer gástrico, pero sin presencia de EBV.

Estos signos y síntomas se pueden deber al proceso fisiopatológico de esta neoplasia más que al agente etiológico involucrado. De igual manera, la presencia de gases, vómitos, diarrea y acidez estomacal no demostraron asociación entre grupos. Akiba y colaboradores (2008) refieren que la fisiopatogenia del cáncer gástrico y patologías básicas desarrolla en los pacientes cuadros clínicos inespecíficos.

Al analizar los factores de riesgo, el 26.7 % de los pacientes con cáncer gástrico y expresión de EBER de EBV refirieron que alguno de los progenitores había padecido de cáncer gástrico, frecuencia mayor a la reportada por otros autores quienes determinaron que 8% de casos de cáncer de estómago se relacionan con componentes familiares. Martel y Forman (2013), indican que arriba del 3 % de cáncer de estómago son resultado de predisposición genética con mayor efecto en el cáncer del tipo difuso, lo cual reviste de importancia en cuanto que la infección activa de EBV se asocia al desarrollo de cáncer gástrico de tipo difuso. Indicando una predisposición genética o infección domiciliar con los agentes oncogénicos (Sampieri, Mora, 2014).

Se ha identificado que la presencia de EBER de EBV es más prevalente en pacientes fumadores regulares. Fumar es una causa de cáncer gástrico, pero actúa como un factor de riesgo moderado ocasionando un riesgo estimado de 1.62 (1.50-1.75) en hombres fumadores y 1.20 (1.01-1.43) en mujeres fumadoras. Por otro lado, se ha demostrado que el riesgo a desarrollar cáncer gástrico aumenta con el número de cigarrillos que se consumen al día y los años en que se ha fumado, sin embargo, el riesgo de esta neoplasia es menor en fumadores cotidianos que en aquellos que consumen cigarrillos ocasionalmente. En este estudio únicamente 13.3 % de los pacientes con identificación de EBV en las células neoplásicas de la biopsia gástrica refirieron que fuman, aunque no se registró la frecuencia ni el número de cigarrillos que consumen al día, por lo que sería necesario evaluar con más detalle este factor antes de emitir una conclusión (Koshiol, et al., 2007; Sampieri, Mora, 2014; Martel, Forman, 2013).

Según la clasificación de Lauren el cáncer gástrico se clasifica en los tipos intestinal y difuso. De los 15 pacientes que, por hibridización *in situ* se identificó la presencia de los micro ARNs EBER de EBV, 10 (66.67 %) se clasificaron como cáncer difuso, con una razón de oportunidad de 2.48 (IC 95 % 1.05-8.20), esto es, que los pacientes que expresan EBER de EBV tienen más del doble de oportunidad de desarrollar cáncer gástrico de tipo difuso. En el tipo difuso, no hay cohesión entre células neoplásicas, sin formación de una masa gástrica. Por el contrario, en el cáncer gástrico de tipo intestinal presenta células neoplásicas cohesivas que forman estructuras glandulares similares a túbulos y se diagnostica normalmente en personas ancianas y su desarrollo depende de factores ambientales. En contraste, el tipo difuso usualmente ocurre en personas más jóvenes y se asocia con factores individuales. Se ha identificado la asociación entre la infección por *H. pylori* y el cáncer gástrico de tipo intestinal, mientras que el tipo difuso está asociado con la infección por el virus Epstein Barr. (Sampieri, Mora, 2014).

Si bien, *H. pylori* se mantiene fuera de las células gástricas y juega un papel importante en los primeros estadios de carcinogénesis en varios CG. EBV, se internaliza en las células de la mucosa y aunque, EBV no está integrado dentro del ADN del hospedero, se mantiene así mismo en forma circular en el núcleo de células infectadas (episomas) sin que produzcan estas células partículas virales, durante el período de latencia. EBV se replica simultáneamente a la división celular, posteriormente daña la membrana celular y se disemina a células vecinas (Fukayama & Ushiku, 2011).

IX. CONCLUSIONES

1. La prevalencia del Virus Epstein Barr en biopsias de pacientes con cáncer gástrico diagnosticadas en el Instituto de Cancerología INCAN fue de 21.13 % (IC 95 % 10.93 %-31.33 %), mayor de la reportada en otros estudios en Latinoamérica.
2. Se detectó por hibridización *in situ* la expresión del micro ARN EBER del Virus Epstein Barr en las células neoplásicas de 15 de los 71 pacientes con diagnóstico de cáncer gástrico, lo cual indica el papel de este virus como agente causal de esta neoplasia.
3. En los pacientes con expresión del EBER del EBV la única variable demográfica que representa asociación significativa es ser del género masculino OR=4.95 (IC 1.39-17.54).
4. Los factores asociados fueron la presencia de diarrea OR 5.74 (IC 1.45-12.64), $p < .05$ y la infección por *Helicobacter pylori* diagnosticada por examen de laboratorio, OR 7.19 (1.07-18.87) $p < .05$ para la expresión de EBER de EBV en pacientes con cáncer gástrico con significancia estadística.
5. Los pacientes que expresan el micro ARN EBER de EBV tienen mayor oportunidad de desarrollar cáncer gástrico del tipo difuso, OR= 2.48 (1.05-8.20).
6. La disminución de peso, gases, dolor de estómago, acidez, historia familiar con cáncer gástrico y el tabaquismo no están asociados con la expresión del micro ARN EBER de EBV.

X. RECOMENDACIONES

1. Evaluar a nivel nacional la prevalencia en la expresión del micro ARN EBER de EBV en biopsias de pacientes con cáncer gástrico y asociar variables étnicas y ambientales en la población.
2. Evaluar la presencia de EBER de EBV en los familiares de pacientes con cáncer gástrico con expresión de EBER de EBV para identificar el riesgo de padecer esta neoplasia y encontrar posibles asociaciones.
3. Analizar el pronóstico y sobrevivencia de los pacientes con cáncer gástrico que expresan EBER de EBV para sugerir nuevas medidas de control y prevención.

XI. REFERENCIAS

- Akiba, S., Koriyama, C., Herrera, R. & Eizuru Y (2008). Epstein Barr virus associated gastric carcinoma: Epidemiological and clinicopathological features. *Cancer Science*. 99(2), 195-201.
- Allen, M., Young, L. & Dawson, C. (2005). The Epstein-Barr virus-encoden LMP2A and LMP2b proteins promote epithelial cell spreading and motility. *Journal of Virology* 79(3), 1789-1802.
- American Cancer Society (2016). Cancer Facts and Figures. Atlanta, Ga: American Cancer Society. Recuperado de: [http://www.cancer.gov/espanol/tipos/estomago/pro/tratamiento-estomago-pdq#section/ 53](http://www.cancer.gov/espanol/tipos/estomago/pro/tratamiento-estomago-pdq#section/53)
- Andrade, A., Melo, E., Kazzi, A., Freitas, G., Cavaleiro, D., Mara, M. et al, (2016). Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: a distinct molecular subtype of the disease? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 49(2), 150-157.
- Bravo, D., Muñoz, B., Costa, E., Clari, M., Torno, N. & Navarro, D. (2009). Evaluation of an Immunofiltration Assay that detects immunoglobulin M antibodies against the ZEBRA protein for the diagnosis of Epstein-Barr Virus infectious mononucleosis in immunocompetent patients. *Clinical Vaccine Immunology*. 16(6),885-888.
- Bruu, A., Hjetland, R., Holter, E., Mortensen, L., Natas, O., Petterson, W. et al (2000). Evaluation of 12 commercial tests for detection or Epstein-Barr Virus-specific and heterophile antibodies. *Clinical Laboratory Immunology*. 7(3);451-456.
- Burke, A. P., Yen, T. S., Shekitka, K. M., & Sobin, L. H. (1990). Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase

chain reaction. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 3(3), 377–380.

Butel, J. (2000). Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis*, 21(3), 405-426.

Camargo, M. C., Murphy, G., Koriyama, C., Pfeiffer, R. M., Kim, W. H., Herrera-Goepfert, R. et al (2011). Determinants of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis. *British Journal of Cancer*, 105(1), 38–43. doi10.1038/bjc.2011.215

Centers of Diseases Control –CDC- (2006). *Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis*. Atlanta, Ga: Centers for Disease Control and Prevention. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/ebv.htm>

Chêne, A., Donati, D., Guerreiro-Cacais, A. et al (2007). A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. *PloS Pathology*, 3(6), e80.

Cohen, J. (2000). Epstein-Barr Virus Infection. *The New England Journal of Medicine*. 343(7), 481-492.

Constanza M., Goto, Y., Zabaleta, J., Morgan, D., Correa, P. & Rabkin, C. (2012). Sex Hormones, Hormonal Interventions and Gastric Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers Preview*. 21(1); 20-38.

Coussens, L. & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917), 860-867.

Dako (sf). Epstein-Barr Virus (EBER) PNA Probe/Fluorescein. Inseto del kit de reactivos.

Damania, B. (2004). Oncogenic γ -Herpesvirus: Comparison of viral Proteins Involved in Tumorigenesis. *Nature Reviews*. 2(465):656-668.

- Da Silva, R., García, E. & González, E. (2010). Infección Crónica Activa por Virus Epstein Barr. *Revista Médico Científica*. 22(1), 18-25.
- De la Riva, S., Muñoz, M. & Sola, J. (2004). Gastric carcinogenesis. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 96(4), 265-276.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S. Mahers, C., Rebelo, M., et al, (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11.
- Fuentes, E., Camorlinga, M. & Maldonado, B. (2009). Infección, inflamación y cáncer gástrico. *Salud pública de México* 51(5): 427-433.
- Fukayama, M. & Ushiku, T. (2011). Epstein Barr virus asociado a carcinoma gástrico. *Pathology Research and Practice* 207 (529-537).
- Fukuda, M., Ikuta, K., Yanagihara, K., Tajima, M., Kuratsune, H., Kurata, T. % Sairenji, T. (2001). Effect of transforming growth factor-beta 1 on the cell growth and Epstein-Barr virus reactivation in EBV-infected epithelial cell lines. *Virology*, 288(1),109-118.
- Herrera, R., Akiba, S., Koriyana, Ch., Ding, S., Reyes, E. Itoh T. et al, 2005. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: Evidence of age-dependence among Mexican population. *World Journal of Gastroenterology*. 11(39), 6096-6103.
- Hjalgrim, H., Friborg, J., & Melbye, M. (2007). *The epidemiology of EBV and its association with malignant disease*. En: Human Herpesviruses: Biology Therapy and Immunoprophylaxis. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E et al., editors. Cambridge; Cambridge University Press, 929-959.
- Hino, R., Uozaki, H., Inoue, T., Shintani, Y., Sakatani, T., Takada, K. et al (2008). Survival advantage of EBV-associated gastric carcinoma: survivin up-regulation by viral latent membrane protein 2A. *Cancer Research*, 68(5), 1427-1435.

Hsu, Y., Lu, H., Huang, C., Hsu, R. & Su C. (2006). Malignant lymphoepithelial lesions of the salivary gland. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 134(4), 661-666.

International Agency for Research of Cancer –IARC- (1997). *Epstein Barr Virus*.
Obtenido de: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100B/mono100B-6.pdf>

INCAN (2010) *Registro Hospitalario*. Guatemala

Jie-Jie, J., Wei, W., Fa-Xiang, D., Zi-Wen, L., Hong, C., Xiao-Wen, L., et al (2016). Marital status and survival in patients with gastric cancer. *Cancer Medicine*. 5(8), 1821-1829.

Koriyama, C., Akiba, S., Minakami, Y., & Eizuru, Y. (2005). Environmental factors related to Epstein-Barr virus-associated gastric cancer in Japan. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 24(4), 547–553.

Koshiol, J., Qiao, Y. L., Mark, S. D., Dawsey, S. M., Abnet, C. C., Kamangar, F., et al (2007). Epstein-Barr virus serology and gastric cancer incidence and survival. *British Journal of Cancer*, 97(11), 1567–1569.

Kulwichit, W., Edwards, R., Davenport, E., Baskar, J., Godfrey, V. & Raab-Traub, N. (1998). Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 Induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Science*. 95(20), 11963-11968.

Laichalk, L., & Thorley, D. (2005). Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus *in vivo*. *Journal of Virology*, 79(2), 1296-1307.

Li, Q. & Verma, I. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature Review Immunology*. 2 (10), 725-234.

- Lo, S., Ho, W. & Wei, W. (2004). Outcome of patients with positive Epstein-Barr virus serologic status in the absence of nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong. *Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 130(6), 770-772.
- Lo, Y., Chan, W., Ng, E., Chan, L., Lai, P., Tam, J. et al (2001). Circulating Epstein-Barr virus DNA in the serum of patients with gastric carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 7(7), 1856-1859.
- Loon, A., Goldbohm, A. & Brandt, P. (1998). Socioeconomic status and stomach cancer incidence in men: results from the Netherlands Cohort Study. *Journal of Epidemiology of Community Health*. 52: 166-171.
- Luo, B., Wang, Y., Wang, X., Liang, H., Yan, L., Huang, B. et al (2005). Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinomas. *World Journal of Gastroenterology*, 11(5), 629-633.
- Martel, C. & Forman, D. (2013). Gastric Cancer. Epidemiology and Risk Factors. *Gastroenterology Clinics of North America*. 42(2), 219-240.
- Matta, V. & De León, J. (2015). Caracterización del cáncer gástrico en Guatemala. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*. 25(2), 9-20.
- Ming, W., Chia, S., Chung, W., Tsuey, H. Ming, C, Hsiu, W. et al (2000). Epstein Barr Virus- Associated Gastric Carcinomas: Relation to *H. pylori* Infection and Genetic Alterations. *Gastroenterology*, 118(6), 1031-1038.
- McLean, M. & El-Omar, E. (2014). Genetics of gastric cancer. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 11(11), 664-674.
- Moss, D., Burrows, S., Khanna, R., Misko, I. & Sculley, T. (1992). Immune surveillance against Epstein-Barr virus. *Seminars Immunology*, 4(2), 97-104.
- Neparidze, N. & Lacy, J. (2014). Malignancies Associated With Epstein Barr Virus: Pathobiology, Clinical Features, and Evolving Treatments. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*. 12(6) 358-372.

- Nishikawa, J., Yoshiyama, H., Iizasa, H., Kanehiro, Y., Nakamura, M., Nishimura, J., et al (2014). Epstein-Barr Virus in Gastric Carcinoma. *Cancers*. 6(4). 2259-2274.
- Nogueira, C., Mota, M., Gradiz, R., Cipriano, M., Caramelo F., Cruz, H. et al (2017). Prevalence and characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas in Portugal. *Infectious Agents and Cancer*. 12,41, 1-8. Obtenido de: [http// doi: 10.1186/s13027-017-0151-8](http://doi:10.1186/s13027-017-0151-8)
- Organización Mundial de la Salud (2018) obtenido de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Paraskevas, E. & Dimitroulopoulos, D. (2005). Epstein-Barr virus Infection and Gastrointestinal Diseases. *Annals of Gastroenterology*. 18(4), 386-390.
- Park, S. & Ko, Y. (2014). Epstein-Barr virus-associated T/natural killer-cell lymphoproliferative disorders. *Journal of Dermatology*. 41: 29-39.
- Power, C., Hypponen, E. & Smith, G. (2005). Socioeconomic position in childhood and early adult life and risk of mortality. *American Journal of Public Health*. 95(2), 1396-1402.
- Qu, Y., Dang, S. & Hou, P. (2013). Gene methylation in gastric cancer. *Clinica Chimica Acta*. 424, 53-65.
- Rijn, M., Bhargava, V., Molina-Kirsch, H., Carlos, R., Warnke, R. Cleary, M. et al (1997). Extranodal Head and Neck Lymphoma in Guatemala: High Frequency of Epstein Barr Virus-Associated Sinonasal Lymphomas. *Human Pathology*. 28(7), 834-839.
- Sampieri, C. & Mora, M (2014). Gastric cancer research in Mexico: A public health priority. *World Journal of Gastroenterology*. 20(16). 4491-4502.
- Sanket, K., Prasad, K., Tripathi, A., Singh, A., Saxena, A., Chand, U., et al (2011). Epstein-Barr virus DNA load and its association with *Helicobacter pylori* infection

- in gastroduodenal diseases. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 15(6). 583-590.
- Shao Y, Poirier, H., Ohshima, C., Malaveille, Y., Zeng, G., de Thé, H., et al (1988). Epstein-Barr virus activation in Raji cells by extracts of preserved food from high risk areas for nasopharyngeal carcinoma. *Carcinogenesis*, 9(8), 1455-1457.
- Shottenfeld, D. & Beebe-Dimmer, J. (2006). Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *Cancer Journal Clinical*. 56(2), 69-83.
- Shyam, S. & Hem, C. (2017). Status of Epstein-Barr Virus Coinfection with *Helicobacter pylori* in Gastric Cancer. *Journal of Oncology*. Obtenido de <https://doi.org/10.1155/2017/3456264>
- Szkaradkiewicz, A., Karpiński, T., Majewski, Malinowska, Goslinska-Kuzniarek, O., & Linke, K. (2015). The Participation of p53 and bcl-2 Proteins in Gastric Carcinomas Associated with *Helicobacter pylori* and/or Epstein-Barr Virus (EBV). *Polish Journal of Microbiology*. 64(3), 211-216.
- Stewart, B. & Kleihues, P. (Eds.). (2003). *World cancer report* (Vol. 57). Lyon: IARC press.
- Sugiura, M., Imai, S., Tokunaga, M., Koizumi, S., Uchizawa, M., Okamoto, K., et al (1996). Transcriptional analysis of Epstein-Barr virus gene expression in EBV-positive gastric carcinoma: unique viral latency in the tumor cells. *British Journal of Cancer*, 74(4), 625-631.
- Thompson, M. & Kurzrock, R. (2004). Epstein-Barr virus and cancer. *Clinica Cancer* 10(3), 803-821.
- Vilcahuamán, V., Moises, C., Sánchez, G. y Carbajal, D. (2009). Linfoma T/NK nasal fenotipo T citotóxico. *Folia Dermatológica de Perú*. 20(3), 141-147.

Waldheim, C. & Villeda, M. (2014). Registro Hospitalario del Instituto de Cancerología y Hospital "Dr. Bernardo del Valle S." *Revista Médica Colegio de Médicos y Cirujanos de Guatemala*. 151,8-14.

World Health Organization –WHO-. World Cancer Day: Global action to avert 8 million cáncer-related deaths by 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2005/pr06/ev/index.html>.

Woodman, C., Collins, S., Vavrusova, N., Rao, A., Middeldorp, J., Kolar, X., et al (2005). Role of sexual behavior in the acquisition of asymptomatic Epstein-Barr virus infection: a longitudinal study. *Pediatric Infectious Diseases J*, 24(6), 498-502.

Yap, Y., Hassan, S., Chan, M., Choo, P., & Ravichandran, M. (2007). Epstein-Barr virus DNA detection in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngology Head Neck Surgery*, 136(6), 986-991.

Young, L. & Rickinson, A. (2004). Epstein-Barr Virus. 40 years on. *Nature Reviews Cancer*. 4(10), 757-769.

Young, L. (2008) *Epstein Barr Virus: General Features*. Encyclopedia of Virology. Mahy BWJ, van Regenmortel MHV, editor. Oxford: Academic Press, 148-157.

XII. ANEXOS

CÓDIGO: _____



FICHA EPIDEMIOLÓGICA

Identificación del Virus Epstein Barr por Hibridación *in situ* en pacientes con Cáncer Gástrico

Fecha de entrevista ____/____/____ Código: _____

Estamos investigando si el Virus Epstein Barr está causando Cáncer Gástrico en Guatemala. Por ello me gustaría hacerle algunas preguntas sobre usted y su estado de salud. Sus respuestas serán utilizadas únicamente para esta investigación y serán mantenidas confidencialmente. Esta entrevista tomará alrededor de 20 minutos. ¿Puedo realizarle esta entrevista ahora? En caso de no ser posible entrevistarle en este momento, ¿Cuándo le puedo entrevistar?

I. DATOS GENERALES

1. Nombre: _____
2. Edad: _____ años
3. Género: M F
4. Domicilio: _____
5. Originario de: _____
6. Teléfono casa: _____ Celular: _____
7. Estado Civil: Soltero Casado Viudo Unido Separado
8. Profesión: _____
9. Escolaridad (último grado cursado)

Ninguna	<input type="checkbox"/>
Primaria	<input type="checkbox"/>
Secundaria	<input type="checkbox"/>
Diversificado	<input type="checkbox"/>

Universitario

10. Ocupación

Profesional

Comerciante

Empleado

Ama de Casa

Estudiante

Desempleado

Otro Especifique: _____

II. DATOS CLÍNICOS

11. Ha presentado usted alguno de los siguientes síntomas:

Vómitos	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
Diarrea	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
Gases	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
Eructos	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
Reflujo	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
Acidez	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
Estreñimiento	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
Pérdida de peso	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
Cuanto libras por mes _____				
Sensación de llenura	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
Cansancio exagerado	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
Palidez	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
Dolor en el epigastrio referido a la espalda	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
Ganglios en el cuello	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>

III. FACTORES DE RIESGO

12. Ha sido usted diagnosticado con infección por:

<i>Helicobacter pylori</i>	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
Epstein Barr	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>

13. Algún familiar cercano a usted ha sido diagnosticado con infección por *Helicobacter pylori*?

SI NO Quién? _____

14. Algún familiar cercano a usted ha sido diagnosticado con infección por Epstein Barr/
mononucleosis infecciosa?

SI NO Quién? _____

15. Algún familiar cercano a usted ha sido diagnosticado con cáncer gástrico?

SI NO Quién? _____

16. Usted fuma? SI NO Si su respuesta es NO pase a la pregunta 25.

17. Cuántos cigarros fuma al día?

1 – 5 6-10 11- 15 + de 16

18. Desde hace cuántos años usted fuma? 0-5 6 – 10 + de 10

19. Usted ha tenido alguna de estas enfermedades diagnosticada por médico?

Gastritis úlcera péptica

Pólipos

**Muchas gracias por su tiempo. Sus respuestas servirán para conocer mejor la causa del
cáncer gástrico en Guatemala.**

Entrevistador: _____

Entrevistado: _____

IV. HISTORIA CLÍNICA

20. Tipo de neoplasia: Intestinal difusa

21. Estadio de la neoplasia: 0 1 2 3 4

12.1. RECURSOS

12.1.1. HUMANOS

Asesora:

- PhD. Vivian Matta de García

Investigadora:

- Karla Lange Cruz

Colaboradores:

Patólogo INCAN

- Dr. Mauricio Siliézar

12.1.2. Institucionales:

- Departamento de Patología, INCAN
- Departamento de Citohistología, USAC

Karla Josefina Lange Cruz

AUTOR

PhD. Vivian Lucrecia Matta Ríos de García

ASESORA

MSc. Tamara Ileana Velásquez Porta

DIRECTORA

MA. Pablo Ernesto Oliva Soto

DECANO