

Universidad de Costa Rica

Escuela de Biología

**Presencia del Virus de Epstein-Barr y su relación con las características clínico-patológicas y otros factores de riesgo en una población con cáncer gástrico del Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia, en Costa Rica.**

Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en  
Genética Humana

Marianella Quesada Mora

993164

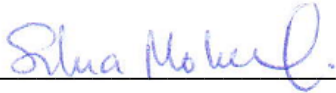
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Costa Rica

2015

## V°B° Tribunal de Trabajos Finales

Directora: Dra. Vanessa Ramírez Mayorga \_\_\_\_\_

Lectora: Dra. Silvia Molina Castro \_\_\_\_\_ 

Lectora: Dra. Yolanda Roa Martínez \_\_\_\_\_

Miembro del Tribunal: Dr. Warner Alpizar Alpizar \_\_\_\_\_

Presidente del Tribunal: Dr. James Karkashian Córdoba \_\_\_\_\_

## **Dedicatoria**

A mi hija Mariangel... Llegaste en el mejor momento de mi vida, para darme la fuerza, el ánimo y la tenacidad para finalizar esta meta...propuesta hace muchos años.

A Rigo...una ayuda incondicional, un apoyo incomparable, un hombro extra. Un corazón incansable.

A má...mi ejemplo, esto es un logro de nosotras dos, una meta de años de tomar decisiones, de ir formando mi futuro juntas. Mil gracias...

## Agradecimientos

A mi familia, mi esposo, mi hija, mi madre y mis hermanos por el apoyo y atención en esta etapa de mi vida... De corazón, se les ama.

A Vane, por brindarme su ayuda, no sólo como tutora de tesis, sino como profesional y amiga... Por el gran esfuerzo realizado para poder finalizar este proyecto y compartir conmigo todo su conocimiento en el tema. Por contagiarme el gusto por esto y enseñarme a amar lo que hacía. Un gracias eterno...

A mis dos lectoras: Dra. Roa y Dra. Molina, por aceptar ser parte de esta meta, por brindarme su tiempo, atención, conocimiento, por sus críticas para terminar de darle forma a este sueño.

A mi tercera lectora de tesis: Wendy Malespín, una gran profesional y sin duda amiga. Por esos consejos que me ayudaron en todo el proceso, por su tiempo dedicado sin solicitar nada a cambio... Un gracias sincero Wen...

A Victor Castillo, un brazo extra en el laboratorio... Gracias.

Al Programa de Epidemiología del Cáncer por toda la ayuda, tiempo brindado y críticas constructivas para con este trabajo, se les agradece infinitamente...

Al Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), a todo su personal, a los compañeros de laboratorio. Gracias por abrirme sus puertas para realizar este proyecto.

A Gustavo Gutiérrez, por el apoyo en los años que fui estudiante de la Escuela de Biología, por empujarme a terminar mi sueño y no dejarlo estancado como suele suceder en mi caso y por la ayuda con los últimos contratiempos...

A la Universidad de Costa Rica, mi *alma máter*, por albergarme estos años de mi vida y darme el conocimiento necesario para poder realizar mis sueños. Orgullosa de pertenecer a esta gran institución

## Índice general

### a. Parte introductoria

Portada .....	i
Hoja de aprobación .....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos .....	iv
Índice general.....	v
Lista de Figuras.....	vii
Lista de cuadros .....	viii
Lista de abreviaturas .....	ix
Resumen.....	x

### b. Cuerpo del trabajo

<b>I. Antecedentes .....</b>	<b>11</b>
A. Características del Virus Epstein-Barr.....	11
B. Infección con el Virus Epstein-Barr.....	13
C. Patologías asociadas al Virus de Epstein Barr .....	19
D. Cáncer gástrico.....	21
E. Clasificación del adenocarcinoma gástrico .....	23
F. Asociación del Cáncer Gástrico con el Virus de Epstein Barr .....	29
G. Factores involucrados en el desarrollo del Cáncer Gástrico positivo por el Virus de Epstein Barr .....	34

H. Co-infección entre el Virus de Epstein Barr y <i>Helicobacter pylori</i> en el desarrollo del cáncer gástrico .....	35
<b>II. Justificación</b> .....	38
i Problema .....	38
<b>III. Hipótesis</b> .....	38
<b>IV. Objetivos</b> .....	39
<b>V. Metodología</b> .....	40
A. Tipo de estudio.....	40
B. Población de estudio .....	40
i. Criterios de inclusión y exclusión.....	40
C. Muestra de estudio .....	41
D. Variables de estudio .....	41
E. Recolección de datos .....	41
i. Medidas biológicas .....	41
ii. Diagnóstico histológico .....	41
iii. Análisis de laboratorio.....	42
F. Análisis de datos .....	45
i. Confidencialidad de datos.....	46
<b>VI. Alcances y limitaciones del estudio</b> .....	47
<b>VII. Resultados</b> .....	48
<b>VIII. Discusión</b> .....	55
<b>IX. Conclusiones y recomendaciones.</b> .....	66
<u>c. Parte Final</u>	
Bibliografía .....	68

## **Lista de figuras**

Figura 1. Subfamilias de los herpesvirus .....	11
Figura 2. Genoma del Virus Epstein-Barr .....	12
Figura 3 Estructura anatómica del estómago .....	24
Figura 4. Clasificación utilizada en cáncer gástrico incipiente .....	25
Figura 5. Clasificación de Borrmann del cáncer gástrico avanzado.....	26
Figura 6. Hibridación <i>in situ</i> para EBERs .....	47

## Lista de cuadros

Cuadro 1. Tipos de latencia del VEB, los genes virales expresados y su respectiva función .....	15
Cuadro 2. Enfermedades asociadas al VEB .....	20
Cuadro 3. Características de los tumores según la clasificación Borrmann .....	27
Cuadro 4. Estudios sobre la prevalencia del VEB en casos de cáncer gástrico en diferentes poblaciones, en el periodo comprendido entre 1993 y 2009.....	30
Cuadro 5. Casos positivos para la hibridación <i>in situ</i> del Virus Epstein-Barr.....	51
Cuadro 6. Características clínico-patológicas del adenocarcinoma gástrico de la población en estudio .....	52



## **Lista de abreviaturas**

VEB: Virus Epstein Barr

HHV4: Herpesvirus 4 humano

TRs: secuencias terminales del genoma viral

MI: mononucleosis infecciosa

EBNAs: antígenos nucleares virales

LMPs: proteínas latentes de membrana

EBERs: ARNs no-poliadenilados

LB: Linfoma de Burkitt

CG: cáncer gástrico

OMS: Organización Mundial de la Salud

CG-VEB+: cáncer gástrico positivo para el VEB

CG-VEB-: cáncer gástrico negativo para el VEB

## Resumen

El Virus de Epstein-Barr (VEB) está asociado a varias patologías, entre ellas, el cáncer gástrico (CG). El CG esporádico es el quinto cáncer en incidencia en el ámbito mundial y es la tercera causa de muerte. En Costa Rica es el segundo más frecuente en hombres y el cuarto en mujeres, además es la segunda causa de mortalidad por cáncer en ambos sexos. El presente estudio tuvo como objetivo establecer una posible relación entre la presencia del Virus de Epstein Barr, las características clínico-patológicas y otros factores de riesgo (infección con *H. pylori*), en casos de muestras parafinadas de adenocarcinoma gástrico. Para realizarlo se utilizaron las técnicas de hibridación *in situ* para el ARN EBER del VEB y tinción de Wright para detectar a *H. pylori*. Se analizaron 195 muestras, correspondientes a 121 hombres y 74 mujeres, quienes presentaron una edad promedio de  $65 \pm 13.3$  años y  $66.2 \pm 14.2$  años respectivamente. La presencia del VEB en las células cancerosas resultó positiva en 12 de las 195 muestras (6,15%). A nivel mundial, se observa una relación inversa entre la incidencia de CG y la prevalencia de CG-VEB+. En el caso de Costa Rica, la prevalencia para CG-VEB+ resulta baja (6,15%) y la incidencia de CG es alta, 17,3; cumpliéndose la relación inversa mencionada. Se observó que con relación al sexo existe una diferencia estadísticamente significativa entre CG-VEB- y CG-VEB+ ( $p=0.005$ ), todos los casos positivos corresponden a hombres, con edades entre los 28-84 años (promedio:  $60.4 \pm 14.2$  años). Esta diferencia entre sexos se puede atribuir a los estilos de vida (factores ocupacionales, hormonales, genéticos, de dieta, consumo de alcohol, tabaco). Un 75% de los CG-VEB+ fue sometido a una gastrectomía subtotal. El 100% de los CG-VEB+ corresponde al tipo intestinal, el cual es más frecuente en varones de edad avanzada y se asocia más con factores de riesgo ambientales. También se observó una asociación significativa entre la localización del tumor y la presencia del VEB ( $p=0.009$ ); la mayoría de los tumores VEB+ se localizaron en el cuerpo del estómago. La mayoría de los casos CG-VEB+ (11/12) corresponden a un Borrmann 3. En los CG-VEB+ 83.3% presentan un compromiso en los estratos de la serosa, que sobrepasa la serosa o que infiltra a otros órganos. Sólo uno de estos presenta invasión vascular y 66.7% presenta invasión linfática; con diferentes grados de compromiso ganglionar. Al determinar la presencia de *H. pylori* todas las muestras analizadas resultaron negativas. Una característica importante en el CG-VEB+ es que es predominante en la parte proximal del estómago, en cambio la infección con *H. pylori* está fuertemente relacionada con la gastritis atrófica y cáncer en el antro. Conclusión: La prevalencia de la infección por el VEB encontrada es similar a la que se reporta para países con alta tasa de incidencia de CG. El CG-VEB+ está significativamente asociado con el sexo masculino. No hubo asociación entre el CG-VEB+ y la presencia de *H. pylori*. Los CG-VEB+ corresponden a CG con una ubicación en el cuerpo del estómago y los CG-VEB- con ubicación en el antro. Ninguna de las otras características clínicas-patológicas en estudio está relacionada con la presencia viral ni influye en el comportamiento del tumor.

## I. Antecedentes

### A. Características del Virus de Epstein-Barr

El Virus de Epstein-Barr (VEB) o herpesvirus 4 humano (HHV4) es uno de los miembros más extensamente caracterizados de la familia de los Herpesvirus. Esta posee tres subfamilias (fig. 1), una de ellas es la Gama herpesvirinae, la cual incluye virus que infectan primariamente las células linfoides, poseen un ciclo de vida relativamente largo y son encontrados solo en primates. Dentro de esta subfamilia se encuentran los géneros de virus humanos *Rhadinovirus* y *Lymphocryptovirus*, en este último se encuentra el VEB (Middeldorp *et al.* 2003, Young *et al.* 2007).

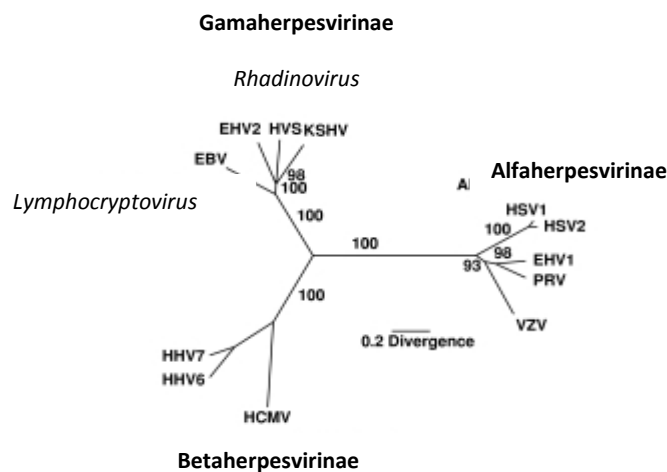


Fig 1: Subfamilias de los herpesvirus. EBV: Virus Epstein-Barr, EHV2: Citomegalovirus equino, HVS: Virus del herpes simple, KSHV: Herpesvirus asociado al Sarcoma de Kaposi, HSV1: Herpes simplex 1, HSV2: Herpes simplex 2, EHV1: Virus del Herpes equino, PRV: Virus de los pseudorrabia, VZV: Varicella-Zoster, HHV7: Virus herpes humano 7, HHV6: Virus herpes humano 6, HCMV: Citomegalovirus humano (Young *et al.* 2007)

El VEB tiene forma icosaédrica, con una cubierta de proteínas que envuelve su doble cadena de ADN, cuyo tamaño es aproximadamente de 184 kb. Su estructura posee un dominio largo (UL/U2) y uno corto (US/U1), que tienen toda la capacidad codificante del genoma viral, además poseen cuatro regiones internas en tándem (IR1-4) y dos secuencias terminales (TRs). También posee una región de replicación (Ori-P) del episoma viral y un origen de replicación lítico (Ori-lyt) (fig. 2) (Hsu & Glaser 2000, Middeldorp *et al.* 2003, Young *et al.* 2007).

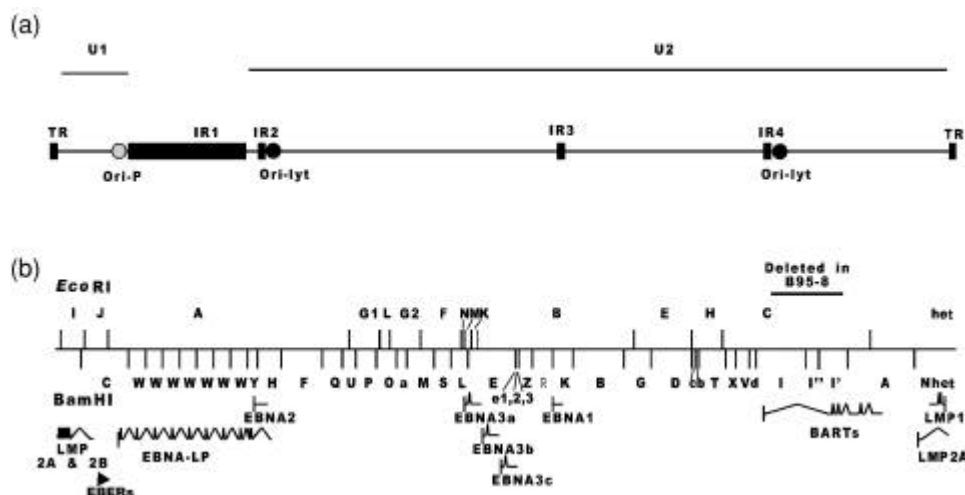


Fig 2: Genoma del Virus Epstein-Barr (Young *et al.* 2007)

El genoma viral es lineal, pero durante la infección, intracelularmente toma una forma circular llamada ADN episomal. El genoma posee una huella molecular que contiene un número característico de TR, este número se mantiene constante durante la replicación del episoma, por lo que cada célula hija derivada de una célula infectada comparte los episomas con un número idéntico de TR (Kutok & Wang 2006). Esta huella molecular permite conocer si la infección por este virus es monoclonal o policlonal.

Más del 90 % de las personas adultas a nivel mundial están infectadas con el VEB (Lee *et al.* 2009). La infección primaria generalmente ocurre en edades tempranas y es

asintomática (Thorley-Lawson & Gross 2004). El virus ha sido asociado con una patología llamada mononucleosis infecciosa (MI) (Torley-Lawson & Gross 2004). Por otro lado, el VEB también está asociado a una serie de patologías malignas, tales como: cáncer gástrico, carcinoma nasofaríngeo, trastornos linfoproliferativos post-trasplantes, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfoma nasal de células NK/T y linfomas asociados a individuos inmunosuprimidos (incluyendo infectados con VIH) (Griffin 2000, Young *et al.* 2000, Lee *et al.* 2009, Iwata *et al.* 2010)

#### B. Infección con el Virus de Epstein-Barr

El VEB se puede transmitir por varias vías; la más frecuente es la saliva, además a través de transfusiones sanguíneas, o de trasplantes de médula ósea y de otros órganos o tejidos de donantes infectados (Hsu & Glaser 2000). Las células diana más frecuentes son los linfocitos B y las células epiteliales orofaríngeas. Al ingresar el virus al organismo, cruza las barreras epiteliales e infecta las células B. Esta infección es mediada por la interacción de la glicoproteína viral Gp350/220 con el receptor CD21 presente en todas las células B; al darse esta interacción, la envoltura viral entra en contacto con la membrana de la célula hospedera, produce la proliferación de linfocitos B y se estimula la activación no específica de las células T (Kutok & Wang 2006).

Como cualquier otro herpesvirus, el VEB posee un ciclo lítico y un ciclo lisogénico. Durante la infección latente, el ADN genómico viral permanece como un episoma, replicándose solamente durante la fase S del ciclo celular y dividiéndose junto con las células hijas durante la fase de mitosis de las células B (Chen *et al.* 2009). El virus permanece transcripcionalmente activo, aunque de forma restringida, expresando únicamente seis antígenos nucleares (EBNA-1,-2,-3a,-3b,-LP y 3c), tres proteínas latentes transmembrana (LMP-1, -2a, -2b) y dos ARNs no-poliadenilados (EBER-1 y -2), los que se conocen como genes de latencia (Hsu & Glaser 2000, Middeldorp *et al.* 2003, Young *et al.* 2007). Por otro lado, se ha encontrado que el VEB codifica para al menos 44 microARNs, organizados dentro del genoma del virus de dos maneras: una en una región

intrónica del gen *BART* y otra en la región no transcrita del gen *BHRF1* (Klinke et al. 2014) (fig. 2b). Los miR-BARTs están expresados abundantemente en células epiteliales infectadas en forma latente (Choy *et al.* 2008) lo que sugiere un rol importante en el mantenimiento de la latencia. Babcock & Thorley-Lawson (2000) afirman que en portadores saludables, se ha descrito una forma de infección latente en células infectadas en la circulación periférica. En este caso, los genes latentes virales no son expresados con la posible excepción de las proteínas latentes de membrana 2a (LMP2a). Las células infectadas en forma latente, son muy específicas, y están restringidas a las células B de memoria en reposo. Basado en esto, los autores, proponen que la infección persistente del VEB es mantenida dentro de las células B de memoria de la sangre periférica. Esta sobrevivencia, aunque las células de memoria estén en forma inactiva, depende de varias señales que las células reciben al ingresar al tejido linfóide, así el virus codifica las LMP1 y LMP2a que reconocen esas señales y así, en el ganglio linfático, se asegura una sobrevivencia larga dentro del compartimento de memoria.

Según Fukayama (2010) la expresión de los genes latentes virales es variada y clasificada dentro de tres patrones: latencia tipo I, II y III (cuadro 1).

Cuadro 1. Tipos de latencia del VEB, los genes virales expresados y su respectiva función.

Latencia			Gen	Funciones	Referencia
I	II	III			
X	X	X	EBER1/2	Muestran una abundancia estimada de $10^5$ - $10^7$ copias por célula, por lo que se utiliza como un marcador de la infección por el VEB. Neutraliza el bloqueo de la transcripción de EBNA1 y LMPs y evita la apoptosis celular. Suprime los efectos antivirales del interferón alfa y gama, e induce la producción de IL-10, con lo que inhibe la función de la proteinaquinasa PKR, un importante mediador de los efectos antivirales.	Middeldorp <i>et al.</i> 2003
X	X	X	EBNA1	Es un transactivador que se asocia con los cromosomas de las células del hospedero durante la mitosis, participando en la segregación de los episomas en los núcleos de las células resultantes. Además conduce a la expresión de los genes de activación de la recombinasa RAG-1 y 2 que llevan a la inestabilidad genética. Es un promotor de LMP1. Su expresión en células B resulta en linfomas de células B, lo que sugiere que posee un rol directo en la oncogénesis.	Young <i>et al.</i> 2000, Hsu & Glaser 2000, Middeldorp <i>et al.</i> 2003
		X	EBNA2	Participa en la transactivación del VEB ya que induce la transición entre las etapas G0 y G1 de la mitosis e impulsa la expresión de LMP1 y LMP2, además es importante para la transformación de las células B. Como activador transcripcional de genes virales y celulares, sobrerregula la expresión de ciertos antígenos celulares B, como lo son de CD21 y CD23. Pero, su objetivo principal es el	Young <i>et al.</i> 2000, Hsu & Glaser 2000 Middeldorp <i>et al.</i> 2003, Young <i>et al.</i> 2007

				oncogén c-Myc, produciendo un efecto importante en la inducción de la proliferación de las células B.	
X	X	X	EBNA3A, B, C	Son reguladores de la expresión ya que participan en transformación de células B <i>in vitro</i> . EBNA3A-C regulan la expresión de ciertos genes celulares y se unen a ciertas proteínas del hospedero incluyendo diferentes isoformas del factor de transcripción celular RBP J-k. Por su lado, EBNA3C induce a la sobreexpresión del receptor de factor de crecimiento LMP1, reprime el promotor Cp y puede interactuar con pRb.	Young <i>et al.</i> 2000, Hsu & Glaser 2000, Middeldorp <i>et al.</i> 2003, Young & Murray . 2003
		X	EBNA-LP	Es un sobreexpresor de los factores necesarios para el crecimiento de las células B y se une a p53 y pRb. Dentro de las células B induce a la transición entre G0 y G1 mediada por la sobreexpresión de la expresión de la ciclina D2.	Young <i>et al.</i> 2000, Hsu & Glaser 2000, Middeldorp <i>et al.</i> 2003
X	X	X	BARTs	Codifica para la proteína RK-BARF0 que puede sobreexpresar la vía de expresión de LMP1.	Hsu & Glaser 2000, Middeldorp <i>et al.</i> 2003
	X	X	LMP1	Participa en la sobreexpresión de los inhibidores de la apoptosis Bcl-2 y de IL-10 y además interacciona con los factores asociados a los receptores de factores de necrosis tumoral (TRAFs). Junto con EBNA2 producen inmortalización de los linfocitos y la transformación de células. También participa en la transformación del crecimiento celular y la inducción de cambios en el fenotipo. Su expresión activa las vías de señalización celular NF-κB y STAT.	Hsu & Glaser 2000, Young <i>et al.</i> 2000, Middeldorp <i>et al.</i> 2003, Fukayama 2010 Hsu & Glaser 2000



X	X	LMP2A	Previene que la célula entre en ciclo lítico además de evitar la activación de células B.	Hsu & Glaser 2000, Young <i>et al.</i> 2000, Middeldorp <i>et al.</i> 2003, Fukayama 2010
X	X	LMP2B	Modula la acción de LMP2A.	Hsu & Glaser 2000, Middeldorp <i>et al.</i> 2003

---

La infección por el VEB es controlada por los mecanismos inmunes celulares y humorales. Los anticuerpos limitan la propagación de los virus infecciosos y las células T-citotóxicas destruyen las células infectadas que expresan las proteínas virales. Bajo condiciones en las cuales el paciente es inmunocompetente, la infección es controlada y entra en una fase latente. Por esta razón, la inmunosupresión del paciente puede resultar en la disminución de estas células T-citotóxicas e incrementar el riesgo de desarrollar alguna de las enfermedades relacionadas con VEB. La replicación lítica se puede dar en las células epiteliales orales o en células B cercanas al epitelio oral llamadas MALT (tejido linfoide asociado a mucosas) (Middeldorp *et al.* 2003, Torley-Lawson & Gross 2004, Kutok & Wang 2006).

El VEB se encuentra principalmente en estado latente, sin embargo, la reactivación de un ciclo lítico productivo, puede darse de forma espontánea o inducida. La fase lítica implica una secuencia de eventos ordenados en el tiempo, que se divide en tres fases de expresión génica regulada: temprana inmediata, temprana y tardía. En la fase lítica, el ADN genómico del VEB es lineal, y la iniciación de la replicación lítica temprana inmediata, depende de la expresión de dos genes tempranos-inmediatos (IE): *BZLF1* y *BRLF1*, cuyos productos (Zta o ZEBRA y Rta) poseen una función de transactivadores transcripcionales e inducen una cascada lítica de expresión de genes virales (Young *et al.*

2007, Chen *et al.* 2009). *Zta* interactúa con la proteína de CREB (CBP), deteniendo el ciclo celular en G1 y funcionando como un coactivador de algunos de los genes de expresión temprana que funcionan como factores de replicación (Young *et al.* 2007).

En la fase temprana, seis “proteínas básicas de replicación”, junto con *Zta* participan en la replicación del genoma viral en la zona Ori-lyt. *BMLF1*, es un gen temprano que tiene el rol de conectar el citoplasma y el núcleo por medio de dos señales de exportación nuclear, su producto es una proteína de unión al ARN que promueve la acumulación citoplasmática de ARNm viral. Otro gen que participa en la fase temprana es *BHRF1*, el cual previene la muerte celular apoptótica, ya que codifica para homólogos virales de Bcl-2 al igual que *BALF1*. Este gen al parecer actúa como un antagonico de los efectos anti-apoptóticos de *BHRF1*, al igual que los miembros de la familia Bcl-2 que se neutralizan entre sí. Otro gen es *BNLF2a*, que es un mediador del mecanismo de evasión inmune, afectando la presentación de antígenos virales ya que bloquea la interacción de los péptidos con el transportador TAP. Por otro lado, también está *BARF1* que influye en la liberación de las citoquinas de las células mononucleares de la respuesta del hospedero, controlando la respuesta inmune a la infección por el VEB (Kutok & Wang 2006, Young *et al.* 2007).

El paso de la fase temprana a la fase tardía no está bien caracterizado, sin embargo, se conoce que es inducida solamente por Rta. Al parecer un elemento TATA en la región del promotor de los genes tardíos, se encuentra en un ambiente transcripcionalmente inerte. Varios elementos reguladores operan en esta zona para activar la expresión génica tardía, en la cual participan varios productos génicos como las glicoproteínas, que participan en la endocitosis del virus en la célula, la interleucina-10 viral, que inhibe la activación de macrófagos y células dendríticas, y por último, participan varias proteínas estructurales como una proteína mayor de cápside llamada p160 (*BcLF1*) y tres proteínas de cápside pequeñas, p18(*BFRF3*), p23(*BLRF2*) y p40 (*BdRF1*), las cuales participan en la mediación de la morfogénesis celular (Young *et al.* 2007). Aproximadamente 80 proteínas virales son expresadas durante la replicación lítica. Este proceso es acompañado

del ensamble y la liberación de partículas virales que llevan a la destrucción de la célula hospedera (Young *et al.* 2007, Chen *et al.* 2009).

### C. Patologías asociadas al Virus de Epstein-Barr

La primo-infección por el VEB ocurre generalmente durante la infancia, en la mayoría de los casos sin manifestación clínica aparente. Sin embargo, si la infección ocurre durante la adolescencia o la edad adulta, se manifiesta como un cuadro de MI (Torley-Lawson & Gross 2004). Esta es una patología benigna que cursa con una triada sintomatológica que comprende fiebre, adenopatías cervicales y dolor de garganta (Crawford 2001).

Los pacientes con MI no complicada, generalmente requieren sólo de un tratamiento sintomático, por medio de líquidos, dieta blanda y el uso de antiinflamatorios no esteroideos o paracetamol para aliviar la fiebre, faringitis, cefalea y el malestar general (Vera-Izaguirre *et al.* 2003). En otros casos, el tratamiento preventivo con aciclovir o ganciclovir durante la terapia con anticuerpos antilinfocitarios o en el inicio del tiempo de trasplante reduce el rango de enfermedad linfoproliferativa en receptores de órganos trasplantados. La vacunación contra el VEB puede ser útil en aquellos grupos de personas que son seronegativas. La vacunación con antígenos purificados del VEB gp350 o vacuna del virus expresando gp350 protegido por una cubierta de algodón, previene el desarrollo de linfomas VEB positivos. En adición, la inmunización con péptidos de VEB correspondientes a los antígenos de VEB latentes, puede quizás incrementar o fomentar la inmunidad celular y reducir la morbilidad de las enfermedades malignas asociadas al VEB (Vera-Izaguirre *et al.* 2003).

El VEB además, está asociado a otro espectro de patologías (cuadro 2). Fue el primer virus humano en ser asociado con el desarrollo de neoplasias, al ser descubierto en células neoplásicas humanas en líneas celulares de linfoma de Burkitt (LB) (Bell *et al.* 1964, Dalldorf & Bergamini 1964); y actualmente se estima que se encuentra en cerca del 96% de los LB endémicos. En estudios posteriores fue identificado en una variedad de

neoplasias malignas, tales como linfomas de Hodgkin y no-Hodgkin (Fukayama 2010). Los tumores linfoides asociados con el VEB incluyen también las enfermedades linfoproliferativas de células B en los individuos inmunosuprimidos, ya sea por patologías como el SIDA, colagenopatías u otras causas como las iatrogénicas, como en el caso de los pacientes trasplantados. El VEB, además ha sido asociado con casi el 100% de los carcinomas indiferenciados de nasofaringe y cerca del 10% de carcinomas gástricos (Crawford 2001).

Cuadro 2. Enfermedades asociadas al VEB

<b>Latencia</b>	<b>Enfermedades asociadas</b>	<b>Prevalencia de la infección</b>	<b>Referencia</b>
I	Linfoma de Burkitt	96-98% (endémico)	Griffin 2000,
	Cáncer gástrico	5-20% (adenocarcinomas)	Young & Rickinson 2004, Fukayama 2010,
II	Linfoma de Hodgkin	40-50%	Labredque <i>et al.</i> 1995,
	Carcinoma nasofaríngeo	100%	Hsu & Glaser 2000,
	Linfoma nasal de células NK/T	100%	Crawford 2001, Middeldorp <i>et al.</i>
	Cáncer gástrico	5-20% (adenocarcinomas)	2003, Young & Rickinson 2004,
III	Linfomas asociados al VIH	40-100%	Griffin 2000,
	Transtornos linfoproliferativos posttrasplantes	90%	Hsu & Glaser 2000, Young y& Rickinson 2004
	Mononucleosis infecciosa	100%	

#### D. Cáncer gástrico

El cáncer gástrico esporádico (CG) es el quinto cáncer en incidencia en el ámbito mundial, luego del cáncer de pulmón, mama, colorrectal y próstata (Ferlay *et al.* 2015); y es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo (723 073 muertes por año, el 8,8% del total) (Globocan 2012). El país con la mayor tasa de incidencia (por 100 mil habitantes) de CG es la República de Corea con 41,8; luego Mongolia con 32,5 y en tercer lugar se encuentra Japón con 29,9. La tasa de incidencia estandarizada por edad (por 100 mil habitantes) es dos veces más alta en hombres que en mujeres, van desde 3,3 en el oeste de África a 35,4 en el este de Asia para los hombres y de 2,6 en el este de África a 18,3 en el este de Asia para las mujeres. Según la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (por sus siglas en inglés IARC) en el año 2012 apareció casi un millón de nuevos casos de esta enfermedad (952 000 casos) y más del 70% de los casos ocurren en países desarrollados (456 000 hombres y 221 000 mujeres). Las mayores tasas de mortalidad (por 100 mil habitantes) se estiman en el este de Asia (24 en hombres, 9,8 en mujeres) y la más baja en América del Norte (2,8 y 1,5 respectivamente). Altas tasas de mortalidad están también presentes en ambos sexos en Europa central y oriental, y en América Central y del Sur (IARC 2015).

Costa Rica es uno de los países que presenta tasas de incidencia y mortalidad más altas por CG a nivel mundial (17,3 y 12,0 por 100 000 habitantes respectivamente). En Costa Rica, el CG es el segundo cáncer más frecuente en hombres con una incidencia de 21,4 por cada 100 000 hombres y el cuarto en mujeres, con una incidencia de 13,7 por cada 100 000 mujeres. Es la segunda causa de mortalidad por cáncer en hombres (15,9 por cada 100 000 hombres) y en mujeres (8,5 por cada 100 000 mujeres), precedidas únicamente por cáncer de próstata y cáncer de mama respectivamente (IARC 2015).

La etiología del CG no está completamente elucidada, sin embargo, se conoce que en todas las etapas del proceso de carcinogénesis, intervienen varios determinantes como la predisposición genética, los factores ambientales, algunos tipos de infecciones (*H.*

*pylori*, VEB) y factores dietéticos (la ingesta de sal excesiva, el bajo consumo de frutas y verduras) (Sierra 2002, Smith *et al.* 2006).

Varias alteraciones genéticas juegan un papel importante en el proceso de la carcinogénesis gástrica y en su progresión. La acumulación de cambios genéticos incluye: mutaciones y/o amplificaciones, así como la sobreexpresión de oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores y la inestabilidad de microsatélites en una o más regiones cromosómicas (Crew & Neugut 2006).

Uno de los factores que incrementa el riesgo de desarrollar CG es la infección por la bacteria gram-negativa *Helicobacter pylori* que fue clasificada, en 1994, como un carcinógeno tipo I por la Organización Mundial de la Salud (De la Riva *et al.* 2004). Según Dalton-Griffin & Kellam (2009), la prevalencia de *H. pylori* en el mundo es muy alta, aproximadamente el 50% de las personas están infectadas con la bacteria; se ha observado, en algunos países desarrollados, que si se da un decline en la prevalencia de la bacteria, también declina la incidencia del CG. Por otro lado, se ha estimado que los individuos seropositivos para *H. pylori* tienen de 2,1 a 16,7 veces más riesgo de desarrollar CG que los seronegativos. Principalmente, la bacteria está asociada con el riesgo de CG no cardial (Crew & Neugut 2006).

En Costa Rica, no existe un dato exacto de la prevalencia de la bacteria para la población general, sin embargo, se han hecho varios estudios. Tres de ellos encontraron prevalencias de 65.8 % y 72.4 % en dos zonas de alto y bajo riesgo de CG respectivamente (Sierra *et al.* 1992) y de 82 % y 83 % en cantones de bajo y alto riesgo también (Miranda *et al.* 1998). Además en otro estudio realizado en el Hospital San Juan de Dios se encontró una prevalencia de infección de 54 % (Blanco-Delgado *et al.* 2001).

El riesgo de CG es mayor cuando el individuo presenta una infección con una cepa de la bacteria que posee el gen A asociado a citotoxina (*cagA*). Comparado con las cepas *cagA*-, las *cagA*+ producen en el paciente un mayor riesgo de presentar gastritis crónica atrófica y CG distal (antral) (Crew & Neugut 2006).

A pesar de estos datos, el hecho de que no todas las personas que están infectadas con la bacteria desarrollen CG, claramente muestra que este agente infeccioso es un factor

de riesgo, pero no la única razón del desarrollo de la neoplasia, existen otros factores ambientales y genéticos que están involucrados en su desarrollo del mismo (Dalton-Griffin & Kellam 2009).

En 1970, Correa formuló un modelo de CG, el cual postula una secuencia de cambios patológicos que llevan de una gastritis crónica a una gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y eventualmente desarrollo del CG. Basado en estudios epidemiológicos Correa concluyó que el primer paso en la vía; el desarrollo de la inflamación gástrica, puede ser iniciado por una dieta rica en sal, nitritos y nitratos, así como la deficiencia de frutas frescas y vegetales, además de algunos agentes infecciosos como *H. pylori* que coloniza la mucosa gástrica y provoca una inflamación crónica y persistente. La dieta y los continuos efectos de la inflamación crónica contribuyen con los cambios progresivos en la mucosa gástrica normal hasta desarrollar el carcinoma (Houngton & Wang 2005).

#### E. Clasificación de los adenocarcinomas gástricos

El CG puede ser clasificado usando varios criterios. Uno de ellos es la clasificación según el sitio anatómico donde se encuentra el tumor (Fig. 3). La ubicación del tumor en el estómago, le confiere diferencias en cuanto a la susceptibilidad genética, manifestaciones clínicas y diagnósticos (Portela *et al.* 2008). Esta clasificación incluye:

- a) Adenocarcinoma de cardias (proximal): aumenta su incidencia en cinco a seis veces en los países desarrollados, además comparte características epidemiológicas con el adenocarcinoma distal de esófago y el gastroesofágico. Se puede observar una incidencia cinco veces mayor en hombres que en mujeres, y en el caso de las etnias, dos veces más en blancos que negros. Se ha observado también una tasa de incidencia relativamente alta en niveles socioeconómicos altos (Crew & Neugut 2006).

b) Adenocarcinoma antral (distal): posee una alta incidencia en el este de Asia (Japón), oeste de Europa además de Centro y Suramérica. Tiene una relación de 2:1 entre hombres y mujeres. Las tasas de incidencia son significativamente más altas entre hombres de afrodescendientes y grupos de nivel socioeconómico bajo en países subdesarrollados. La incidencia cambia progresivamente con la edad, teniendo un pico entre los 50 y 70 años (Crew & Neugut 2006).

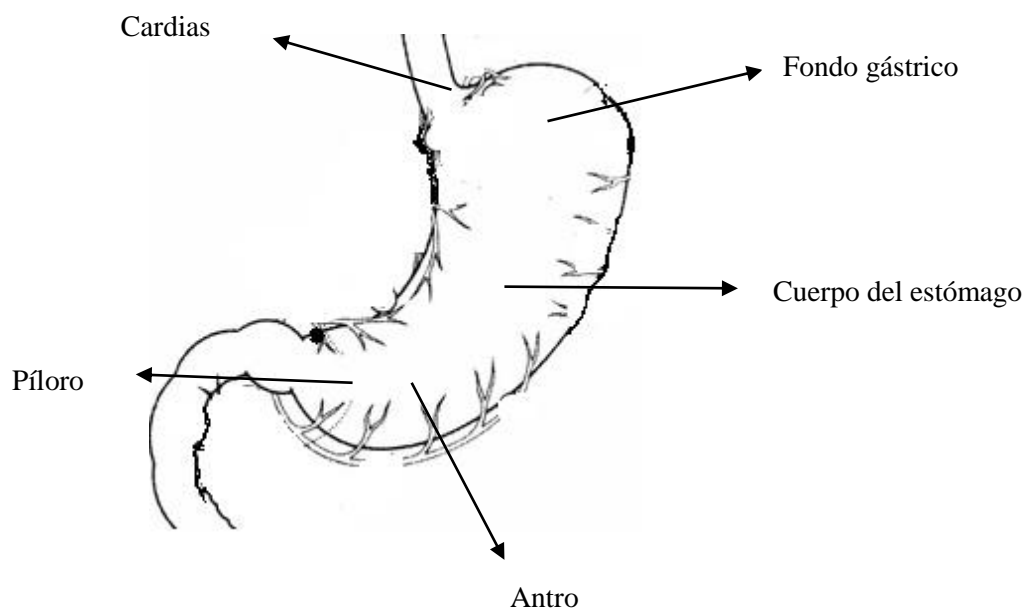


Fig 3: Estructura anatómica del estómago (Modificado de Anónimo 2012a)

Desde el punto de vista de invasión a la pared hay que distinguir dos grupos, esto tiene gran relevancia terapéutica y quirúrgica (Anónimo 2012b).

1. Cáncer gástrico temprano: aquel que infiltra mucosa y submucosa (hasta la capa muscular de la mucosa)
  - a. Cáncer intramucoso: tiene un riesgo de metástasis ganglionares de 3%.



b. Cáncer submucoso: el riesgo de metástasis ganglionares varía entre 15 a 20%.

2. Cáncer gástrico avanzado es aquel que infiltra más allá de la capa muscular de la mucosa gástrica. El riesgo de metástasis ganglionares es de 40% o más (Anónimo 2012b).

Desde el punto de vista macroscópico los tumores tempranos y avanzados pueden clasificarse de acuerdo a su forma de presentación en diferentes tipos. En caso del cáncer temprano, el cual compromete los estratos: mucoso y submucoso de la pared gástrica, la clasificación utilizada es: tipo I: protruido, tipo IIa: superficial elevado, tipo IIb: superficial plano, tipo IIc: superficial deprimido y el tipo III: excavado (Fig 4) (Anónimo 2014). Al mencionar los tipos mixtos se coloca primero el de mayor dimensión (Espejo & Navarrete 2003).

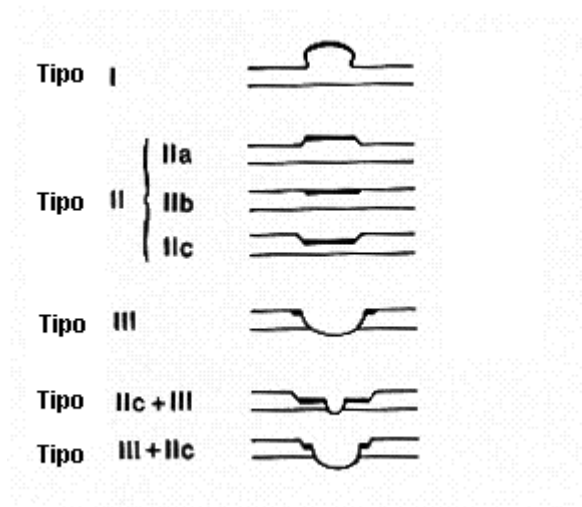


Fig 4: Clasificación utilizada en cáncer temprano (Mena 2002, Anónimo 2012b)

La clasificación utilizada en casos de cáncer avanzado, que va más allá de la capa submucosa, es la siguiente: (Mena 2002, Espejo & Navarrete 2003) (Fig. 5)

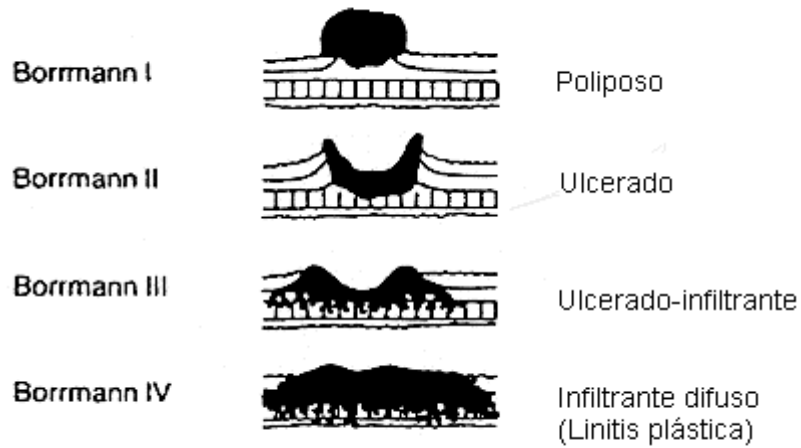


Fig 5: Clasificación de Borrmann del cáncer gástrico avanzado (Espejo & Navarrete 2003)

El tipo I es Polipoide y protruye hacia la luz del estómago, el tipo II es ulcerado pero bien circunscrito, el tipo III es también ulcerado pero de bordes mal definidos y finalmente el tipo IV es la forma difusa (Espejo & Navarrete 2003) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características de los tumores según la clasificación Borrmann (Espejo & Navarrete 2003)

<b>Característica</b>	<b>Tipo</b>	
	<b>I y II</b>	<b>III y IV</b>
<b>Límites</b>	Bien diferenciados	Sin límites
<b>Localización</b>	Antro	Fondo
<b>Diferenciación</b>	Diferenciados	Indiferenciados
<b>Acidez</b>	Baja	Normal
<b>Pronóstico</b>	Mejor	Peor
<b>Sexo</b>	Común en hombres	Común en mujeres
<b>Edad</b>	Más edad	Menos edad
<b>Metástasis</b>	Hemática	Linfática

La Organización Mundial de la Salud (OMS) utiliza otra clasificación la cual indica las características histológicas, tipo histológico y grado de diferenciación. Esta clasificación es altamente reproducible; sus términos son muy familiares para los patólogos y es empleada como una clasificación de rutina por muchos de ellos (Espejo & Navarrete 2003). Ésta es:

- Tumor papilar (pap)
- Tumor tubular:
  - ✓ Tubular 1 (tub1) (bien diferenciado)
  - ✓ Tubular 2 (tub2) (moderadamente diferenciado)
  - ✓ Tubular 3 (tub3) (pobrementemente diferenciado)
- Tumor con células en anillo de sello (sig)
- Tumor mucinoso (muc)
- Tumor indiferenciado (ud)
- Tumor adenoescamoso (as)

- Tumor escamoso (sg)
- Tumor carcinoide (cd)
- Miscelánea (ms)

Otra clasificación que se hace del adenocarcinoma gástrico es la clasificación llamada TNM (según UICC). Ésta, caracteriza el tumor, el compromiso linfático y la metástasis de la siguiente manera (Romero & Navarrete 2003):

- Tumor primario (T)
  - ✓ Tx: el tumor primario no puede ser investigado
  - ✓ T0: no hay evidencias de tumor primario.
  - ✓ Tis: carcinoma *in situ* (tumor intraepitelial, sin invasión de la lámina propia).
  - ✓ T1: el tumor compromete la lámina propia o submucosa.
  - ✓ T2: el tumor infiltra la muscular propia o la subserosa.
  - ✓ T3: el tumor penetra la serosa.
  - ✓ T4: el tumor infiltra estructuras vecinas.
- Compromiso linfático regional (N)
  - ✓ Nx: los ganglios linfáticos regionales no se pueden investigar.
  - ✓ N1: metástasis en 1-6 ganglios linfáticos linfonodos.
  - ✓ N2: metástasis en 7-15 ganglios linfáticos.
  - ✓ N3: metástasis en más de 15 ganglios linfáticos.
- Metástasis a distancia (M)
  - ✓ Mx: las metástasis no se pueden investigar.
  - ✓ M0: no hay metástasis.
  - ✓ M1: hay metástasis a distancia.

Por último, otro tipo de clasificación utilizada para el CG, en estudios epidemiológicos, es la llamada Clasificación de Lauren, basada en características

histológicas, la cual se clasifica en el tipo difuso e intestinal. El tipo intestinal, también conocido como carcinoma diferenciado, está asociado con gastritis crónica atrófica severa, metaplasia intestinal y displasia en la mucosa vecina y corresponde a carcinomas gástricos bien o moderadamente diferenciados. Se le llama así ya que posee formaciones glandulares y células epiteliales que recuerdan a las células intestinales y además crecen formando nódulos. Normalmente se localiza en el antro y en zonas donde existía metaplasia intestinal. Por otro lado, el tipo difuso, conocido como poco diferenciado, es infiltrante, con células discohesivas que invaden en forma individual o en pequeños grupos. Se pueden observar células en anillo de sello y se localiza normalmente en el fondo del estómago. Ambos tipos, intestinal y difuso se encuentran en una frecuencia de 53% y 33% respectivamente. El 14% restante no se caracteriza en ninguno de los dos tipos, así que se le llama indiferenciado sin producción de moco (Espejo & Navarrete 2003).

#### F. Asociación del cáncer gástrico con el Virus de Epstein Barr

Otro factor de riesgo, de carácter infeccioso, para desarrollar CG, es el VEB. El carcinoma gástrico positivo para VEB (CG-VEB+) es una enfermedad no endémica, distribuida a través del mundo. En diferentes estudios realizados se ha observado que la prevalencia del VEB en adenocarcinoma gástrico se encuentra entre el 5,2% y el 20,1% (cuadro 4). Un estudio realizado por Takada (2000) en Japón, uno de los países con mayor incidencia de CG a nivel mundial; obtuvo diferencias regionales en la incidencia con respecto al CG-VEB+, la más alta fue observada en la ciudad de Okinawa (10,3%), donde la mortalidad por esta enfermedad es la más baja, y la menor incidencia de morbilidad se encuentra en Niigata (3,1%), siendo la ciudad que presenta la mayor mortalidad por CG. Esta observación sugiere una correlación inversa entre la incidencia del CG-VEB+ y la mortalidad por CG. Por otro lado, la incidencia de CG-VEB+ en este país es tres veces mayor en hombres que en mujeres, y con predilección por hombres jóvenes.

Desde el punto de vista histopatológico, los casos positivos para VEB son más frecuentes en la zona del cardias (8,1%), a nivel de cuerpo (10,6%) y en el píloro (12,5%), que en el antro (3,9%) (Takada 2000). Otros estudios encuentran que la infección viral está asociada tanto con el CG de tipo difuso como el de tipo intestinal (De la Riva *et al.* 2004). Casi el 10% de los carcinomas gástricos totales son CG-VEB+; estos se dan en edades relativamente tempranas y son de mejor pronóstico cuando no hay afectación de ganglios linfáticos al momento del diagnóstico (Fukayama 2010).

Cuadro 4. Estudios sobre la prevalencia del VEB en casos de cáncer gástrico en diferentes poblaciones, en el periodo comprendido entre 1993 y 2009

<b>Población</b>	<b>Metodología</b>	<b>Prevalencia</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
Taiwán (N=55)	Hibridación <i>in situ</i> en muestras parafinadas	10,9%	Los CG-VEB+ se distribuyeron por sexo en cuatro hombres y dos mujeres. El VEB estuvo presente en células del carcinoma y células displásicas adyacentes, pero no en linfocitos ni tejido gástrico normal. Cuatro casos positivos se dieron en tipo tubular y uno en células en anillo y otro fue clasificado como carcinoma de tipo linfoepitelioma.	Harng <i>et al.</i> 1995, Lee <i>et al.</i> 2009
Hong Kong (N=74)	Hibridación <i>in situ</i> en muestras parafinadas	9,5%	100% en hombres. Los EBERs se expresaron en células de adenocarcinoma y en células metastásicas en ganglios linfáticos.	Yuen <i>et al.</i> 1994, Lee <i>et al.</i> 2009

Corea (N=89)	Hibridación <i>in situ</i> e inmunohistoquímica en muestras parafinadas	13,5%	Nueve hombres y tres mujeres. LMP 1 se encuentra expresado en tres de los 12 casos positivos para VEB.	Shin <i>et al.</i> 1996, Lee <i>et al.</i> 2009
China (N=118)	Hibridación <i>in situ</i> , inmunohistoquímica y PCR de muestras parafinadas	7,8%	11 hombres, cinco mujeres. En la clasificación histológica, cuatro casos resultaron en tubular 1 y 2; y 12 en otros tipos histológicos.	Qiu <i>et al.</i> 1997, Lee <i>et al.</i> 2009
Malasia (N=50)	Hibridación <i>in situ</i> e inmunohistoquímica en muestras parafinadas	10,0%	Cuatro hombres, una mujer. En cuando a la clasificación histológica, cuatro casos resultaron del tipo intestinal y uno del tipo difuso. En ninguna de las muestras positivas para VEB se observó la expresión de LMP1.	Karim y Pallesen. 2003, Lee <i>et al.</i> 2009
Japón (N=970)	Hibridación <i>in situ</i> en muestras parafinadas del tumor	6,9%	56 hombres y 11 mujeres. No resultó una relación significativa con respecto a la edad. En cuanto a la ubicación gástrica de los CG-VEB+, el 3,9% fueron en el antro, 8,1% en el cardias, 10,6% en la mitad del estómago y 12,5% en resto del estómago.	Tokunaga <i>et al.</i> 1993
Japón (N=1000)	PCR, hibridación <i>in situ</i> (EBERs) en muestras parafinadas e inmunofluorescencia (EBNA1)	7%	El 89% de los CG-VEB+ se presenta en carcinomas indiferenciados, el 5,7% en carcinomas poco diferenciados y el 6,8% en carcinomas de moderado a	Imai <i>et al.</i> 1994

Irán (N=273)	Hibridación <i>in situ</i> , PCR y Southern blot de muestras parafinadas	3,3%	bien diferenciados. No se estudió la relación por edad ni sexo. Ocho hombres y una mujer. En relación al tipo de tumor uno intestinal y ocho difusos; en cuanto a la localización del tumor resultaron uno en la parte alta, cinco en la parte media y tres en la parte baja del estómago.	Abdirad <i>et al.</i> 2007 Lee <i>et al.</i> 2009
Pakistán (N=52)	Hibridación <i>in situ</i> de muestras parafinadas	1,9%	Solo un hombre de 42 años de edad que presentaba un tumor clasificado como adenocarcinoma tubular diferenciado.	Anwar <i>et al.</i> 2005, Lee <i>et al.</i> 2009
Francia (N=56)	Hibridación <i>in situ</i> , inmunohistoquímica en muestras parafinadas y Southern blot	7,7%	Según tipo histológico, hubo cinco casos difusos y dos intestinales. No hubo clasificación por sexo ni edad. En el 53% de los casos CG-VEB- se dio un fenómeno mutacional de p53.	Chapel <i>et al.</i> 2000 Lee <i>et al.</i> 2009
Colombia (N=99)	Hibridación <i>in situ</i> en muestras parafinadas y en formol	10, 1%	9 hombres y 1 mujer, resultaron positivos para el VEB. Las edades de los pacientes positivos para VEB están entre 43 y 77 años. En cuanto a la posición del tumor, el 16,6% fue en el cardias y 14,3% en el tercio medio gástrico.	Carrascal <i>et al.</i> 1999
Chile (N=185)	Hibridación <i>in situ</i> en muestras parafinadas	16,8%	23 hombres y 8 mujeres fueron CG-VEB+	Corvalán <i>et al.</i> 2001,



				No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el sexo y la edad de los casos de CG VEB+ y VEB-. Histológicamente hubo más casos de tipo difuso (29,6%) que intestinal (8,8%). Además por ubicación del tumor, se dieron un 66% en el píloro y un 26,8% en el cardias.	Lee <i>et al.</i> 2009
México(N=330)	Hibridación <i>in situ</i> de muestras parafinadas, PCR y Southern blot	7,3%		13 hombres y 11 mujeres. Según la localización del tumor, para los CG-VEB+, 6,8% se encontraban en el tercio superior, 10,2% en la mitad y 5,1% en la zona baja del estómago	Herrera-Goepfert <i>et al.</i> 2005
Estados Unidos (N=235)	Microarreglos e hibridación <i>in situ</i> de muestras parafinadas	5,10%		La distribución por sexo fue: 11 hombres y una mujer VEB+. La distribución por edades se encontró entre los 21 y 93 años.	Truong <i>et al.</i> 2009
Brasil (N=80) Japón(N=510)	Hibridación <i>in situ</i> en muestras parafinadas e hibridación por Southern blot	5,7% en Japón y 5% en Brasi		Se presentó una proporción 21:8 entre hombres y mujeres en Japón y 3:1 en Brasil para los casos CG-VEB+	Hayashi <i>et al.</i> 1998, Lee <i>et al.</i> 2009

#### G. Factores involucrados en el desarrollo del cáncer gástrico positivo por el Virus de Epstein Barr

En un estudio realizado en 1000 casos de CG primario en Japón, por Imai y colaboradores (1994), por medio de inmunofluorescencia, se observó en un número significativo de pacientes, que las células malignas epiteliales expresaron el gen *EBNA1*, este es un oncogén viral que participa en la segregación de los episomas durante la replicación viral. Pero por otro lado, las células malignas no presentaron la expresión de *EBNA2*, *3A*, *3B* ni *3C*. Los pacientes con carcinoma gástrico portadores del VEB, presentaban niveles séricos elevados de anticuerpos específicos de VEB, sin reducción de la inmunidad celular específica para el virus, además los antígenos diana de las células T-citotóxicas no se expresaban, sugiriendo que las células que portan el virus son capaces de evadir la respuesta inmune del hospedero.

Según Akiba y colaboradores (2008), la oncoproteína viral LMP1 es raramente expresada en CG-VEB+, mientras que los EBERs se expresan en casi todas las células, indicando su importancia en el desarrollo y mantenimiento del carcinoma. Por otro lado, también se cree que BARF1 y LMP2A participan en la carcinogénesis gástrica asociada a VEB. En conjunto, el papel preciso del VEB en la carcinogénesis gástrica, todavía no está claro, aunque se sospecha su participación etiológica en la neoplasia gástrica.

En un estudio realizado en China, por Luo y colaboradores (2005) por medio de la técnica de hibridación *in situ* de ARNs, se obtuvo que diez de once casos de carcinoma gástrico, expresaron *EBER1* en casi todas las células del carcinoma, sugiriendo que la infección con el VEB ocurre temprano en la oncogénesis; con subsecuentes expansiones clonales de las células tumorales que contienen el VEB. En todos los casos de CG-asociados al VEB estudiados por las técnicas de RT-PCR y Southern blot, se detectó la expresión de *EBNA 1*, indicando que este gen juega un rol patogénico importante en la transformación celular. Contrario a esto, los genes *EBNA2*, *LMP1* y *2B* estuvieron ausentes en todos los casos, mientras que *LMP2A* fue detectado en cuatro de los 11 casos. El producto de este gen: LMP2A está relacionado con la vía de señalización específica que

bloquea las células B y la movilización de calcio, lo cual puede resultar ventajoso para el mantenimiento del patrón de latencia del VEB y la inhibición de su reactivación (Luo *et al.* 2005). También se ha determinado que LMP2A incrementa la fosforilación de STAT3 en las células epiteliales gástricas, lo cual activa la transcripción de la DNMT1, esto provoca un incremento en la metilación de las islas CpG del promotor del gen PTEN, el cual participa en la apoptosis celular, bajando así, su expresión y así, activando la gastritis crónica. Debido a esto, LMP2A influye en las vías de señalización de las cuales son parte estos genes, como son el crecimiento celular y motilidad celular, apoptosis y metilación de promotores (Fukayama 2010).

Los genes de la fase lítica viral también son estudiados para conocer de qué manera están involucrados en el CG-VEB+. En el estudio realizado por Luo y colaboradores (2005), de los 172 casos totales, siete presentaron el transcrito viral *BcLF1*; y dos el transcrito viral *BHRF1*. *BHRF1* es una proteína que podría inhibir la apoptosis de los linfocitos B y células epiteliales y promover el crecimiento celular y su transformación. Por otro lado, tanto *BZLF1*, que activa la replicación lítica del virus, como *BARF1*, se detectaron en cinco casos. Sin embargo, los genes *BLLF1* y *BRLF1* no fueron detectados. La expresión de los genes líticos varía entre los tumores analizados en forma individual, esto apunta a que la infección lítica ocurre en pequeñas proporciones en las células de carcinoma infectadas con el VEB y el ciclo productivo a menudo queda incompleto.

El VEB también expresa el miR-BART5 en las células gástricas, según Choy y colaboradores (2008) esto provoca que ellas pierdan la sensibilidad a las proteínas proapoptóticas BH3, como lo son BIM y PUMA. Se cree que el virus codifica los miARNs para estabilizar la infección latente promoviendo la sobrevivencia celular al inhibir la acción de las proteínas y evitar la apoptosis celular.

Existen varias hipótesis que explican cómo podría desarrollarse el CG asociado al VEB. Una de esas es la hipótesis propuesta por Akiba *et al.* (2008), donde se explica que el virus posee una infección persistente en células B de memoria sin darse la expresión de genes virales latentes. Debido a acción de factores ambientales (estilo de vida

y factores ocupacionales) y al hecho que el sistema inmune restringe la acción contra el VEB, se da la reactivación de genes de latencia en las células B de memoria y subsecuente producción de viriones. Además al darse un daño previo en la mucosa gástrica, se da la interacción célula-célula entre los linfocitos B y las células epiteliales. Este es considerado el primer paso para el desarrollo del CG-VEB+. Debido a esto se va a dar la infección del VEB en células preneoplásicas. VEB disminuye la regulación de muchos genes del hospedero por metilación de promotores, implicando en el desarrollo de del CG positivo para el VEB.

#### H. Co-infección VEB y de *H. pylori* en el desarrollo del CG.

En un intento por comprender el proceso de carcinogénesis provocada por *H. pylori* y el VEB, algunos investigadores han estudiado la alteración en los genes y proteínas que estos agentes puede producir, y por lo tanto, señalan las posibles vías patogénicas. En ese sentido, las proteínas involucradas en el ciclo celular (c-Myc, p53) y la apoptosis (Bcl-2 y Bax), pueden desempeñar un importante rol en el desarrollo de la neoplasia (Portela *et al.* 2008).

Portela y colaboradores (2008), por medio de la hibridación *in situ*, detectaron el VEB, y por PCR se evidenció la presencia de *ureC* de *H. pylori*, así como mutaciones en *p53*. También, mediante inmunohistoquímica se detectó la expresión de Bcl-2, Bax y c-Myc. Para investigar la posible relación entre los dos agentes infecciosos en la tumorigénesis gástrica, los casos fueron divididos en tres grupos: Hp (+)/EBV (+) con un 8,45% de los casos, todos en hombres; Hp (+)/EBV (-) con un 86% de los casos, la mayoría presente en hombres y Hp (-)/EBV (-) con un 5,55% y una relación de 3:1 entre mujeres y hombres respectivamente. En este estudio se observó que la mayoría de los casos fueron Hp (+). No fueron encontrados casos positivos para VEB sin presentar la infección por la bacteria. Por esta razón, no se pudo establecer una relación entre los agentes infecciosos y la posición anatómica del tumor. El porcentaje mayor, en los tres

grupos, se presentó en la zona del antro, y el grupo Hp (-)/EBV (-) no presentó ningún caso en la zona del cardias. Bcl-2 fue detectada en el grupo exclusivamente infectado por *H. pylori*, sugiriendo una posible relación entre ésta y el proceso apoptótico celular. Por otro lado, se presentó un bajo nivel de las proteínas c-Myc y Bax en los grupos positivos para el VEB, aludiendo que el virus puede inhibir la expresión de los genes correspondientes, deteniendo, el proceso apoptótico, contrario a lo que sucede con *H. pylori*. Por otro lado, las mutaciones en p53 son alteraciones independientes de ambos agentes infecciosos. Estos datos sugieren que la carcinogénesis gástrica se da por vías diferentes dependiendo del agente infeccioso que esté presente.

## **II Justificación**

El CG es un problema importante de salud pública. En etapas tempranas, la probabilidad de curación es alta, con una sobrevivida a 5 años entre un 85% y un 90% de los pacientes, pero en etapas avanzadas, la curación es menos probable, el tratamiento es costoso e invasivo para el paciente y además la probabilidad de éxito en este es muy baja (Anónimo 1998, Mena 2002).

Se trata de una neoplasia que al inicio no presenta síntomas bien caracterizados. Es importante conocer los factores etiológicos y de riesgo que hacen que la mucosa gástrica normal se convierta en una mucosa gástrica cancerosa.

En Costa Rica no existen estudios previos que establezcan la prevalencia del VEB en casos de adenocarcinoma gástrico. Por lo tanto, es primordial, aumentar los conocimientos que se tengan de la neoplasia, los factores de riesgo implicados y el desarrollo de ésta.

Para ello, se plantea la siguiente pregunta:

**Problema:** ¿Existe relación entre la infección por el Virus de Epstein Barr, las características clínico-patológicas y otros factores conocidos de alto riesgo con el desarrollo de la carcinogénesis gástrica, en casos de muestras parafinadas de archivo de adenocarcinoma gástrico provenientes del Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia?

## **III. Hipótesis**

**Hipótesis nula:** No hay relación entre la presencia del Virus de Epstein Barr, las características clínico-patológicas y otros factores de riesgo en casos de adenocarcinoma gástrico

**Hipótesis alternativa:** Existe relación entre la presencia del Virus de Epstein Barr, las características clínico-patológicas y otros factores de riesgo en casos de adenocarcinoma gástrico.

#### **IV. Objetivo general:**

- Establecer una posible relación entre la presencia del Virus de Epstein Barr, las características clínico-patológicas y otros factores de riesgo de los pacientes, en casos de muestras parafinadas de archivo de adenocarcinoma gástrico provenientes del Hospital Calderón Guardia.

#### **Objetivos específicos:**

1. Determinar la prevalencia del Virus Epstein Barr en la población seleccionada.
2. Determinar si existe relación entre la presencia del Virus Epstein Barr y las características clínicas-patológicas que presenta la población estudiada.
3. Definir si existe relación entre la infección con el VEB y otros factores de riesgo como edad, sexo e infección por *Helicobacter pylori*.

## **V. Metodología**

### **A. Tipo de estudio**

El presente estudio es de tipo descriptivo transversal, estudia las características demográficas, clínico-patológicas, de infección por *Helicobacter pylori* de una población costarricense con alto riesgo de desarrollar carcinoma gástrico en sus formas asociadas o no al VEB.

### **B. Población de estudio**

Este trabajo de tesis es parte del proyecto N° 742-A8-513: *Asociación del virus Epstein Barr con el cáncer gástrico*, que incluye muestras parafinadas archivadas de piezas quirúrgicas de pacientes operados por cáncer gástrico primario entre los años 2001 y 2006, provenientes del Hospital Maximiliano Peralta y del Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia.

Dicho proyecto fue aprobado por el CLOBI del Hospital Calderón Guardia (HCG) con el número CLOBI-HCG-07-05-2009 y posee el aval del CLOBI del Hospital Maximiliano Peralta con el número HMP-DM- 1662-2007, CLOBI-HMP-005-2008. Para esta tesis se utilizaron únicamente 195 muestras provenientes del HCG.

La presente tesis cuenta con aprobación del Comité Ético Científico de la UCR (oficio VI-7342-2012)

#### **i. Criterios de inclusión y exclusión**

Se incluyeron en el estudio las muestras parafinadas archivadas de pacientes mayores de 18 años operados por cáncer gástrico primario, en el HCG, entre enero del 2002 y diciembre del 2006. Se excluyeron del mismo las muestras parafinadas archivadas provenientes de pacientes operados por carcinoma gástrico recurrente.



### C. Muestra de estudio

195 muestras de tejido archivadas (bloques de parafina) provenientes de pacientes operados por carcinoma gástrico en el HCG entre enero del 2002 y diciembre del 2006.

### D. VARIABLES EN ESTUDIO

Se realizó un análisis de la infección por el VEB (estimada por la presencia o la ausencia de EBERs) en función de las variables: género, edad, clasificación macroscópica (Bormann), localización (cardias, fondo, cuerpo, antro, píloro), clasificación histológica del adenocarcinoma (según la OMS), invasión de la pared, invasión vascular, invasión linfática, ganglios linfáticos involucrados y metástasis a otros órganos.

### E. Recolección de datos

#### i. Muestras biológicas

Para la realización de este estudio se utilizaron 2 láminas histológicas, una lámina se empleó para la prueba de hibridación *in situ* de EBER1/2, y la otra para la tinción de *H. pylori*.

#### ii. Diagnóstico histológico

De la base de datos del proyecto global, se obtuvo la información correspondiente a las variables en estudio: género, edad, clasificación macroscópica (Borrman), localización del tumor en el estómago (cardias, fondo, cuerpo, antro, píloro), clasificación histológica del adenocarcinoma (según la OMS), invasión de la pared, invasión vascular, invasión linfática, ganglios linfáticos involucrados, metástasis a otros órganos. Esta toma de datos la realizó la Dra. Yolanda Roa Martínez, patóloga especializada del HCG. Se realizó una recodificación del tipo histológico del adenocarcinoma para poder utilizar la clasificación de Lauren, ya que no se ha utilizado en el país en ningún estudio. Los tipos papilar bien diferenciado, tubular bien diferenciado, medianamente diferenciado y

pobremente diferenciado se clasificaron como de tipo intestinal, el anillo en sello se clasifica como tipo difuso, y los restantes son clasificados como otros y los múltiples.

### iii. Análisis de laboratorio

#### 1. Tratamiento de la cristalería

Para realizar la hibridación *in situ* para el ARN EBER del VEB, fue necesario darle un tratamiento especial a todo el equipo y cristalería que se utilizó en el proceso para asegurar la eliminación de las ARNasas y que no impidan la detección de ARNs, de manera que se dejó la cristalería en agua con DEPC al 0,1% una noche a 37 ° C y luego se realizó un proceso de autoclavado.

#### A. 2. Hibridación *in situ*

Se realizó la hibridación *in situ* a cada una de las muestras para detectar la presencia del VEB. Se utilizaron sondas PNA (peptide nucleic acid) EBERs específicas conjugadas con fluoresceína (protocolo según las instrucciones del fabricante, DAKO).

El proceso consta de seis partes: rehidratación, pretratamiento, hibridación, post-hibridación, detección de la sonda y coloración o tinción.

Se procede a detallar el protocolo utilizado:

#### 2.1. Rehidratación

1. Se desparafinaron las láminas por inmersión en xileno fresco durante 5 minutos. Se hizo el procedimiento dos veces.
2. Se procedió con el proceso de hidratación para lo cual se sumergieron las láminas en alcohol 99%, 2 veces por 3 minutos cada una.
3. Se continuó el proceso sumergiendo las láminas en alcohol al 96%, 2 veces por 3 minutos cada una.
4. Se dejaron secar al aire.

5. Se marcó el entorno de la muestra con Dakopen.
6. Se procedió a lavar la muestra con agua estéril 2 veces por 3 minutos cada una.

## 2.2. Pretratamiento

1. Se procedió a introducir las láminas en una cámara húmeda con guantes limpios, para evitar la contaminación de la muestra.
2. Se preparó la solución de proteinasa K en TBS, para ello se utilizaron puntas estériles libre de ARNasas.
3. Se adicionó 150 µl de la solución de proteinasa K a cada lámina.
4. Posteriormente se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Se procedió a lavar cada muestra con agua estéril 2 veces por 3 minutos.
6. Se sumergieron éstas en alcohol al 96% por 10 segundos.
7. Finalmente, se dejaron secar al aire dentro de la cámara húmeda por 5 minutos.

## 2.3. Hibridación

1. Se pusieron 2 gotas (50 µl por muestra) de la sonda PNA (peptide nucleic acid) EBERs específica conjugada con fluoresceína
2. Se colocó un cubreobjeto limpio a cada lámina
3. Se introdujeron en la cámara húmeda
4. Se realizó una incubación a 55 °C por 2 horas.

## 2.4. Post-hibridación

1. Posteriormente se procedió a sumergir las láminas en la solución de lavado e incubaron a 55 °C por 25 minutos, durante este proceso la solución debe estar en constante agitación.
2. Se sumergieron las láminas en TBS a temperatura ambiente por 10 segundos.

### 2.5. Detección de la sonda

1. Se introdujeron las láminas en la cámara húmeda y se adicionó 2 gotas de Anti-FITC/AP a cada lámina.
2. Se incubaron por 30 min a temperatura ambiente.
3. Se introdujeron las láminas en TBS, 2 veces durante 3 minutos
4. Se realizaron 2 lavados durante 1 minuto en agua pura.
5. Posteriormente, se colocaron las láminas en la cámara húmeda.
6. Se adicionaron 2 gotas del sustrato a cada lámina.
7. Seguidamente, se incubaron las láminas por 1 hora a temperatura ambiente.
8. Una vez finalizado el proceso se lavaron las láminas en agua corriente por 5 minutos.

### 2.6. Coloración

1. Se procedió a teñir las láminas con hematoxilina por 3 minutos.
2. Se lavaron 2 veces con agua para obtener una coloración azul, y se dejaron secar al aire antes de montar con Glycergel ® Mounting Medium (DAKO)

### 2.7. Diagnóstico microscópico

Se examinaron las láminas en un microscopio óptico para poder determinar cuáles son VEB+ y cuales VEB-. La muestra se consideró positiva para el VEB cuando la señal de hibridación se vio en el núcleo de las células epiteliales cancerosas. Para ello se observó una tonalidad azul oscura e intensa en los núcleos celulares. Como testigo positivo se usaron cortes de tumores de nasofaringe positivos para el VEB por hibridación *in situ* de EBERs. Los controles positivos fueron donados por la Dra. Irène Joab de la Unidad UMR1014 Inserm-Universidad de Paris 11: Regulación de la supervivencia celular y de transplantes, del Hospital Paul Brousse, en Villejuif, Francia.

Para verificar que la señal de hibridación con la sonda EBER correspondía a un sitio neoplásico, éstas fueron vistas por la anatomopatóloga Dra. Roa, quién a su vez determinó el porcentaje de positividad en el tejido canceroso. Para ello se han establecido

cuatro categorías de infección de 0%,  $\leq 30\%$ , 30-70%,  $>70\%$ , de acuerdo a la rutina trabajada en el equipo de investigación dirigido por la Dra. Irène Joab de la Unidad UMR1014 Inserm-Universidad de Paris 11: Regulación de la supervivencia celular y de transplantes, del Hospital Paul Brousse, en Villejuif, Francia.

### 3. Tinción de *H. pylori*

Para detectar la presencia de *H. pylori*, cada lámina se sometió al protocolo siguiente:

1. Se procedió a desparafinar las muestras con xileno y luego a hidratación con agua destilada.
2. Se sumergieron en eosina por 2 minutos.
3. Se les quitó el exceso de colorante.
4. Se sumergieron en Hemacolor 3 (filtrado con anterioridad), por tres minutos.
5. Se enjuagaron rápidamente en agua destilada, dos veces, un segundo cada una.
6. Se enjuagaron con ácido acético al 0,25%, dos veces, un segundo cada una.
7. Se lavaron rápidamente en agua destilada, dos veces, por un segundo.
8. Se deshidrató el tejido, dos veces, por un segundo en alcohol de 70% y por dos segundos en alcohol al 100%.
9. Se limpiaron con xileno y se cubrieron con un cubreobjetos.

Se cultivó *H. pylori*, se fijó y tiñó para utilizarlo como control positivo. Finalmente las láminas se vieron al microscopio óptico y se determinó la presencia de *H. pylori*.

### F. Análisis de datos

Los resultados del estudio fueron registrados en un archivo compatible con software STATA 8.0 (Stata Corporation, College Station, Texas, USA).

La asociación entre la infección con el VEB y las variables en estudio se determinó por la prueba exacta de Fisher con un nivel de confianza del 95%.

Inicialmente se pretendió estimar mediante una regresión logística la razón de momios y sus intervalos de confianza al 95% entre la presencia del VEB y las variables en estudio; sin embargo, luego de probar la colinearidad entre las variables en estudio mediante un cálculo de correlaciones parciales (evaluadas mediante la prueba t de Student con un nivel de confianza del 95 %) y debido al número de casos positivos de CG-VEB+ bajo, no fue posible realizar el análisis de regresión logística.

i. Confidencialidad de los datos

Con cada muestra de tejido se incluyeron las características clínicas, patológicas, así como el sexo y edad de cada paciente, los cuales utilizaron el código asignado por el hospital, para mantener el anonimato de cada uno de ellos. Esta base de datos es exclusiva para este proyecto, su respectivo artículo científico, y la realización de este trabajo de graduación. Este archivo se encuentra ubicado en una computadora de uso exclusivo de la investigadora principal del proyecto, la cual está en la oficina de la misma, bajo llave. Dicha oficina se encuentra en las instalaciones del INISA, UCR. Además, la computadora requiere de una clave de acceso que solo tiene la investigadora principal.

Se mantendrá la confidencialidad de los datos; así mismo la información estará en custodia durante los años establecidos por ley.

## **VI. Alcances y limitaciones de los resultados**

Por ser este, un estudio descriptivo y al establecerse la prevalencia del VEB en el adenocarcinoma gástrico, se puede clasificar como un factor etiológico de la enfermedad. Junto con factores de riesgo ya asociados (*H. pylori*, factores genéticos, dieta y otros) se puede comprender mejor el proceso epidemiológico, patológico y de patogénesis de la carcinogénesis gástrica.

Las limitaciones de este estudio se encuentran en el número de casos positivos para el VEB que implica la imposibilidad de extrapolar los datos a todo el país, ya que los casos no son una muestra representativa de la población, son únicamente una muestra de casos dados entre cierto tiempo en el HCG.

## Resultados

### Descripción de la población

Este estudio se realizó con muestras de tejido de 195 pacientes de adenocarcinoma gástrico, correspondientes a 121 hombres y 74 mujeres, quienes presentaron una edad promedio de  $65 \pm 13.3$  años y  $66.2 \pm 14.2$  años respectivamente. La edad no difiere estadísticamente entre ambos sexos ( $p = 0.124$ ).

### Presencia de *H. pylori* y VEB

La presencia de *H. pylori* se estableció mediante la tinción de Wright; todos los especímenes analizados resultaron negativos.

La presencia del VEB en las células cancerosas se determinó mediante la verificación por hibridación *in situ* de la expresión de EBERs; resultaron positivas 12 de las 195 muestras (6,15%). En todos los casos positivos la tinción se localizó exclusivamente en los núcleos de las células cancerosas; no se observó expresión de EBERs en células epiteliales no tumorales ni en linfocitos peritumorales (Fig 6).

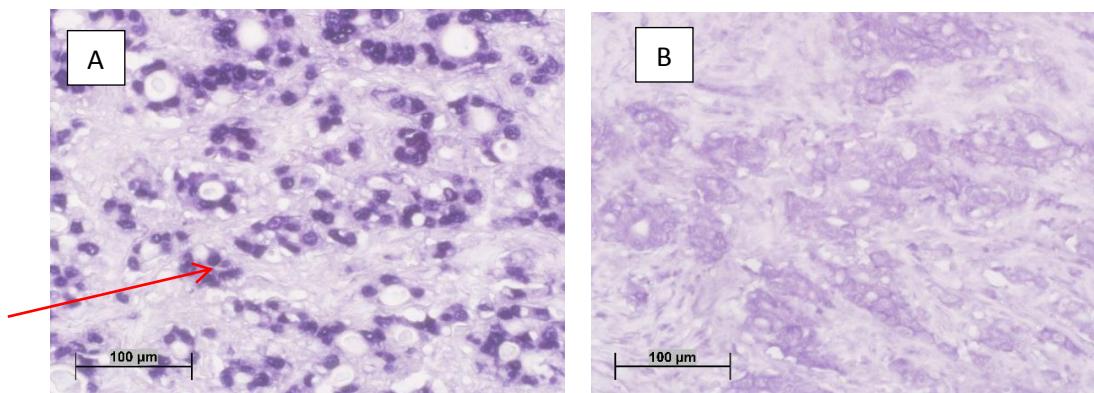


Fig 6. Hibridación *in situ* para EBERs: A. Se observa la tinción de EBERs (señalada por la flecha roja) en los núcleos de las células tumorales de un adenocarcinoma gástrico, que revela la presencia del VEB (40X). Porcentaje de positividad del VEB:  $> 70\%$ . B. Adenocarcinoma gástrico sin expresión de EBERs, que indica la ausencia del VEB (40X). Porcentaje de positividad del VEB:  $0\%$



Al comparar los casos positivos para VEB (CG-VEB+) con los CG negativos para el VEB (CG-VEB-) (cuadro 6), se observó que con relación al sexo existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p= 0.005$ ), ya que todos los CG-VEB+ corresponden a hombres, con edades entre los 28-84 años para un promedio de edad de  $60.4\pm 14.2$ . Se recodificó la edad según los percentiles 25, 50 y 75; el rango que posee el mayor número de casos positivos fue entre los 57 y 67 años (entre el percentil 25 y el 50). Si se comparan las edades de los hombres CG-VEB+ vs los CG-VEB-, no existe diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p=0.819$ ).

### **Características clínico-patológicas de la población en estudio**

Un 75% (9/12) de los CG-VEB+ fue sometido a una gastrectomía subtotal, 25% (3/12) a una gastrectomía total.

Un 58.3% (7/12) de los tumores CG-VEB+ se localizaron en el cuerpo de estómago, 16.7% (2/12) en el cardias, 8.3% (1/12) en el cuerpo-antro, 8.3% (1/12) en el píloro y en 8.3% (1/12) no se pudo determinar la localización del tumor.

Según la clasificación de la OMS, estos tumores CG-VEB+ corresponden al tipo tubular, con diferentes grados de diferenciación; la mitad de ellos son tumores medianamente diferenciados; un 41.7% (5/12) son tumores pobremente diferenciados y un 8.3% (1/12) es un tumor tubular bien diferenciado. Se recodificaron los CG según la clasificación de Lauren y el 100% de los CG-VEB+ corresponde al tipo intestinal.

De acuerdo a la clasificación de Borrmann del cáncer gástrico avanzado, 11 de los 12 casos CG-VEB+ corresponden a un Borrmann 3, clasificado como un tumor ulcerado-infiltrante; y el restante es de tipo Borrmann 4, clasificado como infiltrante difuso.

En los CG-VEB+ 83.3% (10/12) presentan un compromiso en los estratos de la serosa, que sobrepasa la serosa o que infiltra a otros órganos. Sólo uno de estos presenta invasión vascular y 66.7% (8/10) presenta invasión linfática; con diferentes grados de

compromiso ganglionar. Los CG-VEB+ de las dos personas más jóvenes presentan metástasis a otros órganos [hígado (28 años) y glándula suprarrenal (49 años)] (Cuadro 5).

Cuadro 5. Casos positivos para la hibridación *in situ* del Virus Epstein Barr.

Nº	Edad	Gastrectomía	Localización	Clasificación histológica	Clasificación macroscópica	Metástasis a otros órganos	Invasión pared	Invasión vascular	Invasión linfática	Ganglios linfáticos positivos	Porcentaje de positividad del VEB
178	28	Subtotal	Cuerpo	Pobrementemente diferenciado	Borrmann III	hígado	Sobrepasa la serosa	No	No	7-15	30-70%
2	49	Subtotal	Cardias	Pobrementemente diferenciado	Borrmann III	Glándulas suprarrenales	Infiltra otros órganos	No	Sí	1-6	ND
171	50	Subtotal	Píloro	Tubular bien diferenciado	Borrmann III	No	Serosa	Sí	Sí	ND	≥70%
186	58	Subtotal	Cuerpo	Pobrementemente diferenciado	Borrmann III	No	Muscular propia	No	Sí	0	≥70%
56	59	Total	ND	Medianamente diferenciado	Borrmann VI	No	Muscular propia	No	Sí	ND	≥70%
100	59	Subtotal	Cuerpo	Pobrementemente diferenciado	Borrmann III	No	Serosa	No	No	7-15	≥70%
135	60	Subtotal	Cuerpo, Antro	Medianamente diferenciado	Borrmann III	No	Serosa	No	No	7-15	≥70%
155	67	Total	Cardias	Medianamente diferenciado	Borrmann III	No	Sobrepasa la serosa	No	No	1-6	10-30%
37	68	Subtotal	Cuerpo	Medianamente diferenciado	Borrmann III	No	Sobrepasa la serosa	No	Sí	+15	70%
63	70	Subtotal	Cuerpo	Medianamente diferenciado	Borrmann III	No	Sobrepasa la serosa	No	Sí	1-6	ND
122	73	Subtotal	Cuerpo	Medianamente diferenciado	Borrmann III	No	Sobrepasa la serosa	No	Sí	1-6	30-70%
118	84	Total	Cuerpo	Pobrementemente diferenciado	Borrmann III	No	Sobrepasa la serosa	No	Sí	1-6	ND

ND: No determinado

### **Relación entre la presencia del Virus de Epstein Barr y las variables en estudio**

Un 60.21% (112/186) de los cánceres gástricos se localizan en el cuerpo y antro del estómago. La mayoría de los tumores de CG-VEB- se localizaron en el antro [43.1% (75/174)] mientras que los tumores CG-VEB+ (58.3, 7/12) tienen una localización predominante en el cuerpo del estómago (cuadro 6). Según la localización del tumor ambos grupos (CG-VEB- vs CG-VEB+) presentan una distribución diferente ( $p=0.009$ ).

En cuanto a la clasificación de Borrmann para el cáncer avanzado, la mayoría de los cánceres (independientemente de la presencia del VEB) se presentan como Borrmann III (91.7% CG-VEB+ vs 60.2% CG-VEB-), clasificado como ulcerado-infiltrante. Sin embargo, en el caso de los CG-VEB- también se encontró un porcentaje moderado de cánceres de tipo Borrmann II (21.6%) y Borrmann VI (13.8%); aunque la distribución entre los grupos no es estadísticamente significativa ( $p=0.155$ ).

En todos los CG se presenta un compromiso en los estratos de la serosa, que sobrepasa la serosa o que infiltra a otros órganos, la distribución entre los CG-VEB+ y los CG-VEB- es similar ( $p=0.496$ ). La misma situación se presenta con la invasión vascular ( $p=0.135$ ) o con la invasión linfática ( $p=0.804$ ) donde en el grupo CG-VEB- el porcentaje que presenta estas condiciones es de 28.1% y 74.6%, respectivamente.

Los CG-VEB+ presentan un porcentaje mayor de casos en el ámbito de 1-6 ganglios linfáticos metastásicos en comparación con los CG-VEB-, sin embargo, no existe una diferencia estadísticamente significativa en la distribución para ambos grupos ( $p=0.599$ ), así como para el porcentaje de metástasis (cuadro 6).

El cálculo de correlaciones parciales demostró colinearidad entre la mayoría de las variables histológicas en estudio, además el número de casos positivos de CG-VEB+ fue bajo, por tal razón, no fue posible realizar un análisis de regresión logística.

Cuadro 6. Características clínico-patológicas del adenocarcinoma gástrico de la población en estudio

	VEB+		VEB-		P
	12 casos		183 casos		
	n	%	n	%	
<b>Sexo</b>					
Masculino	12	100	109	59.6	0.005
Femenino	0	0	74	40.4	
<b>Edad</b>					
≤56	3	25	46	25.1	0.481
≥57≤67	5	41.7	47	25.7	
≥68≤75	3	25	43	23.5	
≥76	1	8.3	47	25.7	
<b>Clasificación macroscópica</b>					
Bormann I	0	0	8	4.4	0.155
Bormann II	0	0	40	21.6	
Bormann III	11	91.7	109	60.2	
Bormann IV	1	8.3	25	13.8	

**Ganglios linfáticos positivos**

0	1	0	47	25.7	0.599
1 a 6	5	41.7	76	41.5	
7 a 15	3	25	31	16.9	
más de 15	1	8.3	18	9.8	

**Metástasis**

Positivo	2	16.7	25	13.6	0.698
Negativo	9	75	154	84.1	

**Clasificación histológica**

Papilar bien diferenciado	0	0	14	7.6	0.464
Tubular bien diferenciado	1	8.3	37	20.2	
Medianamente diferenciado	6	50.0	63	34.4	
Pobrementemente diferenciado	5	41.7	38	20.8	
Mucinoso	0	0	9	4.9	
Células en anillo de sellos	0	0	13	7.1	
Otros tipos	0	0	2	1.1	
Múltiple	0	0	6	3.3	
SD	0	0	1	0.6	

**Localización del tumor**

Cardias	2	16.7	17	9.8	0.009
Fondo	0	0	3	1.7	
Cuerpo	7	58.3	30	17.2	
Antro	0	0	75	43.1	
Cuerpo-antro	1	8.3	10	5.8	
Píloro	1	8.3	13	7.5	
Múltiples	0	0	25	14.4	
SD*	1	8.3	1	0.6	

**Clasificación Tipo Lauren**

Intestinal	12	100	152	83.0	0.670
Difuso	0	0	13	7.1	
Mixto	0	0	6	3.3	
Otros	0	0	11	6.0	
SD	0	0	1	0.5	

---

\*Sin determinar

## Discusión

El Virus de Epstein Barr es un herpes-virus humano con actividad oncogénica. Su genoma ha sido detectado en enfermedades de origen celular tanto epitelial como de tipo linfoide. A partir de 1990 el VEB fue detectado en carcinomas gástricos, concluyendo que son proliferaciones monoclonales de una célula persistentemente infectada con el virus (Izasa 2012). La demostración de la monoclonidad del genoma del VEB en casos de CG indica que la infección viral precede a la expansión neoplásica (Corvalán 2005). El CG-VEB+ está presente en alrededor del 10% de los carcinomas gástricos a nivel mundial (Camargo *et al.* 2012) y se estima que más de 80 000 pacientes desarrollan esta enfermedad positiva para el virus anualmente (Hausen *et al.* 2004, Chen *et al.* 2012). Por eso es importante estudiar la prevalencia del VEB en este tipo de neoplasia. En Costa Rica, según Globocan (2012), el CG ocupa el tercer lugar en incidencia (17,3 por cada 100 000 habitantes) y mortalidad (12,0 por cada 100 000 habitantes) para ambos sexos, luego de cáncer de próstata y mama. La incidencia de CG en Costa Rica es extremadamente heterogéneo y puede diferir de un cantón a otro (Montero *et al.* 2014). La prevalencia en el mundo del VEB es de 90%, no hay estadística por sexo a nivel mundial.

El presente estudio, mostró una prevalencia de la infección de 6.15% en la población estudiada. Este resultado concuerda con los datos reportados en la literatura, a saber; el metanálisis realizado por Camargo *et al.* (2011), donde obtuvo una prevalencia para el CG-VEB+ de 7.7%, un estudio realizado en Corea, donde la prevalencia fue de 7,3% (Kim *et al.* 2010) y con un estudio que se realizó en Estados Unidos, donde se obtuvo una prevalencia de 5.1% (Truong *et al.* 2009).

El CG positivo para el VEB, presenta diferencias en su prevalencia dependiendo del área geográfica. Así se observa en el metanálisis de Camargo *et al.* 2011, donde el CG-VEB+ fue significativamente más alto para estudios realizados en América (prevalencia del CG-VEB +: 4,3-16,8%) en comparación con países asiáticos (prevalencia del CG-



VEB+: 3,3-9,1%). Esto se observa en varios estudios, como por ejemplo, en un estudio realizado por Abdirad *et al.* (2007), en Irán, donde la prevalencia del CG-VEB+, se encuentra entre las más bajas a nivel mundial, un 3%, similar a lo que ocurre en otros países asiáticos (Corea 3%, Japón 6%, China 6%) donde la prevalencia del CG-VEB+ también resultó ser baja. En un estudio realizado en México (Herrera-Goepfer *et al.* 2005), la prevalencia obtenida fue de 7.3%; situación similar a la que se da en otras áreas en el mismo continente (Brasil 11.3%, Colombia 13%, Chile 16.8%). Si se comparan ambos continentes se pueden observar prevalencias más altas en los países americanos que en los países asiáticos.

Varios estudios han encontrado una relación inversa entre la incidencia de CG y la prevalencia de CG-VEB+; es decir, que en países con una baja prevalencia de CG-VEB+, como por ejemplo los asiáticos, se observa una alta tasa de incidencia de CG (Takada 2000, Nishikawa *et al.* 2014). Según Globocan (2012) las incidencias de los países asiáticos mencionados con anterioridad son elevadas, Corea 41.8, Japón 29.9, China 22.7, Irán 15.2. Los países americanos, donde la prevalencia de CG-VEB+ es más alta, tienen incidencias de la neoplasia intermedias (México 7.9, Brasil 9,2); con excepción de Colombia y Chile que son altas (Colombia 13.4 y Chile 15.6) {Globocan 2012}. Esto se puede deber a la ubicación geográfica donde se realizó cada uno de los estudio, como se mencionó anteriormente, en un mismo país puede variar la prevalencia de CG-VEB+ en las diferentes regiones. En el caso de Costa Rica, la prevalencia para CG-VEB+ resulta baja (6,15%) y la incidencia de CG es alta, 17,3, siendo la segunda tasa de incidencia más alta en el continente luego de Guatemala, con una incidencia de 23.7; cumpliéndose la relación inversa mencionada.

Herrera-Goepfer *et al.* (2005) también realizó una comparación entre grupos con diferentes orígenes ancestrales encontrando que los mexicanos con orígenes norteamericanos, presentaban una prevalencia de CG-VEB+ entre 10.2% y 12%. En Hawaii, donde hay una gran cantidad de descendientes de japoneses y la incidencia de este tipo de neoplasia es baja, la prevalencia de CG-VEB+ es de 10.2%. Al encontrar que la

prevalencia del CG-VEB+ es alta, no baja como era de esperarse por el origen ancestral, estos datos indican que además de los orígenes étnicos y genéticos, los factores ambientales están implicados en el desarrollo de CG-VEB+. Según varios estudios mencionados por Koriyama *et al.* 2005, los factores ambientales, tales como, estilo de vida, dieta e infección con *H.pylori*, tienen participación en el desarrollo del CG-VEB+. Por ejemplo, en Hawaii, se determinó que la incidencia de esta neoplasia es de 10%, resultando intermedia entre los japoneses (7%) y los estadounidenses (16%), ambas líneas ancestrales, sugiriendo que la frecuencia de los casos de carcinomas positivos para el VEB se puede ver afectada por el ambiente. En otro ejemplo, en Brasil, también se analizó una población brasileña con ancestros japoneses y otra población sin influencia japonesa. En la primera población la incidencia de CG-VEB+ fue de 5%, levemente menor a la de la otra población de estudio, con un 6%. El hecho que en este estudio si existieran incidencias similares, diferente en el caso de Hawaii, puede también atribuirse a factores ambientales, específicamente estilo de vida, ya que los inmigrantes japoneses en São Paulo, tienden a mantener sus hábitos alimenticios nativos.

Al analizar las características clínicas y patológicas, se obtuvo en este estudio una asociación significativa entre el CG-VEB+ y el sexo masculino. Varios estudios realizados también han obtenido un número mayor de casos de carcinomas gástricos asociados al VEB en hombres que en mujeres (Carrascal 1999, Herrera-Goespert *et al.* 2005, Chen *et al.* 2010, Lee *et al.* 2009, Lopes *et al.* 2004, Truong *et al.* 2009). Si bien es cierto que en este estudio no se evaluó el estilo de vida de las personas (no se contaba con esa información y no era el objeto del estudio), varios autores consideran (Ju-han Lee *et al.* 2009, Van Beek *et al.* 2004, Camargo *et al.* 2011a, Koriyama *et al.* 2005) que el número mayor de CG-VEB+ en hombres que en mujeres se puede atribuir a los estilos de vida entre otros (factores ocupacionales, hormonales, genéticos). Por ejemplo, en un estudio realizado en Corea (Kim *et al.* 2012), se observó que los hombres que no desayunaban, los cuales tienen una dieta de baja calidad, están significativamente más relacionados con los casos de CG-VEB+ que los que no presentan el virus. En el caso de Abdirad *et al.* (2007), se indica que

aunque en su estudio realizado en Irán la mayoría de los CG-VEB+ se presentó en hombres, el bajo número de casos positivos (9/237, prevalencia=3.8) influyó en el análisis, evitando la relación estadísticamente significativa entre ambos factores. Camargo *et al.* (2014), analizó casos de CG positivos y negativos para el VEB y su asociación con el estilo de vida, en este caso con el alcohol y el tabaco. No obtuvo una interacción significativa de los CG-VEB+ con el alcohol, al contrario, Kim *et al.* (2012), encontró que el consumo de alcohol es estadísticamente más asociado con el CG-VEB- que con los casos positivos para el virus. En relación al tabaco, Camargo *et al.* (2014), encontró que la asociación del fumado con CG es más fuerte para los VEB+ que los VEB-. El 64% de los CG-VEB+ eran fumadores, y la interacción OR entre los VEB+ y los fumadores fue de 2.2 (95% CI 1.6-3.2). Según este artículo es bien conocido que los agentes carcinógenos del tabaco pueden producir daño directamente en la mucosa gástrica; lo cual se evidencia por el hecho de que los extractos del humo del cigarro son capaces de reactivar al VEB en líneas celulares Akata y B95-8. Contrario a esto, en el estudio realizado por Kim *et al.* (2012), no hubo diferencias significativas en cuanto al factor de riesgo de fumado y los casos CG-VEB+ y los CG-VEB-.

En otro estudio realizado en Japón por Koriyama (2005) se mostró, en este caso, que la ingesta de comidas saladas y condimentadas, así como el consumo de bebidas muy calientes presentan una mayor relación con los casos de CG-VEB+ que con los CG-VEB-, aunque solamente la ingesta de sal está relacionada significativamente con los carcinomas positivos para el VEB. Según Guggenheim & Shah (2013), los resultados sugieren que existe un incremento significativo de la incidencia de CG con un consumo mayor a 10 g de sal por día. Según Koriyama *et al.* (2005) la sal daña la mucosa gástrica, produciendo inflamación y degeneración de esta; este daño y los cambios en la membrana estomacal pueden promover los efectos de los carcinógenos de la comida o de otros factores ambientales tales como la infección por el VEB. Además de la sal, observó que los casos positivos para el CG-VEB+ estuvieron más expuestos al polvo de la madera y a las limaduras de hierro, lo que indica que estos pueden provocar daño al epitelio gástrico. Esto

podría estar relacionado con el hecho que el 88% de los casos positivos para el VEB, en su estudio, fueran hombres. Los autores afirman que esto es otra evidencia que sugiere la participación de factores ambientales en el CG-VEB+.

En otro estudio, donde la presencia o ausencia del VEB no fue tomada en cuenta, se evidencia una de las razones por las cuales el adenocarcinoma gástrico es más común en hombres que en mujeres. Así Camargo *et al.* 2011b, mencionan que debido a que la diferencia de la incidencia de CG entre hombres y mujeres no puede ser explicada totalmente por variaciones en características sociodemográficas, factores ambientales o la infección con *H.pylori*; se propone que las hormonas sexuales femeninas pueden tener una función protectora en el desarrollo del CG. En su metanálisis, se identificó una disminución en el riesgo de CG en mujeres con una mayor duración de la fertilidad, la cual está influida por la edad de la menopausia, o exposición a terapia de remplazo hormonal; y un incremento en el riesgo debido a la exposición de agentes antiestrogénicos como el tamoxifen. No obstante no se encontró una asociación significativa, entre el desarrollo de CG y la edad de la menarquia, edad del primer parto o el uso de anticonceptivos orales. Los autores de este estudio apoyan la idea que la exposición a estrógenos disminuye el riesgo de CG en mujeres ya que existen varias evidencias de que los estrógenos pueden evitar el desarrollo de la neoplasia ya que éstos son capaces de interactuar con células gástricas normales, precancerosas y cancerosas, lo que podría regular el crecimiento de expansión clonal de estas células. En este estudio se mencionan varias evidencias que apoyan esta idea, por ejemplo, los estrógenos aumentan la expresión de la familia de genes TFF (“trefoil factors”) los cuales están involucrados en la regeneración de la mucosa gástrica; se ha comprobado además que los estrógenos aumentan la apoptosis en células cancerosas humanas *in vitro*. Además aumentan la fuerza del sistema inmune como respuesta a infecciones bacterianas, bloqueando directamente la expresión de la caspasa-12, también son capaces de retardar la migración celular, polimorfismos en genes relacionados con inactivación de estrógenos están asociados con un aumento del riesgo de CG y como adición a esto, se ha observado que hombres con cáncer de próstata que son

expuestos una terapia con estrógenos exógenos, disminuyen el riesgo de desarrollar esta neoplasia gástrica. Sheh *et al.* (2011), por su parte, realizó un estudio en ratones, donde fueron expuestos a  $17\beta$  estradiol (E2) luego de infectar con *H. pylori* a machos y hembras para inducir una carcinogénesis, después del tratamiento con la hormona, se observó que los machos infectados con la bacteria y que recibieron el tratamiento con E2 no presentaban CG, en cambio el 40% de los machos infectados sin tratamiento desarrollaron la enfermedad. El E2 redujo las lesiones gástricas causadas por la infección con la bacteria. En las hembras también se observó una disminución en la proliferación celular epitelial y se atenuó la gastritis. Al observar estos resultados, proponen una hipótesis de que la hormona posee una función protectora disminuyendo los mediadores proinflamatorios como IL- $1\beta$  y produce un aumento de los mediadores antiinflamatorios como IL-10.

En cuanto a la edad, no hubo una relación estadísticamente significativa con la presencia del VEB. Los CG positivos corresponden a hombres con edades entre los 28-84 años y el intervalo que posee el mayor número de casos positivos fue entre los 57 y 67 años (entre los percentiles 25 y 50). En el estudio de Corvalán *et al.* (2005), en Chile la edad que más presentó casos positivos para el CG-VEB+ fue los 52 años, una edad menor que los casos CG-VEB-. En BenAyed-Guerfali *et al.* (2011), en Túnez, el rango de edades donde se encontraron los casos positivos fue entre 45 y 60 años, el cual obtuvo una asociación significativa con los casos positivos para CG-VEB+. En Herrera-Goepfer *et al.* (2005), la mayoría de casos CG-VEB+ se encontró entre el rango de 50 y 69 años, siendo los 60 años la edad que más presentó diferencias significativas entre los casos CG-VEB+ y CG-VEB-. Estos resultados junto con el obtenido en el presente estudio, difieren con varios otros estudios que indican que existe una tendencia a que el CG-VEB+ ocurra a edades más tempranas (van Beek *et al.* 2004, Abdirad *et al.* 2007, Uozaky & Fukayama 2008). Además se muestra que se está dando una tendencia significativa a la disminución en la prevalencia del VEB, con respecto al aumento de la edad de los hombres. Esta predominancia en hombres jóvenes sugiere la importancia de factores ocupacionales, hormonales y de estilo de vida en la etiología del CG asociado al VEB (Camargo *et al.*

2011). Según Herrera-Goepfer *et al.* (2005), en su estudio no se obtuvo casos de CG-VEB+ en individuos menores a los 50 años, debido a que los cambios en la mucosa gástrica ocurren a edades más avanzadas en la población mexicana. En el presente estudio, de los 12 casos positivos para VEB, todos de tipo intestinal, hubo dos que presentaban edades tempranas, menores de 50 años, uno de 28 años y otro de 49 años. Abdirad *et al.* (2007) menciona que sólo los tipos intestinales de CG-VEB+ muestran una tendencia hacia edades tempranas, estas diferencias se podrían deber a la edad de exposición a factores de riesgo por parte de cada uno de los tipos, intestinal y difuso. El hecho que en nuestro estudio solamente dos de los casos positivos para el virus se presenten edades tempranas, aunque todos sean tumores de tipo intestinal, puede ser un efecto del número pequeño de casos de CG-VEB+ en la población de estudio, para lograr una significancia se necesitaría de un número mayor de casos CG-VEB+.

En este estudio se obtuvo que el 75% (9/12) de los CG-VEB+ fue sometido a una gastrectomía subtotal, el resto a una gastrectomía total. Luego de la gastrectomía parcial para enfermedades benignas, los carcinomas pueden ocurrir en alta frecuencia en el estómago remanente, esto puede darse gracias al reflujo de bilis alcalina y proliferación de células mucosas que estimulan los jugos pancreáticos. La prevalencia del VEB relacionada con carcinomas remanentes es significativamente más alta (27%) que en los no-remanentes (Takada 2010). Según Lee *et al.* (2009) el VEB está asociado a CG remanente más frecuentemente en pacientes con gastrectomía Billroth II, un tipo de gastrectomía subtotal, esto debido a un daño en la mucosa gástrica por reflujo duodenogástrico.

En esta investigación, también se observó una asociación significativa entre la localización del tumor y la presencia o ausencia del VEB ( $p=0.009$ ). Además se encontró que la mayoría de los tumores VEB+ se localizaron en cuerpo (58,3%), luego en cardias (16,7%) y por último en píloro (8,3%). Esto difiere con lo reportado por Herrera-Goepfer *et al.* (2005), donde el mayor porcentaje de casos VEB+ se dieron en el píloro o parte baja del estómago (47,3%), luego en cuerpo o parte media del estómago (38,8%) y por último en cardias o parte superior del estómago (13,3%) y también con lo reportado por Abdirad

*et al.* (2007), donde se dieron los siguientes resultados: píloro o antro (48%), luego cardias (26%) y por último cuerpo (23%). Según los autores de este último estudio, se ha observado un incremento del cáncer tipo cardias. Este tipo de cáncer posee varios factores de riesgo, entre ellos la infección por el VEB. En el estudio realizado en Colombia por Carrascal *et al.* (1999), también se observa que la mayoría de casos positivos para VEB se dieron en la zona del cardias (16,6%) al igual que en Chen *et al.* 2010, donde se observa un 11,5% de los casos son de tipo cardias y un 10,2% está localizado en el cuerpo del estómago. Estos datos pueden sugerir que el cardias y el cuerpo del estómago pueden ser un ambiente más susceptible a la infección del VEB que el antro (Lee *et al.* 2009), ya que están ubicados más cerca de la zona de las células diana más comunes del virus: las células epiteliales orofaríngeas (Kutok & Wang *et al.* 2006). Además esto también se puede explicar por la interacción fisiológica del virus en la saliva y probablemente un daño previo en la mucosa gástrica superior (van Beek *et al.* 2004). Es importante a la hora de comparar estos estudios, mencionar los criterios tomados para clasificar los tumores según su localización, por ejemplo, en Koriyama *et al.* 2005, los porcentajes de acuerdo a la ubicación fueron mayor en la zona media del estómago (42%), luego en el antro (37%) y por último se encontraba la zona del cardias (21%).

Tampoco hubo una relación significativa entre la clasificación tipo Borrmann y el VEB. Este mismo resultado obtuvo Corvalán 2005, donde el Tipo Borrmann III fue el más común de los casos de CG positivos para el virus.

Varios autores han reportado que según la clasificación de Lauren, el CG-VEB+ es predominante en el CG de tipo difuso (De la Riva *et al.* 2004, Herrera-Goepfer *et al.* 2005, Abdirad *et al.* 2007, Lee *et al.* 2009, Chen *et al.* 2010). En el presente estudio, todos los casos de CG positivos para VEB, resultaron ser únicamente del tipo intestinal, con una asociación no significativa con el VEB. Algo similar ocurrió en van Beek *et al.* 2004, donde el 63,4% de los CG-VEB+ fueron del tipo intestinal. Por otro lado, en el estudio de Corvalán *et al.* 2005, los dos tipos histológicos han estado en proporciones similares, indicando que la localización y el tipo histológico serían variables independientes en el CG-

VEB+. Carrascal *et al.* (1999), también presenta una proporción casi similar entre ambos tipos, indicando una leve ventaja para el tipo difuso, presentando para este 53 casos y para el tipo intestinal 46. Según Quiñones *et al.* (2011), los estudios epidemiológicos han demostrado diferencias entre el CG de tipo intestinal y el difuso, afirmando que el primero es más frecuente en varones de edad avanzada y se asocia más con factores de riesgo ambientales, como por ejemplo, el antecedente de exposición a *H. pylori*. Por otro lado, el tipo difuso es más frecuente en mujeres jóvenes y se asocia más a la presencia de mutaciones genéticas que predisponen el desarrollo de la neoplasia. El hecho de que el tipo histológico intestinal se asocie a la localización distal, va de la mano con el punto de que el foco de la metaplasia intestinal, que esta modulado por factores ambientales, en especial por la bacteria, generalmente se inicia en el antro y luego se extiende a la mucosa aledaña. En el estudio que realizaron Quiñones *et al.* (2001) en Perú, obtuvieron que el tipo difuso se puede presentar a cualquier edad y que la media de edad es mayor que el tipo intestinal. Es importante mencionar que en nuestro país no hay estudios que utilicen la clasificación de Lauren, por lo que se debió crear la variable a partir de la clasificación histológica de la OMS. Por ello, la recodificación que se llevó a cabo, pudo influir en los resultados obtenidos.

En cuanto a la infección con *H. pylori*, ninguna muestra, tanto VEB+ como VEB- dieron positivo para la tinción de la bacteria. Una característica importante en el CG-VEB+ es que es predominante en la parte proximal del estómago (van Beek *et al.* 2004, Fukayama 2010). En cambio la infección con *H. pylori* está fuertemente relacionada con la gastritis atrófica y cáncer en el antro (Akiba *et al.* 2008, Rosal *et al.* 2014). La localización de los tumores del CG-VEB+ en la parte proximal del estómago puede reflejar la interacción fisiológica con la infección por el virus en la saliva y probablemente el daño posterior al epitelio gástrico superior (van Beek *et al.* 2004). Según Camargo *et al.* 2011, el hecho que los dos patógenos contrasten en la localización, sugiere un posible antagonismo entre ambos agentes infecciosos. En el estudio realizado por Rosal *et al.* 2014, donde se analizaba la presencia del VEB y la bacteria en casos de CG, no se observó una asociación estadísticamente significativa entre los dos patógenos. En cuanto a la bacteria, los autores



indican que quizás la técnica utilizada (test de ureasa y para los casos negativos se aseguró realizando PCR) pudo subestimar la presencia de esta, esto es importante tomarlo en cuenta en el presente estudio, ya que la técnica utilizada aquí tiene sus limitaciones; ya que se trata de una tinción de tejido parafinado tumoral. Lo ideal es que para este estudio se hubiera realizado inmunohistoquímica y haber contado con muestras que permitieran hacer un cultivo, PCR, o bien, una prueba serológica que hicieran posible detectar de mejor manera la bacteria. Otro factor a tomar en cuenta a la hora de detectar la presencia de la bacteria, es que se debe tener conocimiento si el paciente en algún momento tomó el tratamiento indicado para erradicar a *H. pylori*. Aun así, Rosal *et al.* 2014, indica que la erradicación de la bacteria no permite una disminución significativa en la incidencia de CG, ya que la erradicación pudo haber ocurrido luego de desarrollados los cambios que guían los procesos de la carcinogénesis gástrica. Estos autores también mencionan que el estrés inflamatorio que ocurre durante la transformación de las células gástricas puede permitir la infiltración de linfocitos que transportan al VEB. Además, se ha comprobado que los productos reactivados por la infección por la bacteria, son el gatillo para iniciar la reactivación del VEB en células epiteliales gástricas infectadas latentemente; según Minoura-Etoh *et al.* (2006) la infección gástrica asociada a *H.pylori* induce la producción del agente oxidante  $\text{NH}_2\text{Cl}$ , derivado de la infiltración de neutrófilos, esto convierte la infección latente del VEB a una infección con activación de genes tempranos, lo que induce a la infección lítica del virus

En varios estudios (Lee *et al.* 2009, Lee *et al.* 2012), se indica, al igual que este, que no hay asociación entre el CG-VEB+ y la metástasis a ganglios linfáticos. El CG asociado al VEB muestra una baja tasa de invasión a ganglios linfáticos, especialmente durante las etapas tempranas (Lee *et al.* 2012, Song *et al.* 2010) y además posee un diagnóstico relativamente favorable comparado con los CG que son negativos para VEB (Uozaky & Fukayama 2008, Fukayama 2010). Esto se puede deber a que esa condición permite al paciente tener menos enfermedades residuales (van Beek *et al.* 2004). Sin embargo, en el CG positivo para VEB, la frecuencia de estadios tempranos no es

estadísticamente diferente a los carcinomas de profunda invasión o carcinomas tardíos (Fukayama 2010).

En los CG-VEB+, se observó que más del 80% presentan invasión en la capa serosa o que infiltra a otros órganos. En Carrascal *et al.* 1999 también se presentan casos positivos con invasión a la capa serosa (6/10). Por otro lado, en el estudio de Abdirad *et al.* 2007, no hubo diferencia entre los casos positivos y negativos para el VEB, en relación con la invasión de la capa serosa y muscular propia, igual los autores mencionan que en el caso de la capa submucosa el número de casos es muy bajo (solamente 2), y ninguno fue positivo para el VEB. En Corvalán *et al.* 2005 no se observó diferencia significativa entre la invasión de la pared gástrica y los casos positivos y negativos para el VEB. Lee *et al.* 2009, tampoco obtuvo una relación significativa entre el CG-VEB+ y la profundidad de invasión. Además los autores mencionan que existe una contradicción en varios estudios en cuanto a este factor, en unos se afirma que el CG-VEB+ posee un avanzado estado de invasión, mientras que otros autores indican que este tipo de carcinoma está limitado a la capa submucosa. Por otro lado, según van Beek *et al.* 2004, el CG positivo para el virus está relacionado con una baja tasa de metástasis a ganglios linfáticos y mencionan que otros estudios más bien afirman que no existe ninguna relación entre ellos dos. Según Corvalán *et al.* (2005) el *C-erbB2* es un oncogén que codifica para receptores de factores de crecimiento y está activado por amplificación génica, esta amplificación es considerada el factor pronóstico molecular más importante en CG, ya que se relaciona con la invasión a la capa serosa e invasión linfática, la cual en el presente estudio fue de 66,7% (8/10); mas no hay estudios que analicen el rol de este gen en el CG-VEB+, por lo que sería importante tomarlo en cuenta para futuros estudios. Por otro lado, no se ha encontrado algún estudio en el cual se tome en cuenta la invasión a nódulos linfáticos, la invasión vascular y el compromiso ganglionar que se presenta.

Las variaciones observadas entre los resultados obtenidos en este estudio y otros en comparación, pueden ser explicadas por la contribución de los factores de riesgo locales en

la patogénesis del VEB y también por el tamaño y características de la cohorte (BenAyed-Guerfali *et al.* 2001).

### **Conclusiones y recomendaciones**

En el presente estudio se logró determinar la prevalencia del VEB en casos de muestras parafinadas de archivo de adenocarcinoma gástrico provenientes del Hospital Calderón Guardia.

1. La prevalencia de la infección por el VEB encontrada es similar a la que se reporta en la literatura para países con una alta tasa de incidencia de CG.
2. Se observó que el CG-VEB+ está significativamente asociado el sexo masculino al igual que en varios artículos citados, donde se afirma que esto se debe a diferentes factores como estilo de vida, presencia de patógenos y factores genéticos.
3. No hubo una asociación estadísticamente significativa entre el CG-VEB+ y la presencia de *H. pylori*. Esto sucede en la bibliografía utilizada, donde se afirma que ambos patógenos son antagonistas en cuanto a la localización en el estómago. Además los productos de la inflamación de la bacteria pueden activar la infección latente por el VEB.
4. De las características clínicos-patológicas en estudio, los CG-VEB+ corresponden a CG con una ubicación en el cuerpo del estómago, en contraste con los CG-VEB- con una ubicación en el antro, al igual que en la literatura, lo que podría indicar junto con el antagonismo con la presencia de *H. pylori*, una etiología diferente en ambos tipos de cáncer.
5. Ninguna de las otras características clínicos-patológicas en estudio está relacionada con la presencia viral ni influye en el comportamiento del tumor.

Al realizar esta tesis, surgieron diferentes aspectos que podrían ser mejorados para obtener resultados más óptimos, por ello se recomienda para futuros estudios:

- Aumentar el tamaño de la muestra
- Realizar inmunohistoquímica para detectar a *H. pylori* en las muestras de tejido parafinado
- Tener acceso a diferentes tipos de muestras que permitan hacer PCR, cultivo, serología, etc. para la detección de *H. pylori*.
- Tomar en cuenta el estilo de vida de los pacientes (alimentación, fumado, consumo de alcohol, etc.).
- Tomar en cuenta para próximos estudios factores genéticos que según la literatura presentan una asociación con el CG-VEB+, y que además pueden influir en la carcinogénesis gástrica, como por ejemplo *p53*, *C-erbB2* u otros genes, tanto virales como no virales que participan en el desarrollo del CG.

## **Bibliografía**

Abdirad, A., Ghaderi-Sohi, G., Shuyama, K., Koriyama, C., Nadimi-Barforoosh, H., Emami, S., Mosavi-Jarrahi, A., A. Nahvijou & S. Akiba. (2007). Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: a report from Iran in the last four decades. *Diagnostic Pathology*. 2, 25

Akiba S., Koriyama, C., R. Herrera-Goepfert & Y. Eizuru. (2008). Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: Epidemiological and clinicopathological features. Review Article. *Cancer Sci*. 99, 195–201.

Anónimo 1998. PAHO : Organización Panamericana de la Salud. La Salud en las Américas. Washington, D.C., OPS Publicación Científica N°569 (consultado el 1 de marzo del 2012, <http://www.paho.org/spanish/HIA1998/CostaRica.pdf> )

Anónimo 2012a: El blog neuroanatomico. (consultado el 8 de marzo de 2012, <http://www-drmimeneuroanatomia.blogspot.com/2010/10/irrigacion-supramesocolica-estomago-y.html>)

Anónimo 2012b: Manual de patología quirúrgica. (Consultado el 1 de mayo de 2012, [http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/PatolQuir/PatolQuir\\_033.html](http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/PatolQuir/PatolQuir_033.html))

Anónimo 2014: Manual de normas para el tratamiento de cáncer en Costa Rica (consultado el 20 de mayo de 2015, [https://www.imprentanacional.go.cr/editorialdigital/libros/textos%20juridicos/manual\\_cont\\_ra\\_el\\_cancer\\_edincr.puf](https://www.imprentanacional.go.cr/editorialdigital/libros/textos%20juridicos/manual_cont_ra_el_cancer_edincr.puf)).

Anónimo 2015. Cancer Incidence and Mortality Worldwide. Media Centre – IARC News (consultado el 1 de marzo del 2015, <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>)

Anwar M., Koriyama, C., Naveed, I., Hamid, S., Ahmad, M., Itoh, T., Minakami, Y., Y. Eizuru, & S. Akiba. (2005). Epstein-Barr virus detection in tumors of upper gastrointestinal tract. An *in situ* hybridization study in Pakistan. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 24, 379–85.

Babcock G. & D. Thorley-Lawson. (2000). Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein–Barr virus, express the restricted pattern of latent genes previously found only in Epstein–Barr virus-associated tumors. *PNAS*. 97, 12250–12255

Bell T.M., Massie A., M.G.R. Ross & M. C. Williams. (1964). Isolation of a Reovirus from a Case of Burkitt's Lymphoma. *Br Med J*. 1, 1212–1213

BenAyed-Guerfali, D., Ayadi, W., Miladi-Abdennadher, I., Khabir, A., Sellami-Boudawara, T., A. Gargouri & R. Mokdad-Gargouri. (2011). Characteristics of Epstein Barr virus variants associated with gastric carcinoma in Southern Tunisia. *Virology Journal*. 8, 1-9.

Blanco-Delgado, C.A., Rivera, P., Hernández, F., Hevia, F., Guillén, F., Durán, S. (2001). Prevalencia de *Helicobacter pylori* en pacientes atendidos en el Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica. *Revista Biomédica*. 12,1-4.

Carrascal, E., Tokunaga, M., Akiba, S., Eizuru, Y., Fujiyama, C., R. Shinkura & Y. Harada. (1999). Adenocarcinoma gástrico asociado con el virus de Epstein-Barr en Cali. *Colombia Médica*. 30, 127-131.

Camargo, M., Murphy, G., Koriyama, C., Pfeiffer R., Kim W., Herrera-Goepfert R., Corvalan, A., Carrascal, E., Abdirad, A., Anwar, M., Hao, Z., Kattoor, J., Yoshiwara-Wakabayash, E., Eizuru, Y., C. Rabkin & S. Akiba. (2011). Determinants of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis. *British Journal of Cancer*. 105, 38 – 43.

Camargo, M., Y. Goto & J. Zabaleta. (2011). Risk: A Meta-Analysis Sex Hormones, Hormonal Interventions, and Gastric Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 21, 20

Camargo, M., Kim, W., Chiaravalli, A., Kim, K., Corvalan, A., Matsuo, K., Yu, J., Sung, J., Herrera-Goepfert, R., Meneses-Gonzalez, F., Kijima, Y., Natsugoe, S., Ngoan, L., Chow, W., Lissowska, J., Kim, S., Koriyama, S., Akiba, S., Gonzalez, C., P. Taylor & C. Rabkin. (2012). Epstein - Barr virus Positivity as a Prognostic Indicator in Gastric Cancer: an International Pooled Analysis. *Gastroenterology Supplement* 1142, S-635

Camargo, M., Koriyama, C., Matsuo, K., Kim, W., Herrera-Goepfert, R., Liao, L., Yu, J., Carrasquilla, G., Sung, J., Alvarado-Cabrero, I., Lissowska, J., Meneses-Gonzalez, F., Yatabe, Y., Ding, T., Hu, N., Taylor, P., Morgan, D., Gulley, M., Torres, J., S. Akiba & S. Rabkin. (2014). Case–case comparison of smoking and alcohol risk associations with Epstein–Barr virus-positive gastric cancer *International Journal of Cancer*. 134, 948–953.

Chapel, F., Fabiani, B., Davi, F., Raphael, M., Tepper, M., G. Champult, & C. Guettier. (2000). Epstein-Barr virus and gastric carcinoma in Western patients: comparison of pathological parameters and p53 expression in EBV-positive and negative tumours. *Histopathology*. 36, 252–61

- Chen, Ch., D. Li<sup>1</sup> & N. Guo. (2009). Regulation of cellular and viral protein expression by the Epstein-Barr virus transcriptional regulator Zta. *Cancer Biology & Therapy*. 8, 987-995.
- Chen, J.N., Ding, Y., Feng, Z., Li, H., He, D., Du, H., B. Wu & C. Shao. (2010). Association of Distinctive Epstein-Barr Virus Variants with Gastric Carcinoma in Guangzhou, Southern China. *Journal of Medical Virology* 82, 658-667.
- Chen, J., Dan, H., T. Fang & S. Chun-kui. (2012). Epstein-Barr Virus-associated Gastric Carcinoma: A Newly Defined Entity *Journal of Clinical Gastroenterology*. 46, 262-271
- Choy, E.Y, Siu, K.L., Kok, K.H., Lung, R.W., Tang, C.M., To, K.F., Kwong, D.L., S.W. Tsao & D.Y Jin. (2008). An Epstein-Barr virus – encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J. Exp. Med.* 205, 2551-2560.
- Correa, P., Haenszel, W., Cuello, C., S. Tannenbaum & M. Archer. (1975). A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet*. 2,58-60
- Corvalán, A., Koriyama, C., Akiba, S., Eizuru, Y., Backhouse, C., Palma, M., J. A. Na & M. Tokunaga. (2001). Epstein-Barr virus in gastric carcinoma is associated with location in the cardia and with a diffuse histology: a study in one area of Chile. *Int. J. Cancer*. 94, 527-30.
- Corvalán, A., Akiba, S., Valenzuela, M., Cumsille, M., Koriyama, C., Argandoña, J., Backhouse, C., Bal, M., Mena, F., M. Palma & Y. Eizuru. (2005). Características clínico-moleculares del cáncer gástrico cardial asociado al virus Epstein Barr. *Rev Méd Chile*. 133, 753-760
- Crawford D.H. (2001). Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *The Royal Society*. 356, 461-473.
- Crew, K.D., & A.I. Neugut. (2006). Epidemiology of gastric cancer-review. *World J Gastroentero*. 12, 354-362.
- Dalldorf, G. & F. Bergamini. (1964). Unidentified, filtrable agents isolated from african children with malignant lymphomas. *Proc Natl Acad Sci*. 51, 263-265.
- Dalton-Griffin, L. & P. Kellam. (2009). Infectious causes of cancer and their detection. *Journal of Biology*. 8, 67.
- De la Riva, S., M. Muñoz-Navas & J. J. Sola. (2004). Gastric carcinogénesis. *Rev. Esp. Enferm. Dig*. 96, 265-276.

- Espejo, H., & J. Navarrete. (2003). Clasificación de los Adenocarcinomas de estómago. *REV. GASTROENTEROL. PERÚ.* 23, 199- 212.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, DM. D. Forman & F. Bray. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* 136, 359–386.
- Fernández, P. (1995). Tipos de estudios clínico epidemiológicos. Universidad de Alicante. 25-47.
- Fukayama, M. (2010). Review Article: Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Pathology International.* 60, 337–350.
- Griffin, B.E. (2000). Epstein–Barr virus (EBV) and human disease: facts, opinions and problems. *Mutation Research.* 462, 395-405.
- Guggenheim, D., & M. Shah. (2013). Gastric Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Reviews Journal of Surgical Oncology.* 107,230–236.
- Harn, H. J., Chang, J.Y., Wang, M.W., Ho, L.I., Lee, H.S., J.H. Chiang & W.H. Lee. (1995). Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma in Taiwan. *Hum Pathol.* 26, 267-71.
- Hausen, A., van Rees, B.P., van Beek, J., Craanen, M.E., Bloemena, E., Offerhaus, G.J.A., C.J.L.M. Meijer & A.J.C van den Brule. (2004). Epstein-Barr virus in gastric carcinomas and gastric stump carcinomas: a late event in gastric carcinogenesis. *J Clin Pathol.* 57, 487–491.
- Hayashi, K., Chen, W.G., Chen, Y.Y., Murakami, I., Chen, H.L., Ohara, N., Nose, S., Hamaya, K., Matsui, S., Bacchi, M.M., Bacchi, C.E., K. L. Chang & L. M. Weiss. (1998). Deletion of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene in Japanese and Brazilian gastric carcinomas, metastatic lesions, and reactive lymphocytes. *Am. J. Pathol.* 152, 191–8.
- Herrera-Goepfert, R., Akiba, S., Koriyama, C., Ding, S., Reyes, E., Itoh, T., Y. Minakami & Y. Eizuru. (2005). Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: Evidence of age-dependence among a Mexican population. *World J. Gastroenterology.* 11, 6096-6103.
- Houghton, J. & T.C. Wang. (2005). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: a new paradigm for inflammation-associated epithelial cancers. *Gastroenterology.* 128, 1567–1578.



- Hsu, J.L., & S. L. Glaser. (2000). Epstein–Barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. *Critical Reviews in Oncology: Hematology*. 34, 27–53.
- Imai, S., Koizumi, S., Sugiura, M., Tokunagat, M., Uemurat, Y., Yamamotot, N., Tanakat, S., E. Sato & T. Osato. (1994). Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein - Barr virus latent infection protein. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*. 91, 9131-9135.
- Iizasa, H., Nanbo, A., Nishikawa, J., M. Jinushi & H. Yoshiyama. (2012). Epstein-Barr Virus (EBV)-associated Gastric Carcinoma. *Review. Viruses*. 4, 3420-3439.
- Iwata, S., Wada, K., Tobita, S., Gotoh, K., Ito, Y. Demachi-Okamura, A., Shimizu, N., Y. Nishiyama & H. Kimura. (2010). Quantitative analysis of Epstein–Barr virus (EBV) - related gene expression in patients with chronic active EBV infection *Journal of General Virology*. 91, 42–50.
- Karim, N & G. Pallesen. (2003). Epstein-Barr virus (EBV) and gastric carcinoma in Malaysian patients. *Malays. J. Pathol*. 25, 45–7.
- Kim, R.H., Chang, M.S., Kim J.H., Song, K.S., Kim, Y.S., B.Y Choi & W.H. Kim. (2010). Medical History and Lifestyle Factors Contributing to Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma and Conventional Gastric Carcinoma in Korea. *Anticancer Research*. 30, 2469-2476.
- Klinkea, O., R. Feederlea & H.J. Deleclusea. (2014). Genetics of Epstein–Barr virus microRNAs. *Review. Seminars in Cancer Biology*. 26, 52–59
- Koriyama, C., Akiba, S., Y. Minakami & Y. Eizuru. (2005) Environmental factors related to Epstein–Barr virus–associated gastric cancer in Japan. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 24,547–553.
- Kutok, J.L, & F. Wang. (2006). Spectrum of Epstein-Barr virus-associated Diseases. *Rev. Pathol. Mech. Dis*. 1, 375-404.
- Labrecque, L., Barnes, D.M., I. S. Fentiman & B. E. Griffin. (1995). Epstein - Barr virus in Epithelial Cell Tumors: A Breast Cancer. *Cancer Research*. 55, 39-45.
- Lee, J.H., Kim, S.H., Han, S.H., an, J.S., E.S. Lee & Y.S. Kim. (2009). Clinicopathological and molecular characteristics of Epstein–Barr virus-associated gastric carcinoma: A meta-analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 24, 354–3.

- Lee, H., Kim, D., Lee, S., Lee, K., Jun, D., Lee, O., Han, D., Yoon, B., Choi, H., J. Hahm & K. Jang. (2012). Treatment of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma with endoscopic submucosal dissection. *GASTROINTESTINAL ENDOSCOPY*. 76, 913-915.
- Lopes, L.F., Bacchi, M.M., Elgui-de-Oliveira, D., Zanati, S.G., M. Alvarenga & C.E. Bacchi. (2004). Epstein-Barr virus infection and gastric carcinoma in São Paulo State, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 37, 1707-1712.
- Luo, B., Wang, Y., Wang, X., Liang, H., Yan, L., B. Huang & P. Zhao. (2005). Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinomas. *World J. Gastroenterol.* 11, 629-633
- Mena, F. (2002). Las bases moleculares del cáncer gástrico (la mejor forma de vencer a un enemigo, es conociéndolo). *Acta méd. Costarric.* 44, 53-54.
- Middeldorp, J.M., Brink, A.A.T.P., A.J.C. Van den Brule & C.J.L.M. Meijer. (2003). Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated Proliferative disorders. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 45, 1-36
- Miranda, M., Chaves, M., San Román, M., Durán, S., G. Vargas & E. Jiménez.(1998). La relación de *Helicobacter pylori* con la displasia y el cáncer gástrico en Costa Rica. *Revista de Biología Tropical.* 46, 829-32.
- Montero, C. V., S.A. Hernández & S.J. Camacho. (2014). Culture and Molecular Identification of *Helicobacter pylori* in Drinking Water from Areas of High and Low Incidence of Gastric Cancer in Costa Rica. *Open Journal of Medical Microbiology.* 4, 261-269
- Nishikawa, J., Yoshiyama, H., Iizasa, H., Kanehiro, Y., Nakamura, M., Nishimura, J., Saito, M., Okamoto, T., Sakai, K., Suehiro, Y., Yamasaki, T., Oga, A., H. Yanai & I. Sakaida. (2014). Epstein - Barr virus in Gastric Carcinoma Cancers. 6, 2259-2274.
- Portela, V., Pereira, M.A., André, A.R., Pitombeira, M.V., M.A. Pessoa & S.H. Barem. (2008). *H pylori* (Cag A) and Epstein - Barr virus infection in gastric carcinomas: correlation with p53 mutation and c-myc, bcl-2 and Bax expression. *World J Gastroenterol.* 14, 884-891
- Quiñones, J., M. Portanova & A. Yabar. (2011). Relación entre Tipo Histológico y la Localización del Adenocarcinoma Gástrico en el Hospital Rebagliati. *Rev. Gastroenterol. Perú.* 31, 139-145

- Qiu, K., Tomita, Y., Hashimoto, M., Ohsawa, M., Kawano, K., D.M. Wu & K. Aozasa. (1997). Epstein-Barr virus in gastric carcinoma in Suzhou, China and Osaka, Japan: association with clinico-pathologic factors and HLA-subtype. *Int. J. Cancer*. 71, 155–8.
- Rosal Teixeira de Souza, C., Soares de Oliveira K., Sodré Ferraz J., Ferreira Leal M., Queiroz Calcagno M., Damasceno Seabra A., Salim Khayat A., Carvalho Montenegro R., Negreiros Nunes Alves A., Pimentel Assump o P., Cardoso Smith M. & R. Rodríguez Burbano. (2014). Occurrence of Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus infection in endoscopic and gastric cancer patients from Northern Brazil. *BMC Gastroenterology*. 14, 179.
- Shin, W.S., Kang, M.W., Kang, J.H., Choi, M.K., Ahn, B.M., Kim, J.K., H.S. Sun & K.W. Min. (1996). Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinomas among Koreans. *Am. J. Clin. Pathol.* 105, 174–81.
- Sheh, A., Ge, Z., Parry, N., Muthupalani, S., Rager, J., Raczynski, A., Mobley, M., McCabe, A., Fry, R., T. Wang & J. Fox. (2011). 17 $\beta$ -Estradiol and Tamoxifen Prevent Gastric Cancer by Modulating Leukocyte Recruitment and Oncogenic Pathways in Helicobacter Pylori–Infected INS-GAS Male Mice. *Cancer Prev Res*. 4, 1426-1435.
- Sierra, R., M. n oz, N., Peña, A.S., Biemond, I., W. van Duijn & C.B. Lamers. (1992). Antibodies to Helicobacter pylori and pepsinogen levels in children from Costa Rica: comparison of two areas with different risks for stomach cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1, 449-54.
- Sierra, R. (2002). Cáncer gástrico, epidemiolog a y prevención. *Acta m d. Costarric*. 44, 55-61.
- Smith, M.G, Hold, G.L., E. Tahara & E.M. El-Omar. (2006). Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 12, 2979-2990.
- Song, H., Srivastava, A., Lee, J., Kim, Y., Kim, K., Kang, W., Kim, M., Kim, S., C. Park & S. Kim. (2010). Host Inflammatory Response Predicts Survival of Patients with Epstein-Barr Virus–Associated Gastric Carcinoma *GASTROENTEROLOGY*. 139, 84–92.
- Takada, K. (2000). Epstein Barr virus and gastric cancer. *Clin Pathol: Mol Pathol*. 53, 255-261.
- Thorley-Lawson, D.A. & A. Gross. (2004). Persistence of the Epstein–Barr Virus and the Origins of Associated Lymphomas. *The New England Journal of Medicine*. 350, 1328-37.
- Tokunaga, M., Land, Ch.E., Uemura, Y., Tokudome, T., S. Tanaka & E. Sato. (1993). Epstein - Barr virus in Gastric Carcinoma. *American journal of Pathology*. 143, 5.

Truong, C.D., Feng, W., Li, W., Khoury, T., Li, Q., Alrawi, S., Yu, Y., Xie, K., J. Yao & D. Tan D. (2009). Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: A study of 235 cases at a comprehensive cancer center in U.S.A. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 28, 14.

Van Beek, J., zur Hausen, A., Kranenbarg, E., van de Velde, C., Middeldorp, J., van den Brule, A., C. Meijer, & E. Bloemena. (2004). EBV-Positive Gastric Adenocarcinomas: A Distinct Clinicopathologic Entity With a Low Frequency of Lymph Node Involvement. *J Clin Oncol*. 22,664-670.

Vera-Izaguirre, D.S., Chávez-Tapia, N.C., J. Lizardi-Cervera & N. Méndez-Sánchez. (2003). Mononucleosis infecciosa. Artículo de revisión Derechos reservados. Médica Sur Sociedad de Médicos, AC. Copyright ©.

Young, L. S. & A.B. Rickinson. (2004). Epstein–Barr Virus: 40 years on. *Nature Reviews. Cancer*. 4, 757-768.

Young, L.S. & P.G. Murray. (2003). Epstein–Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*. 22, 5108–5121.

Young, L.S., C.W. Dawson & A.G. Eliopoulos. (2000). The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 53,238–247

Young, L.S., J.R. Arrand & P.G. Murray. (2007). EBV gene expression and regulation. *In*. A. Arvin & G. Campadelli-Fiume (Eds.). *Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press. Estados Unidos.

Yuen, ST, Chung, L.P., Leung, S.Y., Luk, I.S., S.Y. Chan & J. Ho. (1994). *In situ* detection of Epstein-Barr virus in gastric and colorectal adenocarcinomas. *Am. J. Surg. Pathol*. 18, 1158–63.