



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA  
(BIOLOGIA)**

**DETECCIÓN DE EPSTEIN-BARR VIRUS EN  
GASTRITIS Y CÁNCER GÁSTRICO**

**T E S I S**

**P R E S E N T A:**

**MARTINEZ LOPEZ JUAN LUIS EDUARDO**

**A S E S O R:**

**Fuentes Pananá Ezequiel Moises**

**MÉXICO, D. F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Detección de Epstein-Barr virus en gastritis y cáncer gástrico

Instituto Mexicano del Seguro Social

J. L. E. Martínez-López, E. M. Fuentes -Pananá  
jle\_martinez@yahoo.com.mx; [empanana@yahoo.com](mailto:empanana@yahoo.com)

**Resumen:** El virus de Epstein-Barr (EBV) o Herpes virus humano 4 (HHV4), ha sido asociado a diversas malignidades, siendo las relaciones con linfomas y cáncer nasofaríngeo, las más aceptadas, sin embargo, si EBV es capaz de participar en procesos que conlleven a la formación de tumores en otros órganos como el estómago, aun no está del todo entendido. Para tratar de brindar evidencias que nos ayuden a explicar la posible relación entre EBV y Cáncer gástrico (CG), en este trabajo se han analizado 24 muestras de CG y 107 de gastritis, una lesión que puede ser considerada como precursora de lesiones malignas en el estómago, mediante PCR (CG) y PCR anidada (gastritis). Los tejidos analizados fueron separados en dos grupos: pacientes adultos y pacientes infantiles. Se encontraron 26.92% de muestras positivas a EBV en gastritis infantil, 7.89% en gastritis de adultos y 8.3% en CG. Este es el primer estudio en nuestro país que analiza muestras de gastritis y exclusivamente adenocarcinomas gástricos, el tipo de CG más común y en el cual se centra el mayor debate sobre la relación EBV-CG. Nuestros resultados, en su conjunto, sugieren un posible papel de EBV en el desarrollo de CG.

# INDICE

<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
EL CÁNCER COMO PROBLEMA DE SALUD .....	4
CÁNCER GÁSTRICO (CG) .....	4
VIRUS DE EPSTEIN BARR (EBV).....	6
EBV Y CÁNCER .....	8
LA RELACIÓN DE EBV-CG .....	10
<b>ANTECEDENTES DIRECTOS.....</b>	<b>11</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS PARTICULARES .....	15
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
LÍNEAS CELULARES.....	15
CULTIVO CELULAR .....	16
SUJETOS DEL ESTUDIO.....	16
BANCO .....	17
EDAD.....	17
GENERO.....	17
DIAGNÓSTICO .....	17
NO. DE MUESTRAS.....	17
TIPO DE BANCO .....	17
TIPO DE MUESTRAS .....	17
CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	18
<i>Inclusión</i> .....	18
<i>Exclusión</i> .....	18
ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE LA MUESTRA .....	19
DETECCIÓN DE SECUENCIAS VIRALES POR PCR PUNTO FINAL.....	20
PCR ANIDADA.....	20
PCR DE GENES ENDÓGENOS.....	21
SECUENCIACIÓN.....	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	22
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR PUNTO FINAL .....	22
ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR ANIDADA .....	24
ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS .....	27
<i>Purificación del ADN y análisis de integridad</i> .....	27
<i>Análisis de muestras de gastritis de adultos</i> .....	29
<i>Análisis de muestras de gastritis de niños</i> .....	29
<i>Análisis de muestras de pacientes con CG</i> .....	31
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	36
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>PERSPECTIVAS A FUTURO .....</b>	<b>42</b>

## Índice de Tablas

Tabla 1 Datos de los bancos analizados .....	17
Tabla 2 Secuencias de los primers usados en las diferentes PCR. ....	21
Tabla 3. Muestras positivas y negativas a EBV .....	34
Tabla 4 Detalles de las muestras positivas .....	35
Tabla 5 Valores de p para grupos analizados con la prueba exacta de Fisher.....	36

## Índice de Figuras

Figura 1. Estandarización de la PCR.....	22
Figura 2. Líneas celulares usadas en el ensayo. ....	23
Figura 3. Límite de detección de la PCR.....	24
Figura 4. Estandarización de la PCR anidada .....	25
Figura 5. Límite de detección de EBV mediante PCR anidada.....	27
Figura 6. Integridad de ADN genómico. ....	28
Figura 7. Integridad del ADN de las muestras .....	28
Figura 8. Muestras de gastritis en adultos positivas a EBV .....	29
Figura 9. Figura representativa de las muestras de gastritis infantil analizadas.....	30
Figura 10. PCR anidado para muestras de gastritis .....	31
Figura 11. PCR para muestras de adenocarcinomas.....	32
Figura 12. El tejido circundante a la lesión es negativo a EBV. ....	32
Figura 13. Muestras positivas confirmadas mediante PCR anidada.. ....	33
Figura 14. Muestras de tejido adyacente, gastritis en adultos y adenocarcinomas analizadas por PCR anidada .....	33
Figura 15. BLAST de una de las muestras secuenciadas .....	34

## Abreviaturas

CG

EBV

## **Introducción**

### ***El cáncer como problema de salud***

En la actualidad, el cáncer es un serio problema de salud a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se coloca como la segunda causa de muerte, sólo por debajo de las enfermedades cardiovasculares y aunque esta aseveración fue en principio, para países industrializados, la misma tendencia se empieza a observar en países en vías de desarrollo. Durante el 2007 se registraron 11.3 millones de casos de cáncer, y un total de 7,9 millones de muertes, esto es el equivalente al 13% de muertes totales mundiales [1]. En aspectos económicos las consecuencias son igualmente adversas. En México se ha calculado que sólo durante el primer año de atención médica, se gastan aproximadamente dos mil millones de pesos en costos directos relacionados a cáncer de seno y gástrico, dos de las neoplasias más comunes [2]. Pese a la situación actual, aún se espera el incremento de la carga económica y la demanda de servicios médicos ya que se pronostica un aumento de 11.3 millones de casos confirmados en el 2007 a 15.5 millones para el 2030, así como el incremento de un 45% de mortalidad, lo equivalente a 11.5 millones de defunciones. Estas consideraciones se hacen tomando en cuenta las pequeñas reducciones en la mortalidad de algunos países con grandes recursos [1].

### ***Cáncer gástrico (CG)***

Entre las neoplasias con el mayor índice de mortalidad se encuentra el cáncer gástrico (CG), ya que se coloca como la segunda causa de muerte por cáncer en hombres y la tercera en mujeres, con una incidencia de 900 000 casos cada año [3]. Pese a que en un gran número de países ha disminuido la incidencia de CG, para México se ha reportado un incremento de éste en las últimas décadas, pasando de 4.43 a 9 casos por cada 100 000 habitantes [4], En la mayoría de éstos, el diagnóstico se hace cuando el tumor se encuentra en un

estadio avanzado con una expectativa de vida menor a los nueve meses. Sólo una pequeña fracción de casos, de menos del 20%, es detectada en un estadio temprano y la resección de la lesión tiene éxito con una supervivencia de más de 5 años [4].

Dentro de los tumores gástricos, el 90% se clasifican como adenocarcinomas, es decir, neoplasias originadas en epitelio glandular, el 10% restante se dividen entre linfomas, carcinoides y tumores de células del estroma [5].

Los adenocarcinomas gástricos pueden dividirse histológicamente en dos subtipos: intestinal y difuso [6]. En la variante intestinal las células cancerosas se disponen en glándulas, describen estructuras tubulares irregulares, forman varios estratos con estroma reducido y pueden causar metaplasia en la mucosa circundante, este carcinoma presenta tres grados de diferenciación: bien diferenciado, moderado y pobremente diferenciado. En el adenocarcinoma difuso las células no suelen formar glándulas, éstas producen grandes depósitos de *mucus*, si este se queda dentro de la célula tumoral desplaza al núcleo a la periferia, produciendo una apariencia conocida como “célula en anillo de sello”, este tipo de cáncer es no diferenciado. Además, existen adenocarcinomas que comparten características de ambos, estos se denominándose adenocarcinomas “mixtos” [7].

Los adenocarcinomas progresan de diferentes maneras, el tipo intestinal generalmente avanza por diversas lesiones precancerosas que van desde gastritis superficial, gastritis atrófica, metaplasia, displasia hasta finalmente cáncer [8]. En el tipo difuso por el contrario, no se ha encontrado lesiones previas hasta el momento por lo que se piensa que se origina de *ново* [7].

Se han propuesto diversos factores asociados al desarrollo del CG, entre los más aceptados se encuentran: 1) antecedentes familiares de CG, la probabilidad de desarrollar la patología aumenta con la edad hasta un 80% [9, 10], 2) personas con anemia perniciosa tienen un riesgo de 4 – 6 veces mayor de padecer CG que la población general [11, 12], 3) una alimentación alta en sales [11, 13], 4) la ingestión de alcohol y consumo de tabaco [11], así como 5)

la presencia de gastritis atrófica, metaplasia o displasia [12, 14] también son factores de riesgo.

Un factor etiológico importante en el desarrollo de lesiones malignas son las infecciones, pues entre un 20% - 25% de los tipos de cáncer, tiene un origen infeccioso [8, 15-17], como ejemplo se pueden mencionar a los virus de la hepatitis B y C, relacionados a cáncer hepático y el virus del papiloma humano en cáncer de cérvix. En el caso del CG, está bien documentado que la infección por la bacteria *Helicobacter pylori* predispone al desarrollo de la patología [14, 18, 19]. De forma similar, se debate si otro agente infeccioso: el virus de Epstein-Barr (EBV), podría tener alguna relación con el CG, ya que si bien se ha aceptado la participación de EBV en diversos linfomas y cáncer nasofaríngeo, su relación con CG es menos comprendida.

### ***Virus de Epstein Barr (EBV)***

En 1958 Denis Burkitt, un cirujano trabajando en Uganda, describió un nuevo tipo de cáncer que afectaba a los niños de África Ecuatorial, un linfoma no Hodgkin [20] ahora conocido como linfoma de Burkitt; el hecho de que este tipo de linfoma fuese endémico de esta región de África sugería una etiología infecciosa. Para 1964 Anthony Epstein, Yvonne Barr y Geoffrey Achong lograron identificar y aislar partículas de lo que parecía ser un herpesvirus, esto a partir de una línea celular derivada de un espécimen de linfoma de Burkitt [21], poco después Henle Werner y Gertrude [22] confirmaron que se trataba de un virus no descrito anteriormente, al cual se denominó virus de Epstein Barr.

Pese a que el virus fue descubierto en un linfoma, hechos que resultaron igualmente relevantes fue el observar que EBV es el agente causal de la mononucleosis infecciosa [23] y que se encuentra presente en gran proporción en individuos sanos, en un porcentaje de entre 90 - 95% de la población mundial adulta [24, 25]. A partir de este momento se llevaron a cabo un gran número de investigaciones tratando la relación de EBV con otros linfomas y



posteriormente algunos carcinomas, de muchos de estos trabajos se derivan los conocimientos actuales sobre este virus.

Hoy sabemos que EBV es un gamma herpesvirus, también descrito como herpesvirus humano 4 (HHV4), este cuenta con un genoma constituido por ADN de doble cadena con una longitud aproximada de 172 kb [26], al ser miembro de la familia herpesviridae, tiene la característica de establecer una infección latente que perdura durante toda la vida del hospedero, usualmente se contrae durante la niñez resultando en una infección asintomática. Aún así, en países con elevadas medidas sanitarias, algunos individuos permanecen protegidos de la infección temprana [24], estas personas tienden a adquirir el virus durante la adolescencia debido a un mayor contacto social. En estas condiciones el EBV llega a causar una respuesta inmune exacerbada que da lugar al desarrollo de mononucleosis infecciosa en 30-50% de los individuos tardíamente infectados [24].

En personas infectadas las partículas virales son secretadas constantemente en la saliva, transmitiéndose así de forma oral. EBV atraviesa el epitelio de la orofaringe para posteriormente infectar los linfocitos B vírgenes que transitan por la membrana basal del epitelio. Después de penetrar al núcleo de la célula, el genoma viral se circulariza formando un episoma [27], una vez en el núcleo celular EBV provee las señales de supervivencia para los linfocitos B imitando con proteínas virales las señales provistas por CD40 y del BCR, se cree que de esta manera los linfocitos infectados se comportan como células B activadas que entran a reacción de centro germinal y que emergen como células B de memoria. Durante esta vía de diferenciación de linfocito virgen a linfocito B de memoria inducida por la infección, la expresión génica viral se limita a unas cuantas proteínas, las cuales varían dependiendo del estadio y se conocen como tipos de latencia (III, II, I y 0), en la última fase de infección (linfocitos de memoria) se apaga la expresión de todos los genes virales con lo que las células infectadas pueden circular por el sistema linfático y sangre periférica, evadiendo eficientemente al sistema inmune (latencia 0). Se postula que EBV evolucionó con proteínas que imitan señales de diferenciación, proliferación y supervivencia con el fin de incrementar el número de células infectadas y

finalmente residir en un nicho en el cual pueda persistir durante toda la vida del hospedero [28]. Ocasionalmente, EBV entra en la fase lítica liberando más partículas virales, se cree que esto sucede principalmente en la región de la orofaringe [28].

Durante el curso de infección latente o de expresión viral restringida, se dan tres programas diferentes de expresión de genes virales. Al infectar los linfocitos B vírgenes, EBV expresa una serie de proteínas que en su conjunto se ha denominado latencia III, estas son: seis antígenos nucleares: EBNA1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen), EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C y EBNA3L, tres proteínas latentes de membrana: LMP1 (Latent Membrane Protein), LMP2A y LMP2B, dos ARNs no codificantes llamados EBER 1 y 2 (Epstein Barr RNAs) y los transcritos de la región BamHI A llamados BARTs (BamHI A rightward transcripts) que codifica para miRNAs [29], durante la expresión de esta latencia el linfocito B es inducido a proliferar. El virus puede cambiar a la latencia II donde se da la expresión de los genes virales: EBNA1, LMP1, LMP2A, LMP2B, EBER 1, EBER 2 y BARTs. Finalmente, en la latencia I en la cual la expresión de genes se restringe sólo a EBNA 1, EBERs y BARTs aunque también es posible que se apague por completo la expresión viral en la latencia 0 [30].

Cabe mencionar que la expresión génica así como todo el ciclo de EBV se hipotetizan a partir de estudios *in vitro* y tomando como base los patrones de expresión viral observados en los diferentes tipos de linfomas a los que está asociado. Además de que cada estadio pareciera reflejar un equilibrio específico entre el virus y la célula hospedero.

### ***EBV y Cáncer***

EBV fue el primer virus humano en ser relacionado con un cáncer humano debido a su descubrimiento en linfoma de Burkitt, las evidencias que apoyan esta relación son:

- 1) El virus se ha encontrado en alrededor del 96% de casos de linfomas endémicos de África subecuatorial [31].
- 2) Estudios que muestran monoclonalidad viral en células de linfoma de Burkitt [32], lo que sugiere una infección previa a la expansión clonal maligna.
- 3) El estudio de expresión de genes virales en linfoma de Burkitt reveló la expresión de una sola proteína: EBNA 1 [33]; investigaciones posteriores revelaron que los ratones transgénicos para EBNA 1 desarrollaron linfomas indicando la capacidad oncogénica de esta proteína [34].

A los descubrimientos realizados en linfoma de Burkitt se fueron sumando nuevas observaciones que avalaban la capacidad oncogénica de EBV como lo es su habilidad para inmortalizar linfocitos B *in vitro* [35, 36], de los cuales se piensa que *in vivo* se comportan de manera similar a un linfocito B maduro que ha sido activado por antígeno. Estudios posteriores revelaron que esto se debe a que las proteínas virales LMP2A y LMP1 poseen dominios funcionales semejantes a los del receptor para antígeno de células B (BCR) y CD40, respectivamente [24, 28, 36-41].

Continuando con el estudio de proteínas virales se observó que la proteína LMP1 es capaz de transformar fibroblastos de roedores y de inducir un amplio rango de variaciones fenotípicas en células epiteliales y linfocitos B *in vitro*, además de producir tumores en ratones transgénicos [27, 42-44]. Por otro lado LMP2A puede transformar la línea celular de queratinocitos HaCaT [45, 46] e inhibir la apoptosis mediada por TGF- $\beta$ 1 a través de la activación de la vía PI3K/Akt, en la línea celular de cáncer gástrico Hsc-39 [47]. Así como regular de forma positiva a través de la vía NF- $\kappa$ B al gen *survivin*, miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis IAP [48], produciendo resistencia, en células de cáncer de estómago, a apoptosis mediada por privación de suero [49].

En estudios con líneas celulares se observó que la pérdida de EBV de la línea Akata conlleva a la inhibición de la capacidad de estas células para formar colonias en agar, así como incapacidad para producir tumores en ratones inmunodeficientes [50, 51].

Actualmente el virus de Epstein-Barr es considerado como uno de los carcinógenos biológicos más potentes, clasificado por la OMS como un carcinógeno tipo I [36, 41] y se ha relacionado con un mayor número de lesiones malignas como son: el linfoma de Hodgking en linfocitos B, linfoma de células NK/T, carcinomas de lengua y nasofaríngeos [24, 27]. Más recientemente se ha reportado la presencia de EBV en adenocarcinomas de otros órganos principalmente estómago y seno [35, 52-59], sin embargo no está del todo claro cómo los factores del agente infeccioso y/o del hospedero favorecen el desarrollo de la lesión, siendo que sólo un número pequeño de infectados con EBV desarrolla cáncer. Por otro lado, aunque la relación EBV-cáncer en varios linfomas y algunos carcinomas ya es bien aceptada, otros casos aún requieren mayores evidencias.

### ***La relación de EBV-CG***

EBV infecta a los linfocitos B a través del receptor CD21 [44] y en condiciones normales no se ha reportado la presencia de EBV en otro tipo de célula. Incluso, se ha visto que en pacientes incapaces de formar linfocitos B maduros como lo es en la enfermedad llamada agammaglobulinemia ligada a X (XLA) no es posible detectar EBV en sangre periférica ni en saliva, así como anticuerpos contra el virus [24]. Esto indica que los linfocitos B son el blanco primario de la infección y en su ausencia ésta no se da.

Como se mencionó anteriormente el virus se transmite a partir de saliva, su vía de entrada principal es por la orofaringe donde infecta a los linfocitos B que circulan por la membrana basal del epitelio. De la misma manera, linfocitos B ya infectados que circulan por esta región reciben señales aún no caracterizadas que inducen el ciclo lítico viral produciendo partículas infecciosas con la capacidad de transmitirse a otros individuos. Esto dio pie a la búsqueda de EBV en carcinoma nasofaríngeo, encontrándose copias del genoma viral en hasta un 90% de las muestras analizadas [60].

Conociendo el elevado porcentaje de casos de carcinoma nasofaríngeo donde está presente EBV, llamó la atención un tipo de CG denominado “tipo linfoepitelioma” (LEL) que histológicamente es muy similar a carcinomas nasofaríngeos, estos son tumores indiferenciados con una gran cantidad de linfocitos infiltrantes [7]. Dada esta similitud se llevaron a cabo rastreos de EBV en CG LEL [55, 56, 61-65]. Los resultados obtenidos mostraron una incidencia de EBV de entre un 80% - 100% en las muestras analizadas; aún así, el CG LEL es muy raro, por lo que surgió la duda de si otros tipos de CG podrían estar también relacionados a EBV.

## **Antecedentes directos**

En diversos reportes se ha establecido ya la alta incidencia de EBV en CG LEL, entre 80% y 100%, sin embargo este tipo de CG representa alrededor del 4% de todos los CG [66, 67], debido a esto, se inició la búsqueda en adenocarcinomas, CG más frecuentes. Shibata y colaboradores [57] fueron los primeros en reportar la presencia de EBV en estos tumores y a partir de este momento diversos grupos continuaron aportando resultados variables.

La detección de EBV en CG ha sido controversial ya que algunos grupos no han reportado resultados positivos a la búsqueda de EBV [58, 61, 67], mientras que en los estudios donde sí se ha encontrado, se reportan porcentajes de detección variables entre 1% y 19% [68, 69].

Descartando el CG LEL, la menor asociación EBV-CG se ha observado en Reino Unido y la mayor en Estados Unidos, Alemania y Japón [68, 69]. Cabe mencionar que estudios para ciertas áreas son escasos y de pocas muestras por lo que sus resultados han sido considerados no concluyentes. Para algunos países las cifras de asociación propuestas son cada vez mas aceptadas debido a los numerosos artículos publicados por diferentes grupos, como es el caso de

China [70-73], sin embargo en otros casos como el de Brasil los trabajos aun son pocos y muestran resultados muy diferentes [74-76] .

Para Latinoamérica los estudios que han reportado resultados positivos en la búsqueda de EBV han sido heterogéneos, pues van de un 16.8% para Chile [66], 13% para Colombia [77], entre 5% y 11.32% para Brasil [74, 75] hasta un 3.9 % para Perú [78].

En México sólo existen dos trabajos de un mismo grupo donde se ha abordado la búsqueda de EBV asociado a CG. En un primer estudio se llevó a cabo la búsqueda de genomas virales mediante el uso de hibridación *in situ* de los ARNs EBERs y en el segundo se sumaron nuevas muestras y se realizó una asociación de los tumores positivos a EBV con la edad y sexo. Estos trabajos reportan una frecuencia de 7.3%- 8.15% [79, 80].

La gran mayoría de trabajos hasta ahora han centrado sus objetivos en la búsqueda de EBV en células tumorales mediante el rastreo de los ARNs no codificantes conocidos como EBERs, mediante hibridación *In situ* (HIS) [66, 68, 74, 75, 77, 79, 80]. Esta técnica es considerada el estándar de oro para la detección de EBV ya que el número de copias de EBERs por célula es muy alto [81], además, en los programas de expresión de genes virales también conocidos como latencias (I, II y III), siempre se ha observado la expresión de EBERs. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que estos programas o latencias, han sido caracterizados en linfomas pero no en carcinomas, por este motivo la detección en base a transcritos virales podría resultar en falsos negativos si el virus no expresa los EBERs, esto ya se ha reportado en diversos estudios de adenocarcinomas asociados a EBV donde muestras negativas a EBERs en un análisis inicial, posteriormente resultaron positivas a EBV mediante métodos de detección del genoma viral [82-87].

Como ya se mencionó la mayoría de estudios existentes han realizado la búsqueda de EBV con HIS, sin embargo es importante el tomar en cuenta que al menos el CG de tipo intestinal, se lleva a cabo mediante un proceso de múltiples pasos, iniciando en gastritis, para después avanzar a gastritis atrófica,

metaplasia, displasia y finalmente CG. Esta vía de carcinogénesis está bien documentada en la infección por *Helicobacter pylori* [88], ya que la erradicación de esta bacteria en algunos países coincide con una disminución en los casos de adenocarcinomas gástricos, [7] [89]. Para EBV, su papel en algún tipo específico de adenocarcinoma gástrico no está definido y en general se asume que se ha encontrado en ambos tipos.

Aspectos relacionados a la presencia del virus en lesiones gástricas precancerosas se conocen menos aún que en cáncer. La búsqueda de EBV en tipos específicos de adenocarcinoma y lesiones gástricas precancerosas es, por lo tanto, muy importante para conocer más sobre los posibles mecanismos de patogenicidad viral y origen del cáncer en estomago. La búsqueda del virus en lesiones precancerosas como podría ser considerada la gastritis, nos permitirá obtener un mejor entendimiento de los mecanismos de transformación del epitelio gástrico, que nos pueden conducir a estrategias de prevención temprana.

## **Justificación**

El CG es la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo [90] [91]. En nuestro país se ha observado un aumento en el número de casos en los últimos años.

El virus de EBV se ha asociado a varios tipos de linfomas y a carcinomas de lengua y nasofaringe, además de un CG poco común denominado “tipo linfoepitelioma” de histología similar al cáncer nasofaríngeo.

Estudios de detección de EBV en tipos más comunes de CG han sugerido también una asociación, sin embargo la mayoría de estos trabajos ha usado a los transcritos virales EBERs como método de rastreo y se han obtenido resultados variables que permanecen aún controversiales.

En México existen solo dos reportes que evalúan la asociación EBV-CG, por lo que los datos en nuestro país son limitados. Además de esto, al igual que la gran mayoría de los estudios, esta búsqueda se realizó a partir de HIS para EBERs.

En este trabajo se propone la detección de secuencias genómicas de EBV en CG ya que no se conoce el programa de expresión viral en este tipo de cáncer. Se propone además, la búsqueda viral en lesiones pre-cancerosas como lo podrían ser las gastritis. Esto nos permitirá tener un mejor conocimiento del papel de EBV en el desarrollo de CG.

## **Hipótesis**

Debido al conocido potencial oncogénico de EBV, así como a la elevada incidencia de infecciones mundiales y a la alta frecuencia de CG en México, se esperan encontrar casos de CG y gastritis asociados a la infección por este virus. Por otro lado, buscar genoma viral y no transcritos virales, nos dará una idea más fidedigna de la incidencia de este virus en CG en nuestro país.

## **Objetivos**



## ***Objetivo general***

-Detección de EBV gastritis y cáncer gástrico

## ***Objetivos particulares***

-Obtención de las condiciones optimas de una PCR-punto final y la implementación de una PCR anidada de alta sensibilidad para la identificación de secuencias genómicas del virus Epstein-Barr (EBV).

-Detección de EBV en cáncer gástrico

-Detección de EBV en gastritis atrófica

-Detección de EBV en gastritis superficial en adultos

-Detección de EBV en gastritis superficial infantil

## **Materiales y métodos**

### ***Líneas celulares***

Se utilizaron cinco líneas celulares linfoblastoides para la estandarización de la PCR a usar en la detección de secuencias virales, tres de estas líneas están infectadas con EBV (EBV+): Raji, Daudi y B95-8 y dos no infectadas (EBV-): Ramos y BJAB. Todas son líneas derivadas de linfoma de Burkitt a excepción de B95-8 la cual fue aislada originalmente de un paciente con mononucleosis.

### **Cultivo celular**

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI advance adicionado con suero fetal bovino al 4% y Hepes 1x, a 37°C en un ambiente al 5% de CO<sub>2</sub>. De todas ellas se purificó ADN a partir de 5 x 10<sup>6</sup> células mediante el kit Qiamp DNA (Qiagen).

### **Sujetos del estudio**

Se analizaron 254 muestras provenientes de seis bancos de tejido gástrico fresco, congelado o embebido en parafina de pacientes de entre 1 y 83 años.

Se integraron tres grupos de estudio de acuerdo al diagnóstico: 1) cáncer gástrico, 2) gastritis superficial (no atrófica) y 3) gastritis atrófica. De la misma forma se separaron los pacientes de acuerdo a su rango de edad en: infantiles de 1 a 17 años y adultos de 18 a 87 años.

Tejidos adyacentes a tumores gástricos fueron analizados para la búsqueda de secuencias genómicas virales como control sobre la especificidad de la infección en tejido lesionado.

Todos los tejidos fueron divididos de acuerdo a los “bancos” de donde se obtuvieron (Tabla 1), ya que muchos de éstos fueron usados en estudios previos realizados por diferentes grupos, así cada banco está formado por muestras de hospitales diversos. El objetivo principal de los trabajos previos cuyas muestras utilizamos en este estudio, fue la detección de *Helicobacter pylori*, por lo que en dichos trabajos se enlistan criterios de exclusión como el tratamiento con antibióticos e inhibidores de la bomba de protones.

**Tabla 1 Datos de los bancos analizados**

Banco	Edad	Genero		Diagnóstico	No. de muestras (tumor/adyacente)	Tipo de Banco	Tipo de muestras
		H	M				
Hospital de Oncología, Especialidades, y Hospital Gabriel Mancera	23 -86	49	60	Tejido Adyacente a carcinomas gástricos	109	Retrospectivo	Congelada
Hospital de especialidades, Hospital Gabriel Mancera	21 - 83	26	24	Gastritis superficial	49	Retrospectivo	Congelada
				Gastritis atrófica	1		
IMSS Mérida	20 -80	11	20	Gastritis superficial	27	Retrospectivo	Embebida en parafina
				Gastritis atrófica	4		
Hospital de Pediatría	1 -17	5	21	Gastritis superficial	26	Retrospectivo	Congelada
Hospital de Oncología Hospital de Especialidades INCAN	29 -87	11	13	Adenocarcioma tipo difuso.	14/14	Prospectivo	Fresca
				Adenocarcinoma mixto	6/6		
				Adenocarcinoma tipo intestinal.	4/4		

Se indica si el banco fue usado en algún estudio previo (retrospectivo) o si fue analizado por primera vez en este trabajo (prospectivo). En el único banco prospectivo, se obtuvieron muestras de adenocarcinomas y tejido adyacente a éstos, en la descripción de este banco el primer número muestra los adenocarcinomas mientras que el segundo separado por una diagonal (/) denota el número de tejidos adyacentes colectados.

## ***Criterios de selección***

### **Inclusión**

- a) Pacientes atendidos en los hospitales participantes:
  - Centro Médico Nacional siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS):
    - Hospital de especialidades
    - Hospital de oncología
    - Hospital de pediatría
  - Hospital Gabriel Mancera (IMSS). México, D.F.
  - Instituto Nacional de Cáncer (INCAN) (SSA). México, D.F.
  - Centro Médico Nacional Ignacio García Téllez (IMSS). México, Yucatán.
- b) Con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico distal, independientemente de la sub clasificación celular o del tipo histológico al que corresponda.
- c) Que se encuentren en estadios II, III y IV, de acuerdo a la clasificación TNM del Comité Estadounidense Conjunto sobre el Cáncer (AJCC, por sus siglas en inglés).
- d) Con diagnóstico histológico de gastritis no atrófica.
- e) Con diagnóstico histológico de gastritis atrófica.
- f) Muestras de tejido no tumoral/adyacente a la lesión: Incluye pacientes con diagnóstico de CG.

### **Exclusión**

- a) Que hubiesen recibido tratamiento previo en las últimas cuatro semanas, antes de la toma de la muestra, con antibióticos, anti-inflamatorios, inmunosupresores, compuestos de bismuto e inhibidores de la bomba de protones.
- b) Con diagnóstico de enfermedad autoinmune, diabetes mellitus, u otro tipo de cáncer no relacionado con el tumor primario motivo del presente estudio.
- c) Pacientes con úlcera péptica asociada.
- d) Pacientes con antecedentes de úlcera péptica actual.
- e) Pacientes con úlcera gástrica.

- f) Pacientes con várices esofágicas o cualquier otra condición a criterio del endoscopista.
- g) Pacientes con padecimientos mentales incapacitantes.
- h) Que no acepten participar en el estudio.
- i) Muestras biológicas insuficientes o de mala calidad para su procesamiento.

Se detalla la información referente a cada uno de los bancos analizados en la tabla 1.

### ***Análisis histopatológico de la muestra***

De todos los tejidos obtenidos, una muestra fue fijada en formalina y posteriormente embebida en parafina. Se utilizó un corte de este tejido para ser teñido con hematoxilina-eosina para su análisis por un histopatólogo, el cual determinó el tipo y grado de lesión (gastritis superficial, gastritis atrófica, adenocarcinoma y tejido adyacente no tumoral) y la frecuencia y tipo de infiltrado de células del sistema inmune. En el caso de muestras de adenocarcinoma también se calculó la frecuencia de células tumorales y en el estudio se incluyeron únicamente tejidos con un mínimo de 5% de células tumorales para la detección de EBV. Extracción de ácidos nucleicos.

### ***Extracción de ácidos nucleicos***

Las muestras a partir de las cuales se obtuvo ADN eran tejido congelado, embebido en parafina o tejido fresco. La purificación de ADN se realizó mediante el kit Qiamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen) para los tejidos embebidos en parafina y el QIAamp DNA mini kit (Qiagen) para tejido fresco y congelado así como para las líneas celulares. Todo el procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del proveedor. El ADN purificado fue cuantificado mediante el uso de espectrofotómetro NanoDrop 1000 Thermo Fisher Scientific. La integridad del ADN se comprobó mediante la relación 260/280 así como por electroforesis en geles de agarosa al 1.7%, además de la amplificación de los

genes endógenos,  $\beta$ -actina, con un amplicón esperado de 670 pb y  $\beta$ -globina con un amplicón de 186 pb.

### ***Detección de secuencias virales por PCR punto final***

Para el rastreo del genoma viral se utilizaron los primers previamente usados por Labrecque et al. [25] LLW1 y LLW2 que reconocen la región situada entre el nucleótido 505 y el 741 del fragmento BamHIW, parte del gen EBNA-LP. Esta región se encuentra amplificada hasta 11 veces en el genoma de EBV [27] y por lo tanto incrementa la sensibilidad de la detección viral.

Para encontrar las condiciones óptimas de amplificación, se realizaron gradientes de concentración de  $MgCl_2$ , de temperatura de elongación, de concentración de primers y de templado (Fig. 1). La reacción final quedó como a continuación se describe: se agregó ADN equivalente a 17 000 genomas celulares, en una reacción de 50  $\mu$ l con 200nM de cada primer, y una concentración de 2.5 mM de  $MgCl_2$  con una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, una elongación final de 72°C por 7 minutos y 35 ciclos de 94°C 1:30 minutos, 57°C por 45 segundos y 72°C por 1 minuto.

### ***PCR anidada***

Después del análisis inicial se diseñaron un par de primers para la implementación de una PCR anidada, designados LLW-Int 1 y LLW-Int 2 los cuales amplifican un fragmento interno del producto de la primera reacción de un tamaño de 104 pb. Una vez estandarizada esta reacción, se realizaron gradientes de ADN partiendo de la primera reacción, para establecer el límite de detección de esta PCR anidada. Las condiciones finales son las siguientes: se usó como templado 0.05  $\mu$ l de la primera PCR en una reacción final de 50  $\mu$ l con 200nM de cada primer, y una concentración de 2.5 mM de  $MgCl_2$ , con una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, una elongación final de 72°C por 7 minutos y 15 ciclos de 94°C por 20 segundos, 57°C por 20 segundos y 72°C por 30 segundos.

### **PCR de genes endógenos**

Los protocolos y las secuencias de primers para la amplificación del segmento del gen de  $\beta$ -actina fueron tomados de Fuentes-Pananá et al.[92], mientras que los primers y condiciones para la amplificación del fragmento de  $\beta$ -globina fueron provistas por la Dra. Yelda Leal del Centro Médico Nacional Ignacio García Téllez. México, Yucatán. Estas condiciones son las siguientes: 1.5 mM de  $MgCl_2$ , 100ng de cada primer, con una temperatura de desnaturalización inicial de 95°C por 3 minutos, una temperatura de elongación final de 72°C por 2 minutos y 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 54°C por 1 minuto y 72°C por 30 segundos.

Las secuencias de todos los primers se enlistan en la Tabla 2

**Tabla 2 Secuencias de los primers usados en las diferentes PCR.**

Primers	Secuencia Dirección 5` - 3`	Tamaño de amplicon
LLW1 LLW2	CCA TGT AAG CTT GCC TCG AG GCC TTA GAT CTG GCT CTT TG	236 pb
LLW1- int 1 Llw2-int 2	CTT TGT CCA GAT GTC AGG GG GCC TGA GCC TCT ACT TTT GG	104 pb
B-actina 1 B-actina 2	CCTAAG GCC AAC CGT GAA AAG TCTTCA TGG TGC TAG GAG CCA.	670 pb
B-gobina F B-globina R	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC TGGTCT CCT TAA ACC TGT CTTG	181 pb

### **Secuenciación**

Los productos de PCR fueron purificados a partir de geles de agarosa al 1.7% mediante el kit Gen clean, MP Biomedicals de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las muestras purificadas fueron enviadas al instituto de biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para su secuenciación.

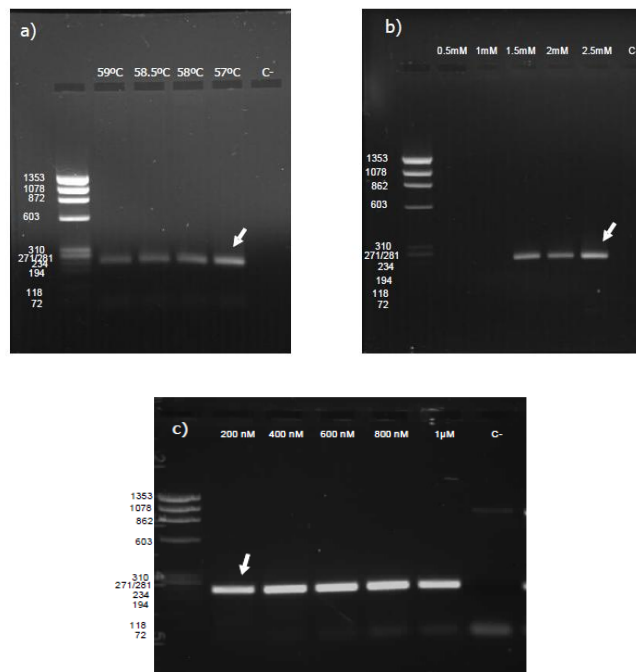
## Análisis estadístico

Para el análisis cuantitativo de los datos se empleó la prueba exacta de Fisher, mediante el uso del software Epi-Info Versión 3.5.3.

## Resultados

### ***Estandarización de la PCR punto final***

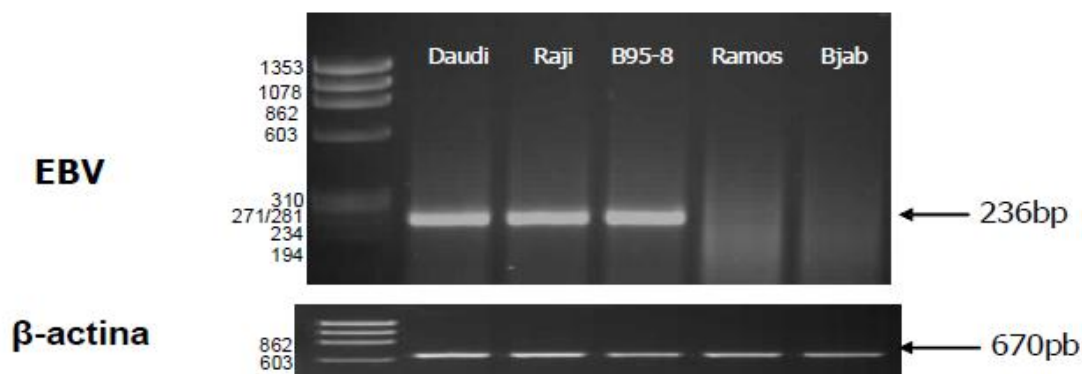
Para la estandarización de la PCR de detección se requiere ADN positivo y negativo a EBV, con esta finalidad, se cultivaron tres líneas celulares infectadas por EBV: Daudi, Raji y B95-8; y dos no infectadas: BJAB y Ramos. De cada línea se cultivaron 50 millones de células, de éstas, se tomaron 5 millones por línea celular y se purificó ADN, obteniéndose entre 21-60 µg de este, dependiendo de la línea. Con el ADN purificado se realizó la estandarización de la PCR, mediante gradientes de temperatura de alineamiento, de concentración de MgCl<sub>2</sub> y de concentración de primers (Fig. 1) De la misma forma, este ADN se usó como control positivo y negativo en las reacciones de detección (Fig. 2)



**Figura 1. Estandarización de la PCR. a) Gradientes de temperatura en °C, b) de concentración de MgCl<sub>2</sub>, y c) de concentración de primers. Las condiciones consideradas óptimas, seleccionadas son señaladas con una flecha. Se usó ADN de diferentes líneas celulares positivas a EBV con resultados**



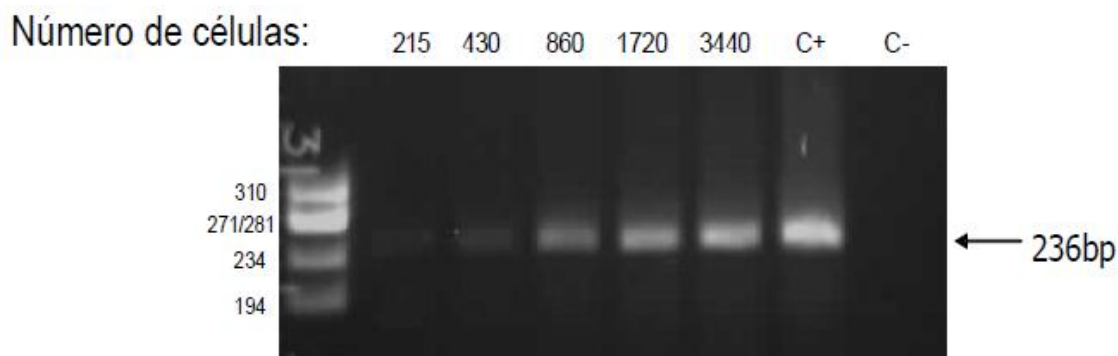
similares. En las imágenes se muestra como ejemplo la línea celular positiva Raji y como control negativo (C-) Ramos.



**Figura 2.** Líneas celulares usadas en el ensayo. Se muestra una electroforesis con los productos de PCR para cada línea con las condiciones consideradas óptimas. Estas líneas fueron usadas como controles. Tres son positivas a EBV (EBV+): Daudi, Raji y B95-8 y dos negativas a EBV (EBV-): Ramos y BJAB. Abajo de cada una de las líneas celulares se muestra los productos de una PCR con un gen endógeno ( $\beta$ -actina) que nos permitió determinar la integridad del ADN.

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas para la PCR se determinó la sensibilidad de la técnica, para lo cual se realizaron gradientes de templado (Fig. 3). Estas curvas se realizaron de dos formas diferentes: 1) realizando diluciones de templado con agua miliQ, o bien 2) manteniendo un número constante de genomas celulares, combinando ADN de líneas celulares positivas y negativas y disminuyendo la cantidad de ADN positivo al virus gradualmente, esta última forma de realizar la curva de detección es lo más cercano a lo que estaría pasando en las muestras, ya que éstas se componen de mezclas de varios tipos celulares. En ambas curvas de detección se observaron resultados similares. La cantidad de templado elegida para cada reacción de diagnóstico fue lo equivalente a 17,000 genomas celulares, sin embargo el límite de detección se estableció en un mínimo de 200 genomas celulares (Fig. 3), así, la reacción nos permite tener una señal positiva en muestras con un 1.2% (200 genomas) de células infectadas (Fig. 3). Considerando que el cáncer es una proliferación monoclonal y que se parte de la idea de que la infección por EBV es uno de los factores detonantes de la transformación, entonces la infección debe ser previa a los eventos de transformación y expansión, por lo que durante la proliferación de las células tumorales cada una llevará copias del genoma viral, resultando en el 100% de

las células tumorales infectadas. De esta forma, la sensibilidad del método usado en este trabajo debería ser la adecuada en la búsqueda de una relación causal virus-cáncer ya que todas las muestras analizadas contaban con un mínimo de 5% de células tumorales.



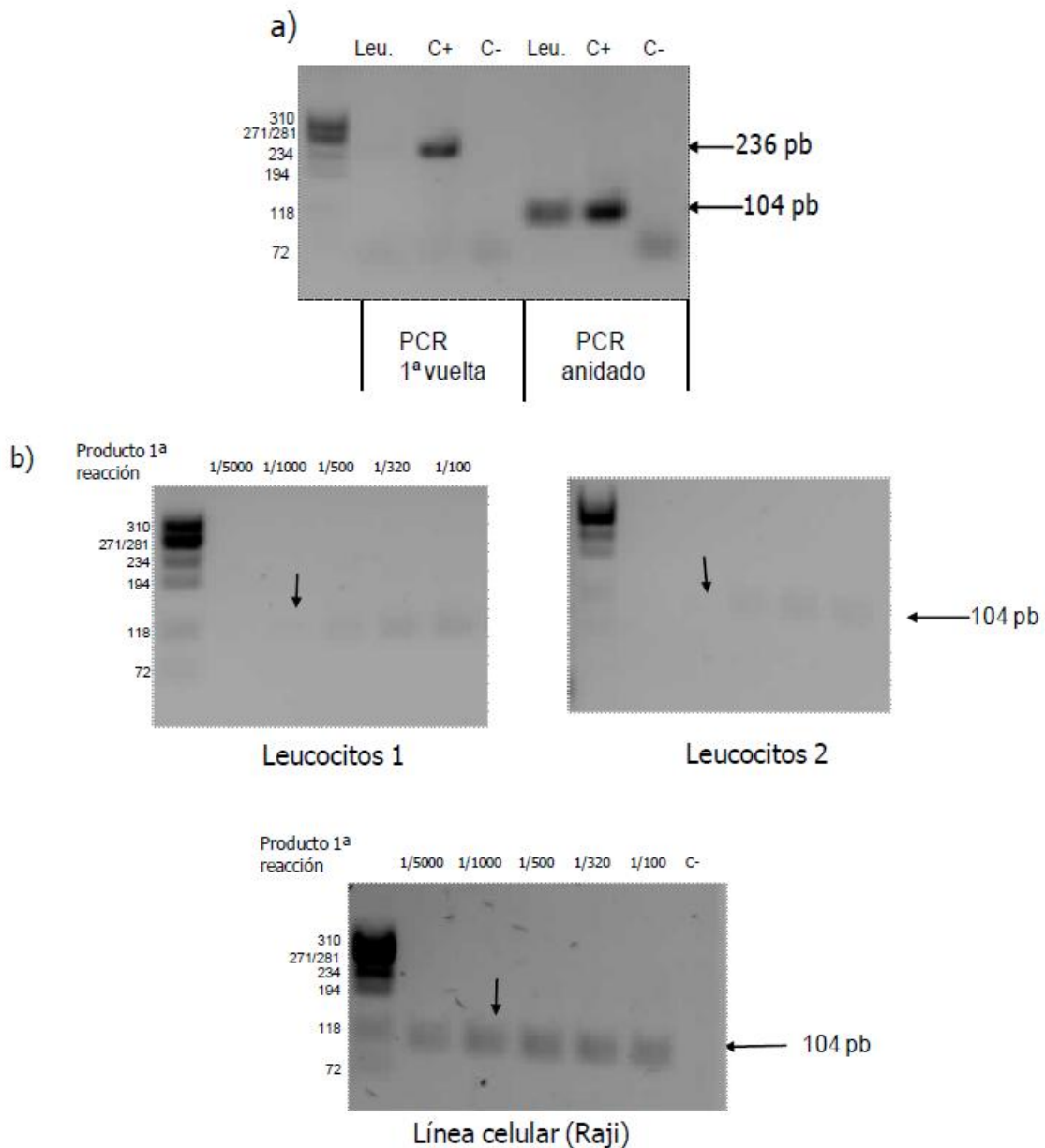
**Figura 3. Límite de detección de la PCR. Se muestra un gradiente de cantidad de ADN expresado en número de células, se puede ver que aún con 215 células es posible ver la banda de interés. Como control positivo (C+) se usó ADN de células Daudi y como control negativo (C-) de Ramos.**

### ***Estandarización de la PCR anidada***

El cáncer es una enfermedad clonal, sin embargo en este estudio se analizaron también muestras de gastritis, una enfermedad donde la clonalidad celular y viral es desconocida, por tal motivo para el análisis de este tipo de lesión se implementó una PCR anidada que nos proporciona una mayor sensibilidad. Este análisis nos permitiría determinar la presencia de células infectadas en lesiones no tumorales no monoclonales. Además la PCR anidada en muestras positivas nos permite tener un control de especificidad de la reacción inicial.

La PCR anidada se estandarizó siguiendo el mismo procedimiento que en la primera reacción. Sin embargo, para ésta se tomó en cuenta la infección asintomática que se da en la mayoría de individuos sanos. EBV es un virus linfotrópico que normalmente reside en linfocitos B de personas infectadas en una proporción de 1 a 10 células por cada millón de linfocitos B. Tomando en cuenta que la PCR anidada es una técnica muy sensible, linfocitos infectados circulando por el tejido gástrico pueden ser la fuente de genoma viral en muestras con infiltrado linfocitario, obteniéndose de esta forma, falsos positivos.

Para conocer la señal de detección originada en linfocitos B infectados en individuos sanos, se realizó una curva de templado con ADN de leucocitos extraídos de individuos sanos en una primera reacción de PCR partiendo de 1 millón de genomas celulares. En este primer PCR no fue posible detectar el amplicón de EBV. Sin embargo al tomar una fracción 1/50 del producto del primer PCR y someterlo a la PCR anidada, se observó una señal positiva en ambos sujetos sanos (Fig. 4).



**Figura 4. Estandarización de la PCR anidada, a) Se muestra una reacción de detección en leucocitos (Leu.) de uno de los individuos sanos donde no es posible observar amplificación en la primera reacción, sino que es necesaria una PCR anidada usando 1 ng del producto de la primera reacción como templado. b) Se realizó un gradiente de templado partiendo de 1/100 de la primera reacción tanto para el ADN de leucocitos de dos donadores sanos (Leucocitos 1 y 2) como para Raji**

**(C+). Se señala con una flecha la cantidad de templado elegida. Dado que todas las muestras se corrieron al mismo tiempo se incluyó sólo un control negativo (C-) Bjab, el cual se muestra en el gradiente de Raji.**

Considerando los resultados anteriores y con el fin de elegir la cantidad de templado a usar en la PCR anidada en muestras clínicas de gastritis, cuyo límite de detección estuviese por encima del grado de infección fisiológicamente normal de linfocitos B, se realizó un gradiente de templado proveniente de la primera PCR en la PCR anidada, partiendo de 1/100 del producto de la primera reacción, este gradiente se aplicó tanto al ADN de leucocitos de individuos sanos, como a la línea celular Raji. Finalmente se eligió un volumen equivalente 1/1000, ya que con esta concentración la amplificación observada en individuos sanos es prácticamente nula, mientras que en las líneas celulares positivas al virus aún puede observarse una banda nítida (Fig. 4). De esta forma se descarta la posibilidad de falsos positivos en las muestras no monoclonales (gastritis) al establecer el límite de detección por arriba del número de células infectadas normalmente en circulación periférica y que pudieran estar infiltrando la lesión.

Una vez elegida la concentración de templado a usar en la PCR anidada, se determinó el límite de detección de ésta. Se tomaron diferentes cantidades de ADN positivo a EBV, partiendo de lo equivalente a 21 genomas celulares. Con esto se realizó la primera reacción de PCR y de los productos de esta se tomaron la cantidad decidida previamente (1/1000) para la realización de la PCR anidada (Fig. 5). Así fue posible comprobar que este análisis nos permite detectar una señal fidedigna de un mínimo de 10 genomas celulares. Debido a que en las líneas celulares analizadas está reportado que el número de genomas virales presente por célula es alrededor de 50 [93, 94], se concluye que la PCR anidada detecta con un alto nivel de confianza hasta 500 genomas virales.

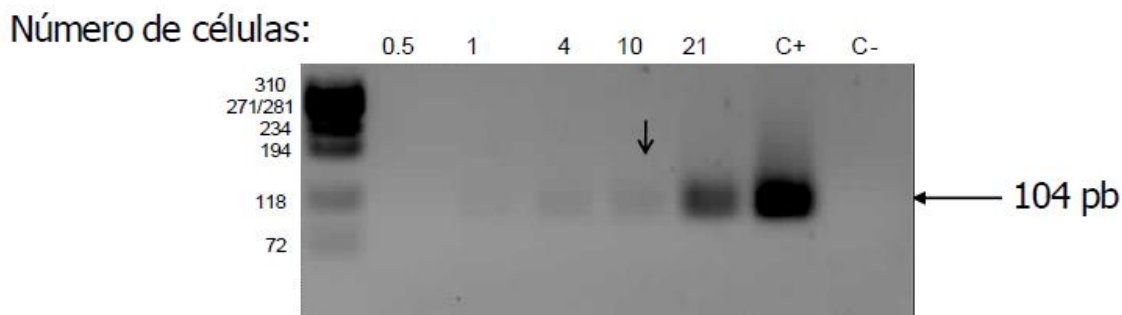


Figura 5. Límite de detección de EBV mediante PCR anidada, como control positivo (C+). Se usó Raji a una concentración de 17000 genomas celulares, lo usado normalmente en la primera reacción. Como control negativo (C-) se usó BJAB.

### **Análisis de las muestras clínicas**

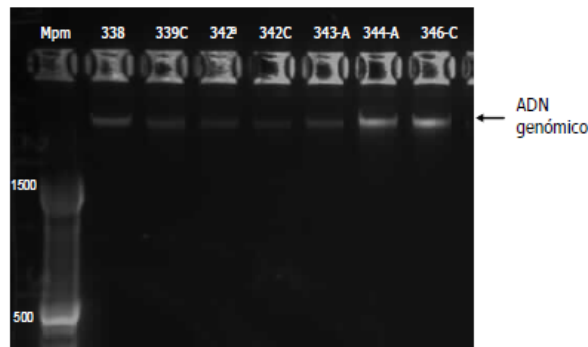
#### Purificación del ADN y análisis de integridad

Establecidos los límites de detección del ensayo, se continuó con la purificación del ADN de las muestras de tejido gástrico.

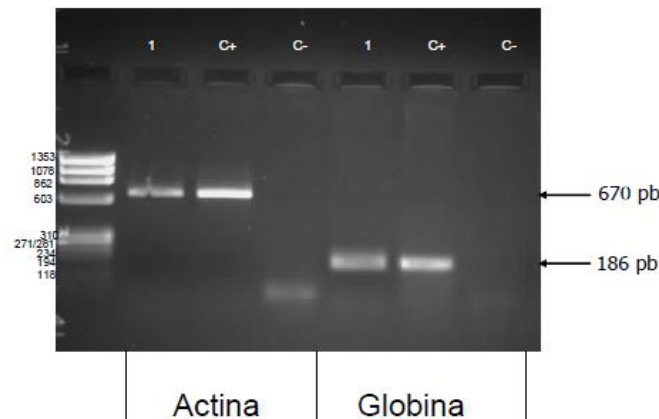
La concentración de ADN obtenido se evaluó por espectrofotometría y su pureza a partir de la relación 260/280. De todos los tejidos se obtuvo en promedio 500 ng de ADN, cantidad suficiente para el análisis propuesto. Se observó una relación 260/280 que osciló entre 1.80 y 2.0 dependiendo de la muestra, estas cifras indican un alto grado de pureza.

La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.7%. En la mayoría de las muestras se observó una banda bien definida. En la figura 6 se pueden observar ejemplos del ADN genómico obtenido de una serie de siete muestras. Para confirmar la integridad del ADN, todas las muestras fueron analizadas mediante PCR con primers dirigidos a una región del gen de  $\beta$ -actina que genera un amplicón de 670 pb. En más del 80% de las muestras se obtuvo amplificación, indicando así una buena integridad del ADN purificado. Las muestras que resultaron negativas en el PCR para  $\beta$ -actina se sometieron a una segunda PCR para el gen  $\beta$ -globina, que amplifica un fragmento menor (186 pb); esto se usó sobre todo para los tejidos embebidos en parafina, ya que en los tejidos conservados de esta manera, los ácidos nucleicos tienden a

degradarse. Con esta reacción, se observó amplificación en un 10% más del total de muestras. Comparando el tamaño de los amplicones de estos genes endógenos con el amplicón de la reacción de PCR punto final de detección viral, que es de 236 pb, es posible notar que  $\beta$ -actina tiene un tamaño mucho mayor a éste, mientras que  $\beta$ -globina es de tamaño similar. Por lo cual se concluye que al menos 90% de las muestras contenían ADN de calidad suficiente para la primera reacción de PCR de detección viral (Fig. 7),



**Figura 6. Integridad de ADN genómico.** Se puede observar una banda bien definida al correr el ADN purificado de siete muestras representativas en un gel de agarosa al 1.7%



**Figura 7. Integridad del ADN de las muestras.** Gel representativo de una muestra embebida en parafina la cual se analizó mediante PCR para  $\beta$ -globina y  $\beta$ -actina. Se observa un amplicón en ambos casos. Como control positivo (C+) Daudi y como control negativo (C-)  $H_2O$ .

Con las condiciones estandarizadas de las PCRs y la evaluación de la integridad del ADN obtenido a partir del PCR de genes endógenos se inició la evaluación de la presencia de EBV en las muestras ya descritas con calidad suficiente para el análisis (ver Tabla 1).

### Análisis de muestras de gastritis de adultos

Se sabe que el proceso de carcinogénesis conlleva varias etapas y en el caso del CG intestinal se ha relacionado a lesiones previas al tumor, por este motivo se decidió analizar muestras de gastritis, la lesión que se considera mas temprana dentro del proceso hacia CG intestinal. Se ha visto que esta enfermedad siempre inicia como gastritis superficial, la forma más leve y puede llegar a avanzar a gastritis atrófica [7], Así, las gastritis de adultos fueron divididas en dos grupos: no atrófica o superficial y atrófica de las cuales se analizaron 76 y 5 muestras, respectivamente. En ninguna de las muestras de gastritis atrófica se obtuvo amplificación, sin embargo tres muestras de gastritis superficial fueron positivas, lo cual es equivalente al 3.9% de las muestras analizadas (Fig. 8). Todas las muestras positivas corresponden a pacientes masculinos de 35, 25 y 64 años de edad.

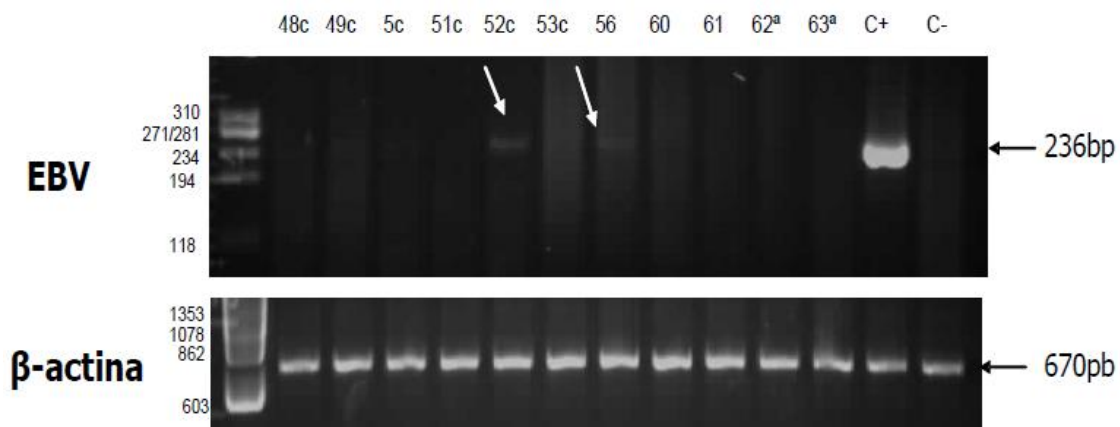
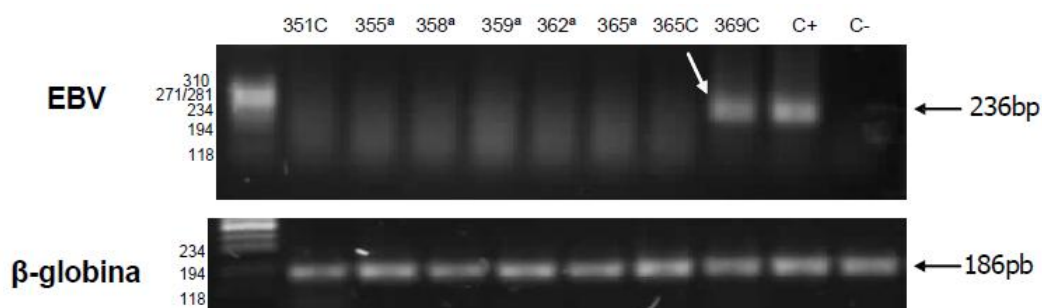


Figura 8. Muestras de gastritis en adultos positivas a EBV. Se pueden observar dos de las tres muestras positivas encontradas en el análisis señaladas con una flecha. Como control positivo (C+) se usó ADN derivado de células Daudi y como control negativo (C-) de Ramos.

### Análisis de muestras de gastritis de niños

EBV se contrae generalmente durante la niñez. En México se ha encontrado que el 75% de los niños de entre 4-6 años de edad ya cuentan con anticuerpos contra el virus [95]. A la fecha no existen trabajos sobre cuando se da la infección en tejido gástrico y si ésta cursa con algún tipo de sintomatología. En estudios sobre la infección con *H. pylori* se ha encontrado que a mas temprana la infección mayor probabilidad de desarrollar lesiones gástricas graves [96]. Es posible que un fenómeno similar ocurra con EBV y que niños con lesiones

gástricas positivas al virus tengan una mayor probabilidad de evolucionar a CG. Considerando que nuestros resultados apoyan que la infección por EBV ya está presente en gastritis de adultos y deseando conocer si esto también es cierto en edades tempranas, se incorporó un grupo de pacientes infantiles con diagnóstico de gastritis, de entre 1 y 17 años. Cabe mencionar que en niños la frecuencia de gastritis atrófica es prácticamente nula, de tal forma que el grupo de muestras clínicas analizadas está compuesto de gastritis superficial. Se analizaron 26 muestras por PCR punto final, encontrándose una muestra positiva, que sería equivalente al 3.8% (Fig. 9), la cual correspondió a una mujer de 16 años de edad.



**Figura 9. Figura representativa de las muestras de gastritis infantil analizadas. Se observó una muestra positiva a EBV, la cual es señalada con una flecha. El control positivo (C+) fue Daudi y el control negativo (C-) Ramos.**

Debido a que en gastritis se desconoce la monoclonalidad celular y por ende el número de células que podrían estar infectadas, el análisis de este tipo de muestras requiere la incorporación de una PCR anidada, con la inclusión de esta reacción nos aseguramos de detectar muestras positivas que estén por debajo del límite de la primera reacción, descartando así, la posibilidad de falsos negativos.

De esta forma, todas las muestras de gastritis que resultaron negativas a la primera reacción, fueron analizadas mediante PCR anidada. Con este análisis se obtuvieron siete muestras positivas de gastritis infantiles, que corresponden a pacientes femeninos de 9, 12, 8 y 14 años, así como dos pacientes de 15 años de edad. Con esto los porcentajes de incidencia de EBV en gastritis infantil serían de 26.92 %. Para las muestras de gastritis en adulto se



observaron 3 muestras positivas correspondientes a dos pacientes femeninos de 61 y 44 años de edad y un paciente masculino de 23 años (Fig. 10).

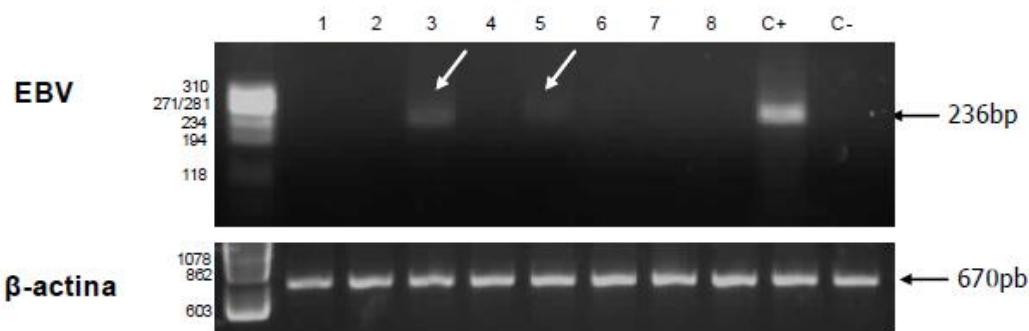


**Figura 10. PCR anidada para muestras de gastritis , se señalan con una flecha las muestras positivas. Como control positivo (C+) Raji y como control negativo (C-) Bjab**

Debido al uso de controles de ADN de leucocitos de pacientes sanos para la estandarización de la PCR anidada así como el hecho de que EBV este presente en bajas cantidades, alrededor de  $1 \times 10^5$  ó  $1 \times 10^6$  células B, en una infección asintomática (normal), todas las reacciones positivas se consideran positivos reales y no resultado de amplificaciones de virus presente en linfocitos B infectados infiltrando la lesión.

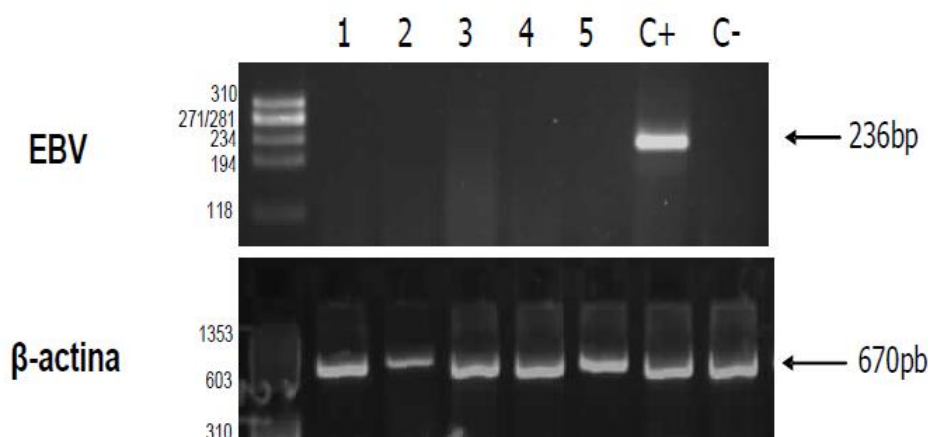
### **Análisis de muestras de pacientes con CG**

Aunque es posible inferir un posible papel de EBV en el desarrollo de CG a partir de lesiones previas como la gastritis, la mayor evidencia de la asociación EBV-CG nos la brinda la detección del genoma viral en el tumor. Así, se analizaron 24 muestras por PCR punto final de tumores gástricos: cuatro con diagnóstico de adenocarcinoma intestinal, 14 con diagnóstico de adenocarcinoma difuso y seis diagnosticados como tipo mixto. Se encontraron dos muestras positivas a EBV correspondientes a un hombre de 75 años y una mujer de 78 años de edad, diagnosticados con adenocarcinoma tipo intestinal y mixto respectivamente, representando el 25% de adenocarcinomas tipo intestinal, el 16.6% de carcinomas mixtos y el 8.3% del total de las muestras de cáncer (Fig. 11).



**Figura 11. PCR para muestras de adenocarcinomas. Muestras positivas para EBV señaladas con una flecha. Como control positivo (C+) Daudi y control negativo (C-) Ramos.**

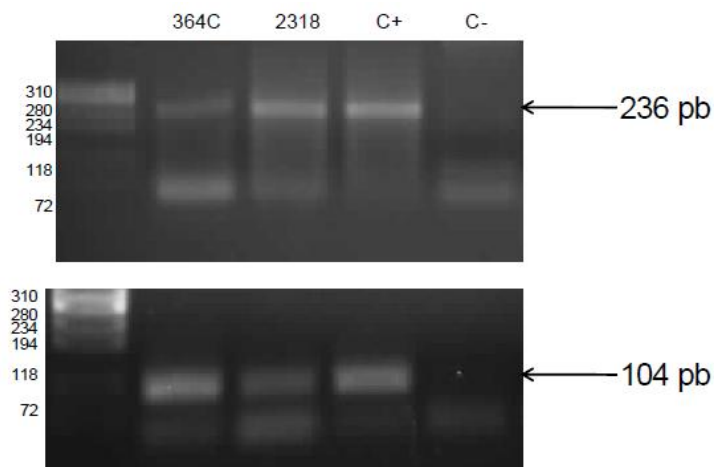
Como se parte de la hipótesis de que EBV es uno de los agentes causales del CG, las células tumorales deben llevar el genoma viral. Por otra parte el tejido circundante al tumor debe ser libre de infección como se ha encontrado en diferentes reportes [97] [56] [66]. Por este motivo se incluyeron 123 muestras de tejido adyacente al tumor como controles negativos y se analizaron con el PCR punto final, de ellas ninguna resultó positiva a EBV (Fig. 12).



**Figura 12. El tejido circundante a la lesión es negativo a EBV. Todas las reacciones para la búsqueda de EBV en tejido adyacente al tumor resultaron negativas, en este gel se ven cinco muestras representativas, el control positivo (C+) fue Daudi y el control negativo (C-) Ramos.**

Para validar los resultados positivos, se tomaron los productos de todas las muestras positivas y se realizó una PCR anidada, esto nos brinda un control sobre la especificidad de la primera reacción. En todas las muestras que resultaron positivas en la primera reacción de PCR punto final, fue posible observar también una señal positiva al realizar la PCR anidada (Fig. 13). De igual forma se analizaron muestras negativas a la primera reacción, tomándose 20 muestras al azar, 10 de los bancos de tejido adyacente al tumor y 10 de

adenocarcinomas, con el objetivo de confirmar los resultados negativos, en ninguna de éstas se observó amplificación. (Fig. 14)



**Figura 13. Muestras positivas confirmadas mediante PCR anidada. Se pueden observar dos muestras positivas en la primer PCR punto final, al usar los productos de esta reacción en una PCR anidada se obtiene una banda bien definida.**



**Figura 14. Muestras de tejido adyacente, gastritis en adultos y adenocarcinomas resultaron negativas. Gel representativo de muestras negativas a EBV confirmadas mediante PCR anidada, como control positivo (C+) Raji y como control negativo (C-) Bjab.**

Finalmente, pese a que la PCR anidada valida la especificidad de la primera reacción de detección viral, se secuenciaron nueve muestras positivas; tres de gastritis superficial de adultos, cuatro de gastritis infantil y dos adenocarcinomas. Las secuencias obtenidas fueron de al menos 170 bases al usar los oligonucleótidos de la primera PCR punto final, mientras que al usar los primers de la PCR anidada, se lograron leer al menos 50 bases, las secuencias obtenidas se analizaron mediante BLAST en el sitio web del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Con este análisis encontramos un

porcentaje de similitud de 99% a nivel de ADN de todas las muestras con el genoma de EBV cepa AG876 (Número de acceso [DQ279927.1](#)), la región BAMHI-W de EBV (Número de acceso [M15973.1](#)) el genoma de EBV cepa B95-8 (Número de acceso [V01555.2](#)) y el genoma de EBV cepa silvestre (Número de acceso [AJ507799.2](#)), (Fig. 15).

```
> gb|DQ279927.1 Human herpesvirus 4 strain AG876, complete genome
Length=172764

Sort alignments for this subject sequence by:
E value  Score  Percent identity
Query start position  Subject start position

Score = 267 bits (144), Expect = 2e-68
Identities = 147/148 (99%), Gaps = 1/148 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      GTCCAGATGTCCAGGGGtccccgagggcgagggcccagccccctcccgcccctgtccactg 60
             |||
Sbjct 13790  GTCCAGATGTCCAGGGGTCCCGAGGGCGAGGCCAGCCCCCTCCCGCCCCTGTCCACTG 13849

Query 61     ccccggtccccccagaagccccAAAGTAGAGGCTCAGGCCATGCGCGCCCTGTCACCA 120
             |||
Sbjct 13850  CCCCgGTCCCCCAGAAGCCCCAAAAGTAGAGGCTCAGGCCATGCGCGCCCTGTCACCA 13909

Query 121    GGCCTGCCAAAGAGCCAGATCTTAAGGC 148
             |||
Sbjct 13910  GGCCTGCCAAAGAGCCAGATCT-AAGGC 13936
```

**Figura 15. BLAST de una de las muestras secuenciadas. Se observa un alto porcentaje de similitud con EBV cepa AG876.**

Un resumen de todos los resultados se muestra en la Tabla 3

**Tabla 3. Muestras positivas y negativas a EBV**

<b>Muestra</b>	<b>No. de muestras</b>	<b>EBV +</b>	<b>EBV -</b>
Tejido adyacente	123	0	123
Gastritis Infantil	26	7 <b>26.92 %</b>	19
Gastritis crónica adultos	76	6 <b>7.89%</b>	70
Gastritis atrófica	5	0	5
Adenocarcinomas	24	2 <b>8.3%</b>	21

Los detalles de las muestras positivas se enlistan en la Tabla 4.

**Tabla 4 Detalles de las muestras positivas**

<b>Muestra</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Edad</b>	<b>*Genero</b>	<b>PCR**</b>	<b>PCR anidadada**</b>
50	Gastritis crónica	35	M	+	+
52	Gastritis crónica	25	M	+	+
56	Gastritis crónica folicular	64	M	+	+
364	Gastritis crónica folicular	16	F	+	+
352	Gastritis crónica	9	F	-	+
355	Gastritis crónica leve	15	F	-	+
358	Gastritis crónica moderada	15	F	-	+
357	Gastritis crónica folicular	12	F	-	+
361 <sup>a</sup>	Gastritis crónica	8	F	-	+
366 <sup>a</sup>	Gastritis crónica	14	F	-	+
26A	Gastritis crónica	61	F	-	+
56	Gastritis crónica	44	F	-	+
63 <sup>a</sup>	Gastritis folicular	23	M	-	+
2946	Adenocarcinoma mixto	78	F	+	+
2318	Adenocarcinoma intestinal	75	M	+	+

\*Genero (F: femenino y M: masculino). \*\*Resultados de la PCR y la PCR anidadada ya sean positivos (+) o negativos (-).

## **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados con la prueba exacta de Fisher, tomando como grupo control las muestras de tejido adyacente no tumoral. Las muestras de gastritis atrófica no fueron incluidas en este análisis debido a su bajo número, de la misma forma, las muestras de gastritis infantil fueron excluidas ya que no se contaba con tejido gástrico de pacientes infantiles para ser usado como grupo control.

En la tabla 5 se muestran los valores de p para los grupos analizados, se puede observar que de acuerdo a la prueba exacta de Fisher se hayo una significancia en la relación EBV/lesión, ya sea gastritis o CG, es decir, estos resultados sugieren que la presencia de gastritis o de CG está directamente relacionado con a la infección por EBV.

**Tabla 5 Valores de p para grupos analizados con la prueba exacta de Fisher.**

<b>Variable</b>	<b>EBV+</b>	<b>EBV-</b>	<b>Valor de p</b>
Cáncer	2 (8.3%)	22	0.025
Gastritis	6 (7.89%)	70	0.0027

## **Discusión y conclusiones**

EBV ha sido asociado a diferentes tipos de linfomas de células B, las cuales representan el reservorio “natural” del virus. Por otro lado, la infección del tejido epitelial es un acontecimiento poco común y aún en ensayos *in vitro* EBV infecta células epiteliales con muy baja eficiencia. De hecho, el receptor CD21, que media la entrada de EBV en linfocitos B, se encuentra ausente en epitelio [98]. Se ha sugerido que una posible vía de entrada de EBV en células que no expresan CD21 es unido a IgA en el proceso de transcitosis del epitelio del tubo digestivo superior [99].

Independientemente del mecanismo de entrada, una clara asociación entre EBV y cáncer nasofaríngeo ha sido observada [60]. Contrariamente, la presencia de EBV en cáncer gástrico (CG) permanece en discusión ya que se han obtenido resultados muy variables entre diferentes grupos, reportándose una asociación de EBV con CG desde 0% hasta 18% en las muestras analizadas [58, 59, 61, 62, 67-69]. Nosotros proponemos que esta variabilidad puede ser debida a que la búsqueda de EBV se ha hecho a partir de técnicas de hibridación *in situ* con sondas dirigidas a los RNAs EBERs (HIS, considerada hasta años recientes el estándar de oro para la detección de EBV) [66, 68-70, 72, 73, 75, 77-80]. Los RNAs EBERs están presentes en todos los tipos de latencias asociadas a linfomas. Sin embargo, los patrones de expresión de EBV en carcinomas aún no están completamente entendidos y existe evidencia de que frecuentemente los EBERs no son expresados, incrementando la posibilidad de obtener falsos negativos. Por citar algunos ejemplos de lo anterior, en un trabajo realizado en tumores de timo se observó que todas las muestras (N=21), analizadas mediante hibridación *in situ* usando sondas dirigidas a RNA EBERs fueron EBV negativas, no obstante, en un segundo rastreo realizado mediante PCR anidada e HIS con sondas dirigidas a regiones de ADN, 8 de estos tumores resultaron positivos [84].

Aunque la asociación EBV-tumores de timo es aún controversial, resultados similares han sido reportados en cáncer nasofaríngeo. Takeuchi et al. logró detectar genomas virales por PCR *in situ* pero no la expresión de EBERs [100]. En otro trabajo realizado por Grinstein *et al.* se reportaron casos negativos de cáncer de mama mediante HIS dirigida a EBERs, mismos que fueron positivos con el uso de PCR e inmunohistoquímica [83]. Finalmente, van Beek y colaboradores demostraron la presencia de EBV en CG con el uso de PCR, sin embargo, al realizar HIS de EBERs en las mismos tejidos, sólo algunos mostraron hibridación [87]. Estos resultados han llevado a algunos grupos a proponer que en otras neoplasias no linfoides, EBV podría mantener un tipo de latencia diferente, en la que no se expresan los EBERs (80, 91).

Por lo expuesto anteriormente, en este estudio se optó por el uso de PCR para llevar a cabo la detección viral. Una ventaja de la técnica HIS sobre la PCR es

que permite la observación directa de la célula infectada, mientras que en la PCR es imposible conocer si la señal positiva proviene de linfocitos o células epiteliales infectadas, por lo cual es posible que con el uso de PCR se den falsos positivos como resultado de la detección de linfocitos infectados infiltrantes de las lesiones, debido a que EBV como ya se mencionó, es un virus preferentemente linfotrópico. Sin embargo, en tumores con gran cantidad de linfocitos infiltrantes, como lo son los tumores LEL se ha encontrado que a pesar de la elevada frecuencia de linfocitos en el tejido, estos son negativos a EBV. Además, el número de linfocitos positivos a EBV en individuos infectados es muy bajo, se ha reportado que por cada millón de linfocitos circulantes sólo entre 1 y 10 son EBV positivos [27]. Para clarificar este problema en las muestras tumorales analizadas en este estudio se determinó la frecuencia de células tumorales y del infiltrado de linfocitos y nuestros límites de detección se establecieron de acuerdo a una frecuencia mínima de 5% de células tumorales. Aunado a esto, en nuestro estudio se eliminó la posibilidad de falsos positivos usando como referencia DNA de sangre periférica de individuos sanos infectados (Fig. 4).

En el presente trabajo la detección de EBV se realizó a partir de reacciones de PCR que reconocen la región BamHI W del genoma viral, que se encuentra repetida hasta 11 veces [27], lo cual hace esta técnica muy sensible. En este estudio se analizaron tejidos de adenocarcinomas gástricos, encontrándose EBV en el 8.3% del total de las muestras, un porcentaje similar al observado en los dos únicos estudios realizados en México, publicados por el grupo de Herrera, en 1999 y 2005, que reportó 8.15% y 7.12% de muestras positivas a EBV [79, 80]. Es importante señalar que este estudio incluyó casos de CG tipo linfoepitelioma (LEL); LEL es un subtipo de CG, que ha mostrado una asociación importante con EBV en reportes de diferentes países, encontrándose entre 80% y el 100% de muestras positivas. En los estudios de Herrera et al. se analizaron 15 casos CG LEL, todos positivos a EBV, que representan casi la mitad del total de las muestras positivas; de ser excluidos dichos casos, la frecuencia de asociación a EBV disminuiría hasta 4.7%. Nuestro estudio no incluyó ningún caso de CG LEL, por lo cual nuestros resultados y los ya reportados para México difieren importantemente. Como se



explicó anteriormente, uno de los principales factores que pudieran explicar estas diferencias podría estar relacionado al método de detección empleado. Otra diferencia importante es el número relativamente bajo de muestras de CG (N=24) analizadas en este estudio, es posible que al incrementar la N varíe la frecuencia de tumores positivos al virus. Este estudio también incluyó 123 muestras de tejido adyacente al tumor las cuales fueron negativas a EBV, apoyando la hipótesis de que EBV está relacionado al desarrollo de CG del tipo no LEL, como ya ha sido sugerido en otros estudios [97] [56] [66].

Las muestras de CG positivas analizadas en este estudio correspondieron a adenocarcinomas de tipo mixto y de tipo intestinal. Al menos en el tipo intestinal, se sabe que aparece como resultado de la progresión de diversas lesiones, por lo tanto encontrar una muestra positiva de este tipo apoya la hipótesis de que EBV puede contribuir a la formación de cáncer gástrico a partir de lesiones previas, como lo es la gastritis.

Teniendo en consideración lo anterior incorporamos muestras diagnosticadas con gastritis atrófica o gastritis superficial. Observamos resultados positivos sólo en gastritis superficial, en el 3.9% de casos en adultos (N=76) y en el 15.38% de niños (N=26). Cabe mencionar que al término de esta fase del estudio sólo se contaba con 5 muestras de gastritis atrófica y que probablemente es debido a este número bajo de muestras que no logramos obtener resultados positivos. Sin embargo, la presencia de EBV en lesiones de gastritis superficial que probablemente preceden la gastritis atrófica apoya la posibilidad de que el virus también se encuentre en este tipo de lesión.

Los reportes sobre la incidencia de EBV en lesiones previas a cáncer como la gastritis son escasos y contradictorios. Los pocos estudios en los que se ha abordado la búsqueda de EBV en gastritis se han realizado en su mayoría en adultos y en gastritis atrófica [93, 101-103] bajo el argumento de que ésta forma de gastritis es la más asociada con la progresión a cáncer [8]. El grupo de Zur Hausen en el 2004 analizó de forma retrospectiva la presencia de EBV en pacientes que cursaron progresivamente con gastritis atrófica, metaplasia, displasia y cáncer gástrico intestinal [103] detectando EBV únicamente en

muestras de CG y no en lesiones previas: sin embargo sólo se analizaron 11 muestras.

Hungermann en el 2001, que analizó un mayor número de muestras de gastritis de adultos, reportó 3.71% de casos positivos (N=251) [102] se concluyó que este porcentaje relativamente bajo no apoya la hipótesis de asociación EBV-CG intestinal. Una conclusión similar proviene del grupo de Fukayama en el mismo año, que ha reportado la presencia de EBV preferentemente en CG tipo difuso [104], el cual aparentemente ocurre en ausencia de lesiones previas. Es importante considerar que en los tres trabajos anteriormente descritos se utilizó HIS contra EBERs, cuyas limitaciones ya han sido discutidas.

En contraste, en estudios en los que se utilizaron técnicas de detección del genoma de EBV, se observó un mayor porcentaje de muestras positivas en gastritis atrófica. Yanai *et al.* y Hirano *et al.* reportaron 10% (N=20) [93] y 65.7% (N=35) [101] respectivamente, de muestras EBV positivas.

Otro hallazgo interesante fue publicado en 2010 por Krulevskii, niveles elevados de anticuerpos anti-EBV fueron encontrados en 40.8% (N=49) de pacientes adultos y 44.8% (N=108) de pacientes infantiles con diagnóstico de gastritis superficial [105] sugiriendo una participación del virus en este tipo de lesión.

En línea con las observaciones anteriores, en un reporte de casos se observó la progresión hacia cáncer a partir de gastritis en un paciente que adquirió la infección por EBV como consecuencia de la inmunosupresión inducida después de un trasplante, se detectó tejido gástrico positivo a EBV durante las etapas de gastritis, displasia y finalmente evolucionó a CG; de forma interesante, no se encontraron evidencias de infección por *H. pylori* [106].

En un intento de explicar el rol de EBV en gastritis se ha planteado que ésta puede ser un raro síntoma de mononucleosis infecciosa [107-110] [111], aunque dicho argumento no apoya directamente la participación de EBV en la generación de CG a partir de lesiones pre-cancerosas, debe considerarse que

la mononucleosis infecciosa es aceptada como un factor de riesgo importante en el desarrollo de otras malignidades como el cáncer nasofaríngeo y el linfoma de Hodgkins [24].

Es probable que el número de casos de gastritis positivas a EBV puedan estar siendo subestimados pues podrían estar siendo diagnosticados como neoplasia hematolinfoide, una malignidad que muestran síntomas y características histológicas similares a gastritis. Casos en los que se ha reconsiderado el diagnóstico desde neoplasia hematolinfoide a gastritis EBV positiva ya han sido reportados [111].

Es importante mencionar que el rastreo de EBV en gastritis podría estar subestimándose, incluso en nuestro estudio, ya que no se conoce si en gastritis EBV infecta de forma monoclonal y si el mismo tejido lesionado preferentemente tiene un origen celular monoclonal.

Nuestros resultados muestran que EBV puede estar presente en epitelio gástrico con gastritis, un tipo de lesión asociada con la progresión a CG intestinal, sin embargo, si EBV juega un papel en su generación o progresión requiere más estudios.

Este trabajo es el primer estudio que analiza exclusivamente adenocarcinomas, los tumores gástricos más comunes y de los cuales, a diferencia de los tumores LEL, la relación con EBV es aún debatida. Así mismo es el primer estudio en nuestro país que analiza gastritis en pacientes adultos e infantiles.

Siendo EBV un virus preferencialmente linfotrópico, se ha reportado que no hay infección en otro tipo celular bajo condiciones normales (incluido epitelio), de esta forma, encontrar EBV en muestras de gastritis pudiera explicarse por una elevada reactivación viral en el tracto digestivo superior (como sucede en la mononucleosis asociada a EBV) que favorece la infección aberrante de células epiteliales. Esta elevada producción viral en este tejido también favorecería un proceso inflamatorio y por lo tanto la presencia del virus en gastritis pudiera ser

un acontecimiento temprano en el desarrollo de CG, como se ha reportado para la infección por *H. pylori*.

Es importante el hacer notar que en este estudio observamos muestras de gastritis infantiles positivas a EBV, el encontrar gastritis infectadas con EBV a edades temprana puede también sugerir un papel de EBV en el desarrollo de CG en una forma similar a lo hipotetizado para *H. pylori*, ya que es posible que la infección temprana contribuya, con el paso del tiempo, a generar inflamación crónica que favorezca el desarrollo de la neoplasia a edades mayores.

Los resultados hallados en este trabajo, tomados en su conjunto, denotan un posible papel de EBV en el desarrollo de CG.

## **Perspectivas a futuro**

El número de muestras analizadas en este estudio resulta bajo, sobre todo en muestras de adenocarcinomas y gastritis atrófica, de esta forma, para que los resultados aquí mostrados adquieran un mayor peso es conveniente la inclusión de un mayor número de muestras de estos tipos.

Por otro lado, se encontraron muestras de gastritis superficial y de adenocarcinomas positivas al virus, lo que trae consigo la posibilidad de que EBV sea el causante de CG a partir de lesiones previas, sin embargo para esclarecer este punto se requiere incluir en el análisis, muestras de otras lesiones que están descritas en la secuencia de lesiones precancerosas, es decir metaplasia y displasia.

En linfomas y linfoepiteliomas asociados a EBV, el virus se encuentra de forma monoclonal. A futuro sería interesante estudiar la clonalidad viral en la serie de lesiones gastritis-metaplasia-displasia y cáncer. Es posible que en lesiones

más tempranas el virus se encuentre de forma policlonal pero a medida que progresa la lesión se encuentren preferentemente regiones de infección monoclonal.

Como se mencionó, el uso de HIS para detectar EBV mediante los transcritos virales EBERs tiene ciertas limitaciones, debido principalmente a que los patrones de expresión en carcinomas gástricos no están del todo descritos, por este motivo, es necesario evaluar la expresión de genes virales en muestras gástricas para establecer el patrón de expresión de EBV en CG.

#### Bibliografía

1. Organization., W.H. *World Cancer Day: Global action to avert 8 million cancer-related deaths by 2015*. 2010.
2. Borja, A.V.C., et al., *Costos de la atención médica de enfermedades con alta mortalidad en trabajadores asegurados del IMSS*. . 2004. : Instituto Mexicano del Seguro Social.
3. Stewart, B.W. and P. Kleihues, *World Cancer Report*. 2003. : IARC Press.
4. Tovar-Guzman, V., et al., *Epidemiologic panorama of stomach cancer mortality in Mexico*. . Archives of medical research, 2001. **32**: p. 312-317.
5. Kumar, V., N. Fausto, and A. Abbas, *Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. 2010: Saunders Elsevier.
6. Lauren, P., *The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1965. **64**: p. 31-49.
7. Cotran, R.S., V. Kumar, and T. Collins, *Robbins. Patología Estructural y Funcional*. 6 ed. 2000: McGraw-Hill / Panamericana.
8. Correa, P., M.B. Piazuelo, and M.C. Camargo, *Etiopathogenesis of gastric cancer*. Scand J Surg, 2006. **95**(4): p. 218-24.
9. Wilcox, R., et al., *Hereditary diffuse gastric cancer: multidisciplinary case report with review of the literature*. Patholog Res Int, 2011. **2011**: p. 845821.
10. Kluijdt, I., et al., *[Familial gastric cancer: diagnosis, treatment and periodic surveillance.]*. Ned Tijdschr Geneesk, 2011. **155**(6): p. A2731.
11. Zinner, M., S. Schwartz, and H. Ellis, *Operaciones Abdominales* 10 ed. Tumores gástricos. 1998, Buenos Aires, Argentina: Interamericana.

12. Soto, A.V., et al., *Cáncer gástrico: caso clínico-patológico*. . Revista de facultad de medicina. UNAM, 2001. **44**(3): p. 133.
13. Corral, V., *Cáncer gástrico. Estado actual*. . Cirujano General 1999. **21**(1).
14. Xia, H.H., et al., *Antral-type mucosa in the gastric incisura, body, and fundus (antralization): a link between Helicobacter pylori infection and intestinal metaplasia?* Am J Gastroenterol, 2000. **95**(1): p. 114-21.
15. Butel, J.S., *Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease*. Carcinogenesis, 2000. **21**(3): p. 405-26.
16. Ponder, B.A., *Cancer genetics*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 336-41.
17. Schottenfeld, D. and J. Beebe-Dimmer, *Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia*. CA Cancer J Clin, 2006. **56**(2): p. 69-83.
18. Nomura, A., et al., *Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii*. N Engl J Med, 1991. **325**(16): p. 1132-6.
19. Parsonnet, J., et al., *Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma*. N Engl J Med, 1991. **325**(16): p. 1127-31.
20. Burkitt, D., *A sarcoma involving the jaws in African children*. Br J Surg, 1958. **46**(197): p. 218-23.
21. Epstein, M.A., B.G. Achong, and Y.M. Barr, *Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma*. Lancet, 1964. **1**(7335): p. 702-3.
22. Henle, G. and W. Henle, *Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma*. J Bacteriol, 1966. **91**(3): p. 1248-56.
23. Henle, G., W. Henle, and V. Diehl, *Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1968. **59**(1): p. 94-101.
24. Crawford, D.H., *Biology and disease associations of Epstein-Barr virus*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001. **356**(1408): p. 461-73.
25. Labrecque, L.G., et al., *Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study*. Cancer Res, 1995. **55**(1): p. 39-45.
26. Longnecker, R., *Human tumor viruses*. Molecular biology of Epstein-Barr virus. . 1998. , Washington,D.C: DJ M, American Society for Microbiology.
27. Rickinson, A.B. and E. Kieff, *Epstein-Barr Virus*. , in *Virology*. 1996, Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia. p. 2397-2446.
28. Thorley-Lawson, D.A., *Epstein-Barr virus: exploiting the immune system*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 75-82.
29. Edwards, R.H., A.R. Marquitz, and N. Raab-Traub, *Epstein-Barr virus BART microRNAs are produced from a large intron prior to splicing*. J Virol, 2008. **82**(18): p. 9094-106.
30. Rowe, M., et al., *Burkitt's lymphoma: the Rosetta Stone deciphering Epstein-Barr virus biology*. Semin Cancer Biol, 2009. **19**(6): p. 377-88.
31. Magrath, I., *The pathogenesis of Burkitt's lymphoma*. Adv Cancer Res, 1990. **55**: p. 133-270.
32. Raab-Traub, N. and K. Flynn, *The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation*. Cell, 1986. **47**(6): p. 883-9.
33. Rowe, D.T., et al., *Restricted expression of EBV latent genes and T-lymphocyte-detected membrane antigen in Burkitt's lymphoma cells*. EMBO J, 1986. **5**(10): p. 2599-607.
34. Wilson, J.B., J.L. Bell, and A.J. Levine, *Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice*. EMBO J, 1996. **15**(12): p. 3117-26.

35. Galetsky, S.A., et al., *Epstein-Barr-virus-associated gastric cancer in Russia*. Int J Cancer, 1997. **73**(6): p. 786-9.
36. Pope, J.H., M.K. Horne, and W. Scott, *Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus*. Int J Cancer, 1968. **3**(6): p. 857-66.
37. Caldwell, R.G., et al., *Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals*. Immunity, 1998. **9**(3): p. 405-11.
38. Devergne, O., et al., *Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 7098-108.
39. Gires, O., et al., *Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule*. EMBO J, 1997. **16**(20): p. 6131-40.
40. Hatzivassiliou, E., et al., *A fusion of the EBV latent membrane protein-1 (LMP1) transmembrane domains to the CD40 cytoplasmic domain is similar to LMP1 in constitutive activation of epidermal growth factor receptor expression, nuclear factor-kappa B, and stress-activated protein kinase*. J Immunol, 1998. **160**(3): p. 1116-21.
41. Pattengale, P.K., R.W. Smith, and P. Gerber, *Selective transformation of B lymphocytes by E.B. virus*. Lancet, 1973. **2**(7820): p. 93-4.
42. Izumi, K.M. and E.D. Kieff, *The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12592-7.
43. Shair, K.H., C.I. Schnegg, and N. Raab-Traub, *EBV latent membrane protein 1 effects on plakoglobin, cell growth, and migration*. Cancer Res, 2008. **68**(17): p. 6997-7005.
44. Young, L.S. and P.G. Murray, *Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours*. Oncogene, 2003. **22**(33): p. 5108-21.
45. Fukuda, M. and R. Longnecker, *Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mediates transformation through constitutive activation of the Ras/PI3-K/Akt Pathway*. J Virol, 2007. **81**(17): p. 9299-306.
46. Scholle, F., K.M. Bendt, and N. Raab-Traub, *Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt*. J Virol, 2000. **74**(22): p. 10681-9.
47. Fukuda, M. and R. Longnecker, *Latent membrane protein 2A inhibits transforming growth factor-beta 1-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway*. J Virol, 2004. **78**(4): p. 1697-705.
48. Altieri, D.C., *Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer*. Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8581-9.
49. Hino, R., et al., *Survival advantage of EBV-associated gastric carcinoma: survivin up-regulation by viral latent membrane protein 2A*. Cancer Res, 2008. **68**(5): p. 1427-35.
50. Nanbo, A., et al., *Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma*. EMBO J, 2002. **21**(5): p. 954-65.
51. Shimizu, N., et al., *Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV*. J Virol, 1994. **68**(9): p. 6069-73.
52. Bonnet, M., et al., *Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(16): p. 1376-81.

53. Hsieh, L.L., et al., *Frequency of Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma in Taiwan*. *Cancer Lett*, 1998. **129**(2): p. 125-9.
54. Imai, S., et al., *Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(19): p. 9131-5.
55. Oda, K., et al., *Association of Epstein-Barr virus with gastric carcinoma with lymphoid stroma*. *Am J Pathol*, 1993. **143**(4): p. 1063-71.
56. Shibata, D., et al., *Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. Lymphoepithelioma-like carcinoma*. *Am J Pathol*, 1991. **139**(3): p. 469-74.
57. Shibata, D. and L.M. Weiss, *Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma*. *Am J Pathol*, 1992. **140**(4): p. 769-74.
58. Shousha, S. and Y.A. Luqmani, *Epstein-Barr virus in gastric carcinoma and adjacent normal gastric and duodenal mucosa*. *J Clin Pathol*, 1994. **47**(8): p. 695-8.
59. Tokunaga, M., et al., *Epstein-Barr virus in gastric carcinoma*. *Am J Pathol*, 1993. **143**(5): p. 1250-4.
60. Chen, H.L., et al., *Detection of EBV in nasopharyngeal carcinoma by quantum dot fluorescent in situ hybridization*. *Exp Mol Pathol*, 2010. **89**(3): p. 367-71.
61. Burke, A.P., et al., *Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction*. *Mod Pathol*, 1990. **3**(3): p. 377-80.
62. Matsunou, H., et al., *Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma with lymphoid stroma in Japan*. *Cancer*, 1996. **77**(10): p. 1998-2004.
63. Min, K.W., et al., *Poorly differentiated adenocarcinoma with lymphoid stroma (lymphoepithelioma-like carcinomas) of the stomach. Report of three cases with Epstein-Barr virus genome demonstrated by the polymerase chain reaction*. *Am J Clin Pathol*, 1991. **96**(2): p. 219-27.
64. Nakamura, S., et al., *Epstein-Barr virus in gastric carcinoma with lymphoid stroma. Special reference to its detection by the polymerase chain reaction and in situ hybridization in 99 tumors, including a morphologic analysis*. *Cancer*, 1994. **73**(9): p. 2239-49.
65. Niedobitek, G., et al., *Epstein-Barr virus and carcinomas. Expression of the viral genome in an undifferentiated gastric carcinoma*. *Diagn Mol Pathol*, 1992. **1**(2): p. 103-8.
66. Corvalan, A., et al., *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*, 2001. **94**(4): p. 527-30.
67. Horiuchi, K., et al., *Carcinoma of stomach and breast with lymphoid stroma: localisation of Epstein-Barr virus*. *J Clin Pathol*, 1994. **47**(6): p. 538-40.
68. Takada, K., *Epstein-Barr virus and gastric carcinoma*. *Mol Pathol*, 2000. **53**(5): p. 255-61.
69. van Beek, J., et al., *EBV-positive gastric adenocarcinomas: a distinct clinicopathologic entity with a low frequency of lymph node involvement*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(4): p. 664-70.
70. Wang, M., M. Tokunaga, and X.S. Jia, *[Observations on the relation of gastric carcinoma to Epstein-Barr virus]*. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 1994. **23**(5): p. 285-7.
71. Luo, B., et al., *Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinomas*. *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(5): p. 629-33.



72. Hao, Z., et al., *The Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Southern and Northern China*. *Oncol Rep*, 2002. **9**(6): p. 1293-8.
73. Qiu, K., et al., *Epstein-Barr virus in gastric carcinoma in Suzhou, China and Osaka, Japan: association with clinico-pathologic factors and HLA-subtype*. *Int J Cancer*, 1997. **71**(2): p. 155-8.
74. Hayashi, K., et al., *Deletion of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene in Japanese and Brazilian gastric carcinomas, metastatic lesions, and reactive lymphocytes*. *Am J Pathol*, 1998. **152**(1): p. 191-8.
75. Lopes, L.F., et al., *Epstein-Barr virus infection and gastric carcinoma in Sao Paulo State, Brazil*. *Braz J Med Biol Res*, 2004. **37**(11): p. 1707-12.
76. Luqmani, Y.A., S.O. Linjawi, and S. Shousha, *Detection of Epstein-Barr virus in gastrectomy specimens*. *Oncol Rep*, 2001. **8**(5): p. 995-9.
77. Carrascal, E., et al., *Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Cali, Colombia*. *Oncol Rep*, 2003. **10**(4): p. 1059-62.
78. Yoshiwara, E., et al., *Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Lima, Peru*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2005. **24**(1): p. 49-54.
79. Herrera-Goepfert, R., et al., *Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: Evidence of age-dependence among a Mexican population*. *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(39): p. 6096-103.
80. Herrera-Goepfert, R., et al., *Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Mexico: analysis of 135 consecutive gastrectomies in two hospitals*. *Mod Pathol*, 1999. **12**(9): p. 873-8.
81. Rymo, L., *Identification of transcribed regions of Epstein-Barr virus DNA in Burkitt lymphoma-derived cells*. *J Virol*, 1979. **32**(1): p. 8-18.
82. Razzouk, B.I., et al., *Epstein-Barr Virus DNA recombination and loss in sporadic Burkitt's lymphoma*. *J Infect Dis*, 1996. **173**(3): p. 529-35.
83. Grinstein, S., et al., *Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites*. *Cancer Res*, 2002. **62**(17): p. 4876-8.
84. Chen, P.C., et al., *Detection of Epstein-Barr virus genome within thymic epithelial tumours in Taiwanese patients by nested PCR, PCR in situ hybridization, and RNA in situ hybridization*. *J Pathol*, 2002. **197**(5): p. 684-8.
85. Korabecna, M., M. Ludvikova, and A. Skalova, *Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus in paraffin-embedded tissues of tumors with abundant lymphoid infiltration*. *Neoplasma*, 2003. **50**(1): p. 8-12.
86. Lauritzen, A.F., U. Hording, and H.W. Nielsen, *Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: a comparative immunological, in situ hybridization, and polymerase chain reaction study*. *APMIS*, 1994. **102**(7): p. 495-500.
87. van Beek, J., et al., *A rapid and reliable enzyme immunoassay PCR-based screening method to identify EBV-carrying gastric carcinomas*. *Mod Pathol*, 2002. **15**(8): p. 870-7.
88. Kuipers, E.J., et al., *Long-term sequelae of Helicobacter pylori gastritis*. *Lancet*, 1995. **345**(8964): p. 1525-8.
89. You, W.C., et al., *Randomized double-blind factorial trial of three treatments to reduce the prevalence of precancerous gastric lesions*. *J Natl Cancer Inst*, 2006. **98**(14): p. 974-83.
90. Fuchs, C.S. and R.J. Mayer, *Gastric carcinoma*. *N Engl J Med*, 1995. **333**(1): p. 32-41.
91. Onate-Ocana, L.F., *Gastric cancer in Mexico*. *Gastric Cancer*, 2001. **4**(3): p. 162-4.

92. Fuentes-Panana, E.M., et al., *Basal Igalpha/Igbeta signals trigger the coordinated initiation of pre-B cell antigen receptor-dependent processes.* J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1000-11.
93. Yanai, H., et al., *Epstein-Barr virus infection in non-carcinomatous gastric epithelium.* J Pathol, 1997. **183**(3): p. 293-8.
94. Sternas, L., et al., *Quantitation of Epstein-Barr virus (EBV)-determined nuclear antigen (EBNA) by a two-site enzyme immunoassay, in parallel with EBV-DNA.* J Immunol Methods, 1986. **89**(2): p. 151-8.
95. Evans, A.S. and R.A. Kaslow, *Viral infections of humans : epidemiology and control.* 4th ed. 1997: New York : Plenum Medical Book Co. xxxviii, 1078 p., 1 p. of plate.
96. Recavarren-Arce, S., et al., *Chronic atrophic gastritis: early diagnosis in a population where Helicobacter pylori infection is frequent.* Clin Infect Dis, 1997. **25**(5): p. 1006-12.
97. Truong, C.D., et al., *Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: a study of 235 cases at a comprehensive cancer center in U.S.A.* J Exp Clin Cancer Res, 2009. **28**: p. 14.
98. Borza, C.M. and L.M. Hutt-Fletcher, *Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus.* Nat Med, 2002. **8**(6): p. 594-9.
99. Sixbey, J.W. and Q.Y. Yao, *Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism.* Science, 1992. **255**(5051): p. 1578-80.
100. Takeuchi, H., et al., *Detection of latent Epstein-Barr virus (EBV) DNA in paraffin sections of nasopharyngeal carcinomas expressing no EBV-encoded small RNAs using in situ PCR.* Arch Virol, 1997. **142**(9): p. 1743-56.
101. Hirano, A., et al., *Evaluation of epstein-barr virus DNA load in gastric mucosa with chronic atrophic gastritis using a real-time quantitative PCR assay.* Int J Gastrointest Cancer, 2003. **34**(2-3): p. 87-94.
102. Hungermann, D., et al., *Low prevalence of latently Epstein-Barr virus-infected cells in chronic gastritis.* Microsc Res Tech, 2001. **53**(6): p. 409-13.
103. Zur Hausen, A., et al., *Epstein-Barr virus in gastric carcinomas and gastric stump carcinomas: a late event in gastric carcinogenesis.* J Clin Pathol, 2004. **57**(5): p. 487-91.
104. Fukayama, M., J.M. Chong, and H. Uozaki, *Pathology and molecular pathology of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma.* Curr Top Microbiol Immunol, 2001. **258**: p. 91-102.
105. Krulevskii, V.A., et al., *[Chronic gastritis and herpetic infections in subjects of different ages].* Arkh Patol, 2010. **72**(1): p. 33-5.
106. Au, W.Y., et al., *Epstein-barr virus-related gastric adenocarcinoma: an early secondary cancer post hemopoietic stem cell transplantation.* Gastroenterology, 2005. **129**(6): p. 2058-63.
107. Hisamatsu, A., et al., *Gastritis associated with Epstein-Barr virus infection.* Intern Med, 2010. **49**(19): p. 2101-5.
108. Kitayama, Y., S. Honda, and H. Sugimura, *Epstein-Barr virus-related gastric pseudolymphoma in infectious mononucleosis.* Gastrointest Endosc, 2000. **52**(2): p. 290-1.
109. Zhang, Y. and R. Molot, *Severe gastritis secondary to Epstein-Barr viral infection. Unusual presentation of infectious mononucleosis and associated diffuse lymphoid hyperplasia in gastric mucosa.* Arch Pathol Lab Med, 2003. **127**(4): p. 478-80.

110. Chen, Z.M., et al., *Epstein-Barr virus gastritis: an underrecognized form of severe gastritis simulating gastric lymphoma*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(9): p. 1446-51.
111. Owens, S.R., et al., *Epstein-Barr Virus Gastritis: Rare or Rarely Sampled? A Case Report*. Int J Surg Pathol, 2008.