

Adenocarcinoma gástrico asociado con el virus de Epstein-Barr en Cali¹

Edwin Carrascal, M.D.², Masayoshi Tokunaga, M.D.³, Suminori Akiba, M.D.⁴, Yoshito Eizuru, M.D.³, Chihaya Fujiyama, M.D.⁴, Reiko Shinkura, M.D.⁴, Yuko Harada, M.D.⁴

RESUMEN

Para investigar la presencia del virus de Epstein-Barr en adenocarcinoma gástrico, se estudiaron 99 casos consecutivos de esta neoplasia en el Hospital Universitario del Valle en Cali, por medio de la técnica de hibridización in situ utilizando una sonda para un fragmento del ARN viral (EBER, sigla en inglés). Los casos correspondían a 66 hombres (edad media: 62 años) y 33 mujeres (edad media: 60 años). Hubo 46 casos de adenocarcinoma tipo intestinal y 53 del tipo difuso, ninguno de la variedad "linfoepitelioma"; 10 (10.1%) casos fueron positivos para el virus, 9 hombres y 1 mujer; 5 fueron del tipo intestinal y 5 del difuso. Los estudios realizados en otras partes del mundo han mostrado que 10% de los casos de adenocarcinoma gástrico están asociados con el virus. El presente estudio concuerda con esa cifra. Son necesarias investigaciones adicionales para entender la interacción entre el virus de Epstein-Barr y la célula epitelial del estómago, así como también su relación con otros agentes involucrados en carcinogénesis gástrica.

Palabras claves: Adenocarcinoma. Virus Epstein-Barr. Tumores linfoides. Enfermedad de Hodgkin.

El virus de Epstein-Barr (VEB) se asocia etiológicamente con ciertos tumores linfoides tanto de origen B como T y NK, algunos de ellos en pacientes inmunocomprometidos y con la enfermedad de Hodgkin¹; además, con algunos tumores malignos epiteliales como el carcinoma nasofaríngeo y otros de morfología similar tipo "linfoepitelioma", en diferentes sitios anatómicos. Recientemente se demostró por métodos moleculares la presencia intracelular del virus en 16% de una pequeña serie de casos de adenocarcinoma gástrico de Norteamérica². Después de este informe se estudió una serie numerosa de pacientes japoneses, hallándose positividad para VEB en 7%, de los casos³ cifra notoriamente más baja que en Norteamérica, donde la tasa

de incidencia de cáncer gástrico es ocho veces menor que en Japón. El virus se encontró en 11% de casos estudiados en Taiwan⁴ y en 18% en Alemania⁵.

El VEB es un herpes virus causante de la mononucleosis infecciosa; 90% de la población mundial adulta tiene evidencia de infección anterior por el virus¹. Es llamativo que un virus tan ubicuo pueda causar una enfermedad infecciosa y sea capaz de inducir cáncer. Los mecanismos que inducen la transformación neoplásica son aún desconocidos. En líneas celulares linfoblastoides B cultivadas provenientes de linfoma de Burkitt se ha demostrado el ADN viral completamente integrado. Estas células expresan genes virales que codifican seis antígenos nucleares (EBNA), tres proteínas de

membrana (LMP) y dos segmentos cortos de ARN no poliadenilado (EBER-1 y 2.) La presencia de EBER-1 en el núcleo de la célula transformada es el marcador más sensible para establecer infección latente¹.

El cáncer gástrico es uno de los cánceres más frecuentes en el mundo⁶, con diversos patrones de distribución geográfica. En Colombia existen variaciones regionales, con tasas de mortalidad más altas en regiones montañosas y bajas en las áreas planas⁷. Colombia cuenta con un solo registro de incidencia de cáncer de base poblacional establecido en 1962, que abarca la zona urbana de la ciudad de Cali, situada entre la cadena montañosa de los Andes, en el valle del río Cauca, a 1,000 m sobre el nivel del mar. En Cali, el cáncer gástrico es el más frecuente en hombres, seguido por próstata y pulmón, y el tercero en frecuencia en mujeres, después de mama y cérvix⁸.

El presente estudio tiene como fin determinar la presencia del VEB en casos de adenocarcinoma gástrico en Cali usando hibridización *in situ* (HIS) para EBER-1 en material de biopsia o gastrectomía fijado en parafina, usando

1. Este trabajo hace parte de un Estudio Internacional Colaborativo que busca la prevalencia del cáncer gástrico asociado con el virus de Epstein-Barr en países desarrollados y en vía de desarrollo. El estudio es financiado por el Grant 090-42007 del Fondo para la Investigación Científica del Ministerio de Educación, Ciencia, Deporte y Cultura del Japón.
2. Profesor Asociado, Registro Poblacional de Cáncer, Departamento de Patología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
3. División de Virus Persistentes y Oncogénicos, Centro de Enfermedades Virales Crónicas, Departamento de Salud Pública, Kagoshima, Japan.
4. Primer Departamento de Cirugía, Escuela de Medicina, Universidad de Kagoshima, Kagoshima, Japan.

como sonda un oligonucleótido marcada con digoxigenina. El método es altamente sensible y es la prueba estándar para determinar la presencia del virus en la célula⁹. Es el primer estudio de esta naturaleza realizado en Colombia para este tipo de cáncer.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvo del Departamento de Patología, Hospital Universitario del Valle (HUV), Cali, Colombia, el material fijado en formol e incluido en parafina de 99 pacientes consecutivos con adenocarcinoma gástrico, de enero 1, 1996 a julio 31, 1997. Sólo tenían biopsias endoscópicas 31 pacientes; a 67 se les había practicado gastrectomía, y en 1 se obtuvo mediante laparotomía urgente una muestra de ganglio linfático intraabdominal con metástasis por perforación de un cáncer gástrico. Ninguno tuvo carcinoma múltiple en el tiempo estudiado. Se excluyeron los casos de linfoma y otros tipos de malignidad. La muestra comprende 66 hombres y 33 mujeres.

Se hicieron dos placas histológicas de un bloque representativo de cada caso, uno para hematoxilinaeosina y otro para HIS. Los carcinomas se clasificaron como de tipo intestinal o difuso y se subclasificaron de acuerdo con el esquema de la Sociedad Japonesa para Investigación del Cáncer Gástrico¹⁰. Una variedad histológica especial se agregó a este esquema, el carcinoma con intenso infiltrado linfoide, llamado "linfopitelioma", un patrón morfológico asociado con VEB en nasofaringe¹¹.

Hibridación *in situ*. Secciones de 5 µ del tumor se desparafinizaron, se rehidrataron, se predigirieron con pronasa, prehibridaron y finalmente se hibridaron durante la noche a 37°C con una concentración de 0.5 ng de sonda marcada con digoxigenina. Después de lavar con solución de citrato salino, la hibridación fue detectada por un conjugado de anticuerpo antidigoxigenina y fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim, Mannheim,

Germany), como era sugerido por el fabricante.

Como control se usaron cortes de un cáncer de estómago que previamente había sido demostrado positivo para VEB. Se utilizó la sonda sin el anticuerpo como control negativo.

RESULTADOS

De los 96 pacientes 10 (10.1%) fueron positivos 4 en material de biopsia y 6 en especímenes de gastrectomía. Las señales de hibridación se vieron en el núcleo y nucléolo en casi todas las células del carcinoma y ausentes en la mucosa adyacente (Figuras 1, 2 y 3). El citoplasma fue negativo. No se observó positividad en los linfocitos asociados con el tumor ni en los de la mucosa.

Edad y género. La relación hombre:mujer para todos los casos fue de 2:1. De los 66 pacientes hombres, la edad estuvo entre 19 y 83 años (media: 62) y de las 33 mujeres entre 26 y 88 años (media: 60 años). El virus se encontró

en 9 (13.6%) hombres y sólo en 1 (3%) mujer. Los pacientes positivos para el virus estaban entre 43 y 77 años (media: 61 años) (Cuadro 1).

Cuadro 1
Frecuencia de adenocarcinoma gástrico positivo para VEB por edad y género

Edad	Total VEB+/Total	Masculino VEB+/Total	Femenino VEB+/Total
19-34	0/5	0/3	0/2
35-44	1/10	1/5	0/5
45-54	3/10	2/8	1/2
55-64	1/38	1/24	0/14
65-74	2/19	2/14	0/5
≥ 75	3/17	3/12	0/5
Total	10/99	9/66	1/33

Localización del tumor. En 26 casos no se pudo conocer el sitio de localización del tumor en los registros disponibles. De estos, 3 fueron positivos para el VEB. Entre los restantes 73 casos, un caso se originó en el remanente gástrico postgastrectomía, el cual fue negati-

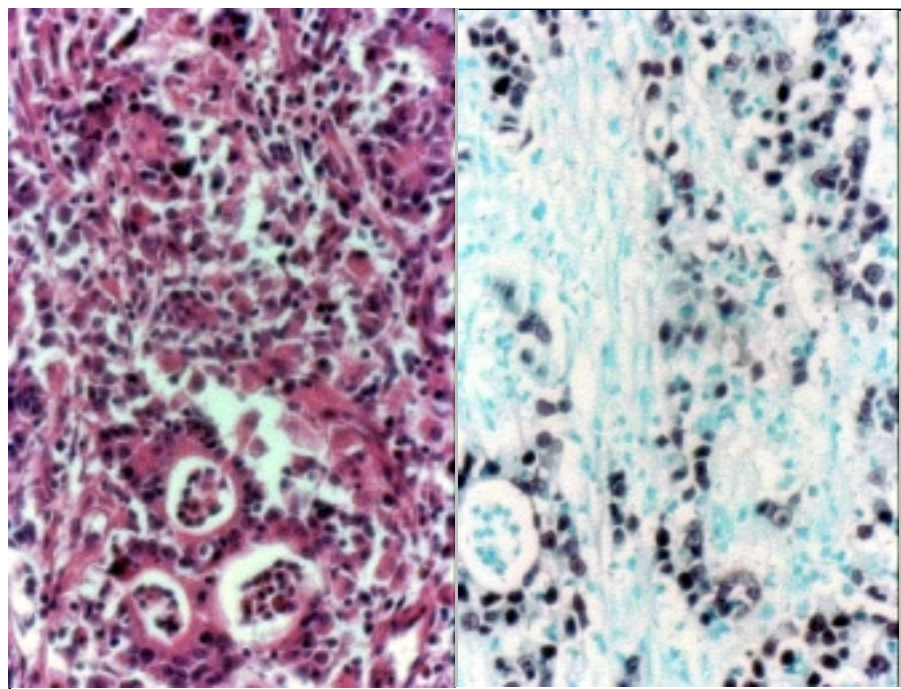


Figura 1. Adenocarcinoma difuso tipo predominante sólido con escasa formación de estructuras glandulares (1A, hematoxilina-eosina x 400). La hibridación *in situ* para ARN no poliadenilado del VEB (EBER-1) revela positividad nuclear (1B, x 400) (Caso 9).

vo para VEB. Hubo mayor positividad entre los localizados en cardias (16.6%) y en tercio medio gástrico (14.3%) (Cuadro 2).

Tipo histológico. Se encontraron 46 casos de tipo intestinal y 53 del tipo difuso. No hubo casos con morfología tipo "linfopitelioma". El Cuadro 3 muestra los diferentes tipos histológicos encontrados y aquellos positivos para el virus. Igual número de casos positivos para VEB se encontraron entre los de tipo difuso e intestinal.

Cuadro 3
Frecuencia de adenocarcinoma gástrico positivo para VEB por tipo histológico

	VEB+/Total	%
Tipo Intestinal	5/46	10.86
<i>tub1</i>	1/21	4.76
<i>tub2</i>	4/25	16.0
Tipo Difuso	5/53	9.43
<i>sólido</i>	4/27	14.81
<i>no-sólido</i>	0/15	0.0
<i>anillo</i>	1/7	16.32
<i>muc</i>	0/4	0.0
Total	10/99	10.1

tub1: tubular bien diferenciado; *tub2*: tubular moderadamente diferenciado; *sólido*: mal diferenciado, tipo sólido; *no-sólido*: mal diferenciado, tipo no sólido; *anillo*: de células en "anillo de sello"; *muc*: mucinoso

Profundidad de invasión. Cuatro casos positivos en las 31 muestras endoscópicas carecían de información sobre el nivel de invasión. En todos los 6 casos positivos encontrados en los 68 pacientes restantes, el carcinoma invadía hasta serosa (Cuadro 4). No se encontraron casos VEB positivos entre los 5 cánceres tempranos de esta serie, que incluía el único cáncer postgastrectomía, un adenocarcinoma tubular bien diferenciado intramucoso.

DISCUSIÓN

El VEB fue inicialmente conocido por su linfotropismo hacia células B, pero ahora se sabe de su capacidad para

Cuadro 2
Frecuencia de adenocarcinoma gástrico positivo para VEB por localización y género

	Total		Masculino		Femenino	
	VEB+/Total	%	VEB+/Total	%	VEB+/Total	%
Total	10/99	10.1	9/66	13.6	1/33	3.0
Cardias	2/12	16.6	1/6	16.7	1/6	16.6
Cuerpo	4/28	14.3	4/19	21.1	0/9	0.0
Antro	1/32	3.1	1/21	4.8	0/11	0.0
Remanente	0/1	0.0	0/1	0.0	0/0	0.0
Sin dato	3/26	11.5	3/19	15.8	0/7	0.0

infectar células T y células epiteliales¹². La infección de linfocitos B ocurre a través del receptor del complemento CD21 expresado por estas células, mediada por glicoproteínas de la superficie viral. Un receptor similar se ha encontrado en una fracción de células T inmaduras, pero se ha descrito otro receptor para VEB en líneas celulares linfoblastoides T cultivadas. La infección de células epiteliales es menos conocida. Aunque se sabe que el epitelio faríngeo y ectocervical expresan moléculas semejantes a CD21, es probable que otros receptores participen en este proceso.

El VEB es la causa de la mononucleosis infecciosa y se ha implicado estrechamente en la génesis de algunos tipos de linfoma, pero también se ha asociado con neoplasias malignas epiteliales. La faringe es el sitio más común de carcinoma con infiltrado linfoide abundante, un tipo de carcinoma indiferenciado llamado "linfopitelioma", que fue la primera clase de neoplasia epitelial asociada con VEB. Este tipo de morfología se ha hallado también en órganos como estómago, glándula salival, pulmón, timo, cérvix uterino, cavidad oral, piel y vejiga urinaria, lo cual ha alentado la búsqueda

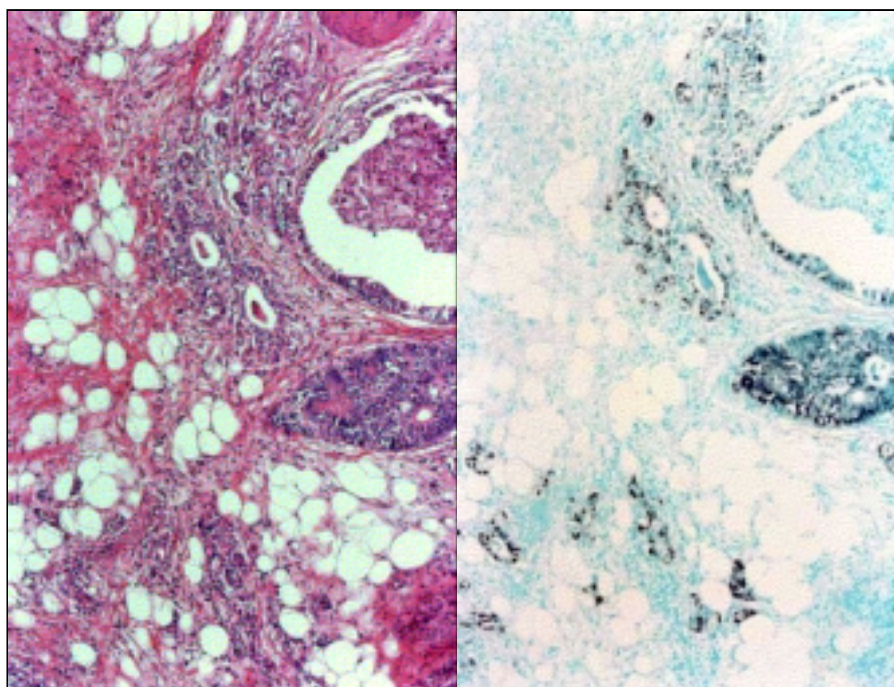


Figura 2. Adenocarcinoma tipo difuso de células en "anillo de sello" (2A, hematoxilina-eosina x 400). Hibridación *in situ* con positividad nuclear (1B, x4 00) (Caso 3).

de VEB en esos sitios, a sabiendas de que casi todos los carcinomas nasofaríngeos analizados en el mundo han mostrado el genoma del VEB, independiente de la variación geográfica de la incidencia de este carcinoma. Sin embargo, la asociación definitiva con el virus sólo es concluyente en "linfoepiteliomas" de estómago, glándula salival, pulmón y timo¹¹.

La primera descripción de carcinoma gástrico con infiltrado linfoide fue publicada en 1976¹³. Al disponerse de técnicas biomoleculares para el hallazgo del VEB a principios de la década de 1990, se inició su búsqueda en este tipo de neoplasia gástrica indiferenciada¹⁴⁻¹⁸. Sin embargo, no todos los carcinomas gástricos por VEB positivos son del tipo "linfoepitelioma". Se ha encontrado también positividad en casos bien diferenciados del tipo papilar y tubular^{2,3}. Por otro lado, si bien la mayoría de los casos del tipo "linfoepitelioma" gástrico son positivos, en una pequeña proporción de ellos no se ha podido hallar el virus¹¹.

En la presente serie se obtuvo una tasa de positividad de 10.1%, cercana a la observada en Taiwan⁴. La tasa de positividad más baja 6.9%, se ha informado en Japón³ y las más altas, en Alemania, 18%⁵ y los Estados Unidos, 16%². La predominancia de varones entre los casos de VEB positivos es un hallazgo que ha sido descrito¹⁹ como también la mayor frecuencia de positividad entre los adenocarcinomas proximales gástricos³. No predominó ninguno de los dos mayores tipos histológicos de importancia epidemiológica, intestinal y difuso entre todos los casos y entre los positivos para el virus. Es llamativo que no se haya encontrado ningún linfoepitelioma en esta serie, lo cual merece estudios posteriores para establecer la frecuencia de esta morfología en Colombia, tanto en estómago como en otros sitios.

Los agentes etiopatogénicos que intervienen en la aparición del cáncer gástrico permanecen sin aclarar. La die-

Cuadro 4
Casos EBV positivos

Invasión	Género/Edad Caso	Tipo de material		Sitio del tumor		Tipo histológico	
		Biopsia	Gastrectomía	Cardias	Cuerpo	tub1	tub2
1	M/43	X		Sin dato		tub2	NA
2	M/77	X		Sin dato		solid	NA
3	M/45	X		Cardias		sig	NA
4	M/77	X		Cuerpo		solid	NA
5	M/77		X	Sin dato		tub1	Serosa
6	M/55		X	Antro		tub2	Serosa
7	M/68		X	Cuerpo		tub2	Serosa
8	M/49		X	Cuerpo		solid	Serosa
9	F/49		X	Cardias		solid	Serosa
10	M/67		X	Cuerpo		tub2	Serosa

NA: No aplicable (biopsia endoscópica)

ta y la infección crónica por *Helicobacter pylori* son los eventos a los que se les ha atribuido un mayor papel²⁰, pero otros factores pueden contribuir, entre ellos el VEB, que parece ser importante en la génesis de por lo menos 10% del total de los adenocarcinomas gástricos hasta ahora estudiados en todo el mundo. El virus se ha encontrado en todas las células infectadas tanto en carcinomas tempranos intramucosos como en los más avanza-

dos, lo cual sugiere su presencia desde las fases tempranas de la carcinogénesis. Recientemente se encontró en la mucosa gástrica con cambios precancerosos en un paciente con carcinomas tempranos gástricos múltiples sincrónicos²¹. La asociación apenas ha empezado a ser estudiada en esta década y se está acumulando abundante información que conduciría a entender la relación del VEB con la célula epitelial y su influencia en la carcinogénesis gástrica,

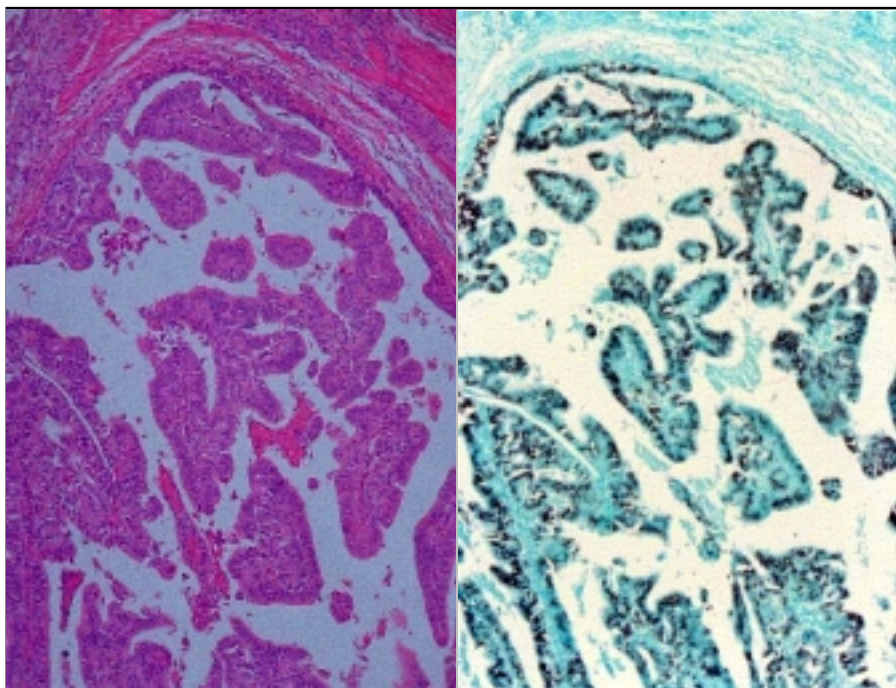


Figura 3. Adenocarcinoma tipo intestinal de variedad bien diferenciada tubular y papilar (3A, hematoxilina-eosina x 100). Hibridación *in situ* con positividad nuclear (1B, x 100) (Caso 10).

como también la relación con los otros agentes implicados en la aparición del cáncer gástrico.

SUMMARY

Ninety nine consecutives cases of gastric adenocarcinoma from the Hospital Universitario del Valle Department of Pathology at Cali, Colombia, were tested to search for Epstein-Barr virus in the malignant epithelial cell by *in situ* hybridization for EBV-encoded small non-polyadenylated RNA-1 (EBER-1). The material included 66 males (median age: 62 years) and 33 females (median age: 60 years). There were 46 intestinal type of gastric adenocarcinoma and 53 of the diffuse type, with no lymphoepithelioma-like cases. Ten patients were positive for EBV (10.1%), 9 males and 1 female. The positive cases were 5 intestinal and 5 diffuse types. Our study and those other done in the whole world show that EBV is etiologically associated with at least 10% among all gastric adenocarcinomas. Further studies will be necessary to understand the interaction between EBV and epithelial gastric cell and the relationship with other agents implicated in gastric carcinogenesis.

REFERENCIAS

- Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In *Fields virology*. Fields BN, Knipe DM, Howley PM *et al.* (eds.). Philadelphia; Lippincott-Raven Pub., 1996. Pp. 2397-445.
- Shibata D, Weiss LM. Epstein-Barr virus associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1992; 140: 769-74.
- Tokunaga M, Land C, Uemura Y, *et al.* Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 1250-54.
- Harn JH, Chang JY, Wang MW, *et al.* Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma in Taiwan. *Hum Pathol* 1995; 26: 267-71.
- Ott G, Kirchner TH, Muller-Hermelink HK. Monoclonal Epstein-Barr virus genomes but lack of EBV-related protein expression in different types of gastric carcinoma. *Histopathology* 1994; 25: 323-29.
- Parkin DM, Läärä E, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer* 1988; 41: 184-97.
- Medina M. *Atlas de mortalidad por cáncer, Colombia 1990*. Vol I. Bogotá; Instituto Nacional de Cancerología, 1994.
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J (eds.). *Cancer incidence in five continents*. Vol. VII. Lyon; IARC Scientific publications N° 143. 1997.
- MacMahon E, Glass JD, Hayward SD, *et al.* Epstein-Barr virus in AIDS-related central nervous system lymphoma. *Lancet* 1991; 338: 969-73.
- Japanese Research Society for Gastric Cancer*. Japanese classification of gastric carcinoma. Tokyo; Kanehara & Co. Ltd., 1995.
- Iezzoni JC, Gaffey MJ, Weiss LM. The role of Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 308-15.
- Uno M. EBV infection mechanism to human cells. In *Epstein-Barr virus and human cancer*. Isato T, Takada K, Tokunaga M (eds.) Monograph on cancer research N° 45. Tokyo; Japanese Cancer Association. Japan Scientific Association Press, 1998. Pp. 41-50.
- Watanabe H, Enjoji M, Imai T. Gastric carcinoma with lymphoid stroma: its morphologic characteristics and prognostic correlations. *Cancer* 1976; 38: 232-43.
- Burke AP, Yen TSB, Shekitka KM, Sobin LH. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 1990; 3: 337-80.
- Min K, Holmquist S, Peiper SC, O'Leary TJ. Poorly differentiated adenocarcinoma with lymphoid stroma (lymphoepithelioma-like carcinomas) of stomach. Report of three cases with Epstein-Barr virus genome demonstrate by polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1991; 96: 219-27.
- Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y, *et al.* Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. *Am J Pathol* 1991; 139: 469-74.
- Pittaluga S, Loke SL, So KC, Cheung KN, Ma L. Clonal Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinomas of the stomach: demonstration of viral genome by *insitu* hybridization and Southern blot analysis. *Mod Pathol* 1992; 5: 661-64.
- Oda K, Tamaru J, Takenouchi T, *et al.* Association of Epstein-Barr virus with gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Am J Pathol* 1993; 143: 1063-71.
- Tokunaga M, Uemura Y, Tokudome T, *et al.* Epstein-Barr virus related gastric cancer in Japan: a molecular pathoepidemiological study. *Acta Pathol Jpn* 1993; 43: 574-81.
- Correa P. The epidemiology of gastric cancer. *World J Surg* 1991; 15: 228-34.
- Arikawa J, Tokunaga M, Tashiro Y, *et al.* Epstein-Barr virus-positive multiple early gastric cancer and dysplastic lesions: a case report. *Pathol Int* 1997; 47: 730-34.