

DETERMINACIÓN GENÓMICA DE VIRUS DE EBSTEIN-BARR

EN TUMORES DEL TRACTO AERODIGESTIVO SUPERIOR

JOSÉ GREGORIO PONCE¹, HENRY LARES¹, DENISE MATTAR², MARÍA CORRENTI², MAYRA ÁVILA²

¹ SERVICIO DE CABEZA Y CUELLO, INSTITUTO ONCOLÓGICO "DR. LUIS RAZETTI". ² LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR, INSTITUTO DE ONCOLOGÍA Y HEMATOLOGÍA, UCV. CARACAS

RESUMEN

OBJETIVO: El virus de Epstein-Barr se encuentra en relación directa con algunas neoplasias como los linfomas y el carcinoma indiferenciado de nasofaringe. Más recientemente se han reportado la presencia del genoma viral en tumores similares a linfocarcinomas de otras localizaciones como estómago, hígado, mama y pulmón. **MÉTODOS:** Fueron tomadas muestras en fresco de pacientes con tumores localizados en tracto aerodigestivo superior entre enero y junio de 2006. Se determinó el genoma viral. **RESULTADOS:** Dieciocho de 41 muestras eran positivas para virus, 23 negativas. Trece de los tumores malignos resultaron positivos para el genoma del virus mientras que el 48,1 % restante resultaron negativos. La presencia del genoma viral fue encontrada en 8 muestras de laringe, 4 de nasofaringe, 2 de senos piriformes y en 1 de cada una de los siguientes sitios: fosas nasales, mucosa yugal, amígdala, y antro maxilar. **DISCUSIÓN:** A pesar del número limitado de muestras tomadas en algunas de las localizaciones mencionadas en este trabajo, pudimos encontrar el genoma viral en sitios como laringe, fosas nasales y cavidad oral. La mayor parte de los tumores malignos eran carcinomas escamosos, sólo 2 muestras correspondían a linfocarcinomas. **CONCLUSIÓN:** El genoma del virus puede ser identificado en muestras tomadas en fresco de tumores del tracto aerodigestivo superior tales como en carcinomas escamosos de laringe, fosas nasales, cavidad oral y faringe. Es necesario realizar más estudios para poder identificar la posible relación que existe entre este virus y dichos tumores.

PALABRAS CLAVE: Epstein-Barr, virus, neoplasmas, cabeza, cuello, carcinoma, nasofaríngeo.

SUMMARY

OBJECTIVE: The Epstein-Barr virus is been related with many malignancies as lymphoma and nasopharyngeal undifferentiated carcinoma. More recently, the presence of viral genome had been reported in some similar tumors how the lymphoepithelioma in other localizations for example the stomach, the liver, the breast and lung. **METHODS:** From January to June 2006, we had taken fresh from the patient's superior aero digestive tumors samples. The Epstein-Barr viral genome was determined by the Polymerasa Chain Reaction. **RESULTADOS:** From 41 samples of tumors, 18 were viruses positive and 23 of them were viruses negative. Thirteen malignant tumors were positive for the viruses genome and the rest ant other 48.1 % were negative. In eight larynxes, 4 nasopharyngeal, 2 piriform sinuses and some of this localization: nasal cavity, oral yugal mucosa, tonsil and maxillary sinus, and samples the viral genome of Epstein Barr was present. **DISCUSION:** Although, we had a limited number of sample in some regions mentioned in these work, we could determine the viral genome of Epstein Barr in some sites how larynx, nasal and oral cavity. The majority of malignant tumors were squamous cell carcinoma, only two of them were correspondent to lymphoepithelioma. **CONCLUSION:** The Epstein-Barr viral genome may be identified in fresh superior aero digestive tumors samples, like in squamous cell carcinoma of the larynx, the oral cavity, nasal cavity and in the pharynx. Further studies are necessary to identify the probability relation between this virus and these tumors.

KEYWORDS: Epstein-Barr, virus, head, neck, neoplasm, nasopharyngeal, carcinoma.

Recibido: 07/05/2007 Revisado: 22/06/2007
Aceptado para publicación: 24/07/2007

Correspondencia: Dr. José Gregorio Ponce
Servicio de Cabeza y Cuello. Instituto Oncológico "Dr.
Luis Razetti".
Calle Real de Cotiza. San José. Teléfonos.
0(041233888334. E- mail:henryrla@cantv.net

INTRODUCCIÓN

El virus de Epstein-Barr (VEB), es un virus ADN de la familia herpesviridae, cuyo genoma está recubierto por una cápside viral compuesta principalmente por la glicoproteína gp350, la cual es la que permite su unión al receptor CD21 de la membrana celular de los linfocitos B⁽¹⁾. Teniendo como puerta de entrada el epitelio del tracto aerodigestivo superior, este virus es el agente causal de la mononucleosis infecciosa. La infección de las células B se caracteriza por ser una infección latente, volviendo a esta inmortal y permitiendo que produzca su genoma viral para constituir nuevos virus.

Es bien conocido que el VEB se encuentra en relación directa con algunas neoplasias tales como los linfomas de Burkitt, enfermedades linfoproliferativas en pacientes receptores de trasplantes y el carcinoma indiferenciado de nasofaringe^(2,3).

Más recientemente se han reportado la presencia del genoma viral en tumores similares a linfopiteliomas de otras localizaciones tales como estómago, sistema nervioso central, hígado mama, pulmón colon, esófago y vías biliares. Esta determinación se realiza por lo general con reacción de cadena de polimerasa (PCR) o hibridación *in situ*, evaluando los bloques de parafina de las biopsias de dichos pacientes con técnicas de inmunohistoquímica⁽⁴⁻¹⁵⁾.

El objetivo de la presente investigación es determinar la presencia del genoma del VEB en las muestras en fresco tomadas a pacientes con tumores del tracto aerodigestivo superior y así determinar la probable relación del VEB con otras neoplasias diferentes al carcinoma nasofaríngeo.

MÉTODOS

Se evaluaron de manera prospectiva los

pacientes del Servicio de cabeza y cuello del Hospital Oncológico "Dr. Luis Razetti". Las muestras fueron tomadas en fresco de pacientes con tumores localizados en tracto aerodigestivo superior (fosas nasales, nasofaringe, orofaringe, cavidad oral y laringe), en el período comprendido entre enero y junio del año 2006. De igual manera se registraron los datos clínicos y patológicos de las historias clínicas de dichos pacientes.

Una vez tomadas las muestras eran almacenadas a -70° C, hasta ser procesadas en el laboratorio de genética molecular del Instituto de Oncología y Hematología de la Universidad Central de Venezuela.

El primer paso para el procesamiento de las muestras fue la extracción de ADN de los tejidos. Este proceso se realizó en tres días, utilizando proteinasa K y ciclos sucesivos de dilución y centrifugación. Una vez obtenido el ADN, la detección del virus Epstein-Barr, se realizó mediante un Nested PCR utilizando dos sets de primers. La primera ronda de amplificación, se llevó a cabo en un volumen de 25 µl utilizando los oligonucleótidos W1- W2. Una vez finalizada esta primera ronda de amplificación, estos productos se sometieron a una segunda ronda de amplificación utilizando los primers W3 y W4. El producto amplificado se visualizaba en un gel de agarosa al 3 % teñido con bromuro de etidio. Una muestra se consideró positiva, cuando se observó en el gel una banda de 192 pb correspondiente al amplificado del VEB.

Una vez realizada la determinación genómica, los resultados fueron registrados y analizados como sigue.

RESULTADOS

Se recolectaron un total de 48 muestras en 45 pacientes intervenidos quirúrgicamente en el período estudiado. De estas se estudiaron adecuadamente 41 muestras. El promedio de

edad de los pacientes era de 55 años, la mayor parte eran del sexo masculino (75,6 %) y el 80,5 % refería hábitos tabáquicos y alcohólicos.

En cuanto a la localización de las muestras tomadas, 19 (46,3 %) eran de laringe, 7 (17 %) de nasofaringe, 3 (7,3 %) de fosas nasales, 2 (4,8 %) de amígdalas, 2 de lengua, 2 de mucosa yugal, 2 de paladar y 2 de senos piriformes. Por último se tomó una muestra de antro maxilar y otra de mandíbula (2,4 %). Su positividad o no al virus está representada en el (Cuadro 1).

La gran mayoría de las muestras correspondían, en el estudio anatomopatológico definitivo, a lesiones tumorales malignas (75,6 %), sólo 10 de estas eran lesiones benignas. De las lesiones malignas, 24 (77,4 %) correspondían a carcinomas escamosos y el resto (22,6 %) a otras histologías tales como linfopiteliomas, carcinoma adenoideo quístico, carcinoma basocelular, carcinoma ameloblástico y un carcinoma papilar de tiroides lingual. Las lesiones benignas eran en su mayoría nódulos laríngeos, acantosis y papilomatosis de la mucosa faríngea y 2 hiperplasias de tejido linfoide en amígdala y nasofaringe. En cuanto a la determinación del genoma viral, encontramos que 18 de las 41 muestras (43,9 %) eran positivas para VEB y 23 (56,1 %) eran negativas. Trece de los tumores malignos resultaron positivos para el genoma del VEB (41,9 %), mientras que el 48,1 % restante (18 muestras) resultaron negativas. La mitad de las lesiones benignas tuvieron presente el ADN del VEB y la otra mitad fue negativa para esta determinación. De acuerdo a la localización anatómica, la presencia del genoma viral fue encontrada en 8 muestras de laringe (7 malignas y 1 benigna), 4 de nasofaringe (3 malignas), 2 de senos piriformes y en 1 de cada una de las siguientes sitios: fosas nasales, mucosa yugal, amígdala, y antro maxilar. Las dos primeras correspondían a carcinomas escamosos y las dos últimas a lesiones benignas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Localización anatómica de las muestras y resultado de la detección genómica para VEB en tumores del tracto aerodigestivo superior

	Lesiones benignas		Lesiones malignas		Total
	VEB +	VEB -	VEB +	VEB -	
Laringe	1	4	7	7	19
Nasofaringe	1	1	3	2	7
Fosas nasales			1	2	3
Amígdalas	1			1	2
Lengua				2	2
Mucosa yugal			1	1	2
Paladar				2	2
Senos piriformes	1		1		2
Antro maxilar	1				1
Mandíbula				1	1
Total	5	5	13	18	41

DISCUSIÓN

El VEB se ha implicado en la carcinogénesis de algunas neoplasias de cabeza y cuello tales como el carcinoma indiferenciado de nasofaringe y los linfomas de Hodgkin⁽¹⁻³⁾. Múltiples son las descripciones de la determinación del genoma viral, por técnicas de inmunohistoquímica, hibridación *in situ*, PCR o *Southern Blot*, tanto en el plasma como en los bloques de parafina de las biopsias de pacientes con dichas lesiones. Sin embargo, en la bibliografía revisada hay muy pocos reportes de detección del ADN del VEB en muestras tomadas en fresco⁽⁹⁻¹⁶⁾. Para esto, una vez tomada y preservada la muestra, se extrajo el ADN de las células y se amplificó por reacción de cadena de polimerasa, logrando así identificarlo en los especímenes examinados. A pesar de ser la más sensible y específica, el inconveniente de esta técnica es la incapacidad para determinar si el genoma identificado proviene de las células tumorales o de los linfocitos B que rodean al tejido tumoral⁽¹⁷⁾.

En el período estudiado de manera prospectiva, se recolectaron las muestras de lesiones, tanto benignas como malignas, no sólo de nasofaringe, sino también de fosas nasales, antro maxilar, cavidad oral y laringe, tratando de buscar el VEB en otras localizaciones. En la literatura se ha buscado y descrito este virus en esófago, estómago, hígado, vía biliar, mama, pene y pulmón tratando de demostrar su relación con las neoplasias de estos órganos. No encontramos trabajos que lo investigaran en otros tumores de cabeza y cuello, además del carcinoma nasofaríngeo. A pesar del número limitado de muestras tomadas en algunos de las localizaciones mencionadas en este trabajo, pudimos encontrar el genoma viral en sitios como laringe, fosas nasales y cavidad oral. También es importante resaltar que de las 41 muestras, 5 eran lesiones benignas y resultaron positivas para el VEB. Fan y col.⁽¹⁸⁾ identificaron algunas de las proteínas codificadas por los genes del VEB en muestras de lesiones benignas y malignas de nasofaringe, así como en tejidos normales.

La mayor parte de los tumores malignos eran carcinomas escamosos, sólo 2 muestras correspondían a linfoepiteliomas. En nuestro

medio estos últimos son mucho menos frecuentes que otras regiones del mundo como Asia o África, pero es igual de cierto que la presencia del VEB es mucho menor en lesiones escamosas puras. Por esta causa, así como la afinidad del VEB por los linfocitos B, los otros subtipos histológicos resultaron negativos para la determinación genómica.

Es preciso recolectar un mayor número de muestras para poder hacer un análisis adecuado de cómo la presencia de este virus en los tejidos del tracto aerodigestivo superior puede afectar su capacidad para desarrollar neoplasias.

El VEB está relacionado con algunas de las neoplasias del tracto aerodigestivo superior y su genoma puede ser identificado en muestras tomadas en fresco de otras lesiones tumorales diferentes al carcinoma nasofaríngeo indiferenciado, tales como en carcinomas escamosos de laringe, fosas nasales, cavidad oral y faringe. También se le puede encontrar en algunas lesiones benignas en dichas localizaciones. Es necesario realizar más estudios con un mayor número de pacientes y de muestras para poder identificar la posible relación que existe entre este virus y los tumores del tracto aerodigestivo superior.

REFERENCIAS

1. Cohen J. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med.* 2000;347(7):481-492.
2. Ambinder R, Lemas M, Moore S, Yang J, Fabian D, Krone C. Epstein-Barr virus and lymphoma. *Cancer Treat Res.* 1999;99:27-45.
3. Niedobitek G, Hansmann M, Herbst H, Young I, Dienemann D, Hartmann C, et al. Epstein-Barr virus, and carcinomas: Undifferentiated carcinomas but not squamous cell carcinomas of the nasopharynx are regularly associated with the virus. *J Pathol.* 1991;165:17-24.
4. Oda K, Koda K, Takiguchi N, Nunomura M, Seine K, Miyazaki M. Detection of Epstein-Barr virus in gastric carcinoma cells and surrounding lymphocytes. *Gastric Cancer.* 2003;6:173-178.
5. Grinstein S, Preciado M, Gattuso P, Chabay P, Warren W, De Matteo E, et al. Demonstration of Epstein-Barr Virus in Carcinomas of Various Sites. *Cancer Res.* 2002;62:4876-4878.
6. MacMahon E, Glass J, Hayward S, Mann R, Becker P, Charache P, et al. Epstein-Barr virus in AIDS related primary central nervous system lymphoma. *Lancet.*

- 1991;338:969-973.
7. Sugawara Y, Mizugaki Y, Uchida T, Torii T, Imai S, Makuuchi M, et al. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in hepatocellular carcinoma tissue: A novel EBV latency characterized by the absence of EBV-encoded small RNA expression. *Virology*. 1999;256:196-202.
 8. Labrecque L, Barnes D, Fentiman I, Griffin B. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: A breast cancer study. *Cancer Res*. 1995;55:39-45.
 9. Bonnet M, Guinebretiere J, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, et al. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91:1376-1381.
 10. Wong M, Chung L, Yuen S, Leung S, Chan S, Wang E, et al. In situ detection of Epstein-Barr virus in non-small cell lung carcinomas. *J Pathol*. 1995;177:233-240.
 11. Han A, Xiong M, Gu Y, Lin S, Xiong M. Lymphoepithelioma like carcinoma of the lung with a better prognosis. A clinicopathologic study of 32 cases. *Am J Clin Pathol*. 2001;115:841-850.
 12. Castro C, Ostrowski M, Barrios R, Green L, Popper H, Powell S, et al. Relationship between Epstein Barr virus and lymphoepithelioma like carcinoma of the lung: A clinicopathologic study of six cases and review of the literature. *Hum Pathol*. 2001;32: 863-872.
 13. Samaha S, Tawfik O, Horvat R, Bhatia P. Lymphoepithelioma-Like carcinoma of the colon. Report of a case with histological, immunohistochemical, and molecular studies for Epstein - Barr virus. *Dis Colon Rectum*. 1998;41:925-928.
 14. Chen P, Pan C, Hsu W, Ka H, Yang A. Epstein-Barr Virus-associated lymphoepithelioma-like carcinoma of the esophagus. *Hum Pathol*. 2003;34:407-410.
 15. Jeng Y, Chen C, Hsu H. Lymphoepithelioma-Like Cholangiocarcinoma. An Epstein-Barr Virus-Associated Tumor. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(4):516-520.