

DETECCIÓN DE VIRUS EPSTEIN BARR EN PACIENTES CON CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

DAYAHINDARA VEITÍA, JUAN LIUZZI, MARÍA CORRENTI, MAIRA ÁVILA, ZORAYA DE GUGLIELMO, SAÚL SISO, MARIBEL DA CUNHA

INSTITUTO DE ONCOLOGÍA Y HEMATOLOGÍA-MPPS. HOSPITAL ONCOLÓGICO "PADRE MACHADO"

RESUMEN

OBJETIVO: La primera y más importante causa de cáncer en las vías aerodigestivas superiores es el hábito tabáquico y el riesgo es proporcional a la intensidad de la exposición. Investigadores han detectado al virus Epstein Barr en carcinoma de células escamosas de la mucosa oral, hipofaringe y tumores de laringe lo que ha sugerido un posible rol de este virus en el desarrollo de malignidad en el tracto aerodigestivo, en este estudio se planteó detectar la presencia del genoma del VEB y evaluar su posible asociación con el desarrollo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. **MÉTODO:** Se evaluaron 50 biopsias de pacientes con diagnóstico histológico, la mayoría correspondía a pacientes del sexo masculino con un promedio de edad de $61,43 \pm 13,71$ años. Se realizó la extracción de ADN mediante cloroformo: fenol con precipitación en etanol. La presencia de VEB fue detectada mediante PCR-anidada y los productos de amplificación fueron observados en geles de agarosa al 3 % teñidos con SYBER safe. **RESULTADOS:** El 44 % de las biopsias estudiadas presentó el genoma del VEB, donde la localización anatómica con mayor positividad fue la cavidad oral (40,90 %), seguida de la laringe y la orofaringe. **CONCLUSIONES:** Es importante resaltar que el 68,18 % de los casos positivos se encontraba en estadios avanzados de la enfermedad lo que pudiera sugerir una mayor presencia del genoma viral en lesiones que han progresado y que presentan un peor pronóstico.

PALABRAS CLAVE: Cáncer, cabeza y cuello, detección, VEB.

SUMMARY

OBJECTIVE: The first and the most important cause of cancer in upper aero digestive tract are the smoking and the risk is proportional to the intensity of the exposure to tobacco. Researchers have detected the Epstein Barr Virus in squamous cell carcinoma of the oral mucosa, the hypopharynx and the larynx tumors has suggested a possible role of this virus in the development of malignancy in the aero digestive tract in this study pose the presence of Epstein Barr Virus genome and the assess their possible association with the development of the squamous cell carcinoma of head and neck. **METHOD:** We evaluated 50 biopsies of patients with histological diagnosis of head and cancer most were male patients with a mean age of 61.43 ± 13.71 years old. We performed the DNA extraction using chloroform: phenol with ethanol precipitation. **RESULTS:** The presence of EBV was detected by nested PCR amplification products were observed in agarose gels stained with 3 % SYBER safe. In 44 % of the biopsies studied they showed the Epstein Barr virus genome, where more positive anatomical location was the oral cavity (40.90 %), followed by the larynx and the oropharynx. **CONCLUSIONS:** It is important to note that 68.18 % of the positive cases were in advanced stages of disease that might suggest a greater presence of the viral genome in lesions that have progressed and have a poorer prognosis.

KEY WORDS: Cancer, head, neck, detection, VEB.

Recibido: 15/11/2014 Revisado: 13/04/2015

Aceptado para publicación: 20/05/2015

Correspondencia: Dra. Dayahindara Veitía. Instituto

de Oncología y Hematología. (MPPS), UCV, Caracas, Venezuela. E-mail: dayah_20@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un importante problema de salud en todo el mundo y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños y adultos; se origina por la proliferación descontrolada y la diseminación de clones de células transformadas, las cuales pueden producir metástasis en localizaciones distantes ⁽¹⁾. Esta patología incluye al cáncer de cabeza y cuello, término que abarca muchos tipos diferentes de cáncer y la conducta de un tipo particular depende de la ubicación del tumor primario ⁽²⁾. Cada año, hay un estimado de 45 000 nuevos casos de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCC) en los EE.UU.; datos alrededor del mundo indican que esta estadística es mucho mayor, especialmente en Europa, India y Hong Kong ⁽³⁾. Estas malignidades constituyen aproximadamente el 7 % de todas las neoplasias, siendo la cuarta causa de muerte por cáncer en el varón. Una característica de estos tumores es su heterogeneidad, que no solo es histológica, sino que comprende distintos aspectos epidemiológicos y etiológicos, diferentes formas clínicas de presentación y progresión, así como diversos enfoques terapéuticos y pronósticos ⁽⁴⁾. Por otro lado, cada año se diagnostican 650 000 casos de CCC alrededor del mundo y mueren aproximadamente 350 000 a causa de esta malignidad ⁽⁵⁾. En nuestro país según las estadísticas descritas en el anuario de mortalidad de MPPS se describe a los tumores de los órganos respiratorios como causantes del 2,95 % de las muertes para el año 2008.

La gran mayoría de CCC se presenta en varones, aunque hay una proyección a futuro que estima un aumento en el número de casos principalmente en personas jóvenes y en el género femenino, debido fundamentalmente

a la más reciente incorporación a prácticas de riesgo como el consumo de alcohol y tabaco. En relación con la edad, se ha reportado que la incidencia de CCC es mayor a partir de los 50 años, aunque pueden verse a partir de la tercera década de la vida ^(4,6). El tipo más común es el carcinoma de células escamosas, el cual procede de tejidos epiteliales como la piel de los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales ⁽⁴⁾.

La primera y más importante causa de cáncer de las vías aerodigestivas superiores es el hábito tabáquico. Se estima que entre 85 % y 90 % de los casos de cáncer de cabeza y cuello son explicados por la exposición al tabaco y el riesgo es proporcional a la intensidad de la exposición. Desafortunadamente, se prevé un incremento en la incidencia de estas neoplasias, porque desde hace algunos años se ha registrado un importante aumento en la frecuencia de tabaquismo, principalmente entre los individuos jóvenes y mujeres ⁽⁷⁾.

El consumo de alcohol es otro de los factores más importantes asociado al cáncer en seres humanos, después del tabaquismo, las infecciones crónicas y, posiblemente, la obesidad ⁽⁸⁾.

Sin embargo, el cáncer en la nasofaringe no parece estar asociado al tabaco y al alcohol. En esta localización anatómica, el virus de Epstein-Barr (EBV) es detectado consistentemente en los carcinomas de regiones con alta y baja prevalencia, lo que sugiere que la infección y sus efectos son un importante factor epidemiológico. Además, los virus del herpes simple, factores nutricionales, higiene bucal, predisposición genética, y factores ocupacionales también han sido señalados como factores de riesgo en el CCC ^(9,10).

En base a reportes realizados por diferentes autores en las últimas décadas, y en vista del problema de salud pública que representa este tipo de cáncer, el presente trabajo se planteó detectar la presencia del genoma del VEB y evaluar su posible asociación con el desarrollo de carcinoma

de células escamosas de cabeza y cuello.

MÉTODO

La muestra estuvo conformada por 50 biopsias provenientes de pacientes con diagnóstico histológico de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, en diferentes estadios según la clasificación TNM; recolectadas en el Hospital Oncológico "Padre Machado". La mayoría de los pacientes correspondían al sexo masculino con un promedio de edad de $61,43 \pm 13,71$ años; estos casos estaban divididos en diferentes localizaciones anatómicas como laringe (32 %), cavidad oral (28 %), orofaringe (26 %), seno paranasal (8 %) y fosa nasal (4 %) (Cuadro 1). En la población evaluada, el 80 % (40/50) de los pacientes poseía el hábito de fumar y el 72 %

Cuadro 1. Distribución de los pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello según la localización anatómica del tumor

Localización anatómica	%
Laringe	32(16/50)
Cavidad oral	28(14/50)
Orofaringe	26(13/50)
Seno paranasal	8(4/50)
Fosa nasal	4(2/50)

Cuadro 2. Iniciadores para la detección del VEB.

Nombre del iniciador	Secuencia	Ronda de Amplificación
W1	5' CTA GGG GAG AAC GTG AA 3'	Primera
W2	5' CTG AAG GTG AAC CGC TTA CCA 3'	Primea
W3	5' GGT ATC GGG CCA GAG GTA AGT 3'	Segunda
W4	5' GCT GGA CGA GGA CCC TTC TAC 3'	Segunda

(36/50) eran consumidores de alcohol, mientras que el 12 % (6/50) no incurría en ninguna de estas prácticas.

Cada paciente incluido en este estudio expresó su aprobación mediante la firma de un consentimiento informado así como respondiendo a una encuesta evaluada y aprobada por el comité de bioética del Instituto de Biomedicina, la cual se encuentra enmarcada en el Proyecto FONACIT G-2005000408.

EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN, se siguió el protocolo descrito por Correnti y col.,⁽¹¹⁾. Se incubaron aproximadamente 25 mg de tejido 100 μ l de buffer de lisis (0,1 % sarcosina; 10 mM Tris HCl, pH 8) y 100 μ L de proteinasa K (1 mg/mL), durante, al menos, 3 h a 42 °C. El ADN fue extraído mediante separación v/v con cloroformo-fenol/isoamílico y precipitación con 2 ½ volúmenes de etanol absoluto frío y acetato de sodio (3M) y se resuspendió en agua libre de nucleasas.

DETECCIÓN DE VEB

La detección del VEB se realizó mediante una PCR anidada (*Nested-PCR*) descrita por Raab-Traub y col.⁽¹²⁾, empleando los iniciadores mostrados en el Cuadro 2.

La primera mezcla de reacción consistió en: 1X de buffer 10X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,6 mM

de dNTP's, 1U de Taq DNA polimerasa, 5 μ L de cada uno de los iniciadores (W1 y W2), 12 μ L de H₂O, y 7 μ L de ADN templado.

La amplificación se efectuó en un termociclador *Mastercycler[®] ep (Eppendorf)*, con una desnaturalización inicial de 94 °C durante 4 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 s, anillamiento a 66 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 45 s. Con una extensión final a 72 °C por 5 min.

Para la segunda ronda de amplificación se empleó una mezcla de reacción igual a la descrita anteriormente pero utilizando los iniciadores W3 y W4; a la cual se le agregaron 2 μ L de cada producto de la PCR anterior.

Los ciclos de amplificación consistieron en: desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 min. Seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 s, anillamiento a 66 °C por 30 s, y extensión a 72 °C por 45 s. Por último una extensión final a 72 °C durante 5 min.

El producto de esta segunda amplificación se observó en un gel de agarosa al 3 % teñido con *SYBR Safe (1X)*. Se consideraron positivas solo aquellas muestras en las que se observó una banda de 192 pb. Los gels fueron expuestos a luz UV para visualizar las bandas y fotografiados (*ChemiDocTM XRS+*) para su registro permanente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para evaluar la asociación de la presencia del VEB con el desarrollo de CCC en las muestras estudiadas, se aplicó una prueba de Chi cuadrado (X^2), utilizando como criterio para el rechazo de la hipótesis nula un P-valor < 0,05. Los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico *SPSS* versión 13.0

RESULTADOS

La Figura 1, corresponde a un gel de agarosa al 3 % teñido con *SYBR Safe (1X)* donde se observan

tres casos positivos para la infección viral, con un amplificado de aproximadamente 192 pb. Del total de muestras evaluadas se obtuvo que 44 % (22/50) presentó el genoma del VEB, donde la localización anatómica con mayor positividad fue la cavidad oral con un 40,90 % seguido de la laringe con 31,8 % y la orofaringe con un 27,27 % de positividad (Cuadro 3). Es importante

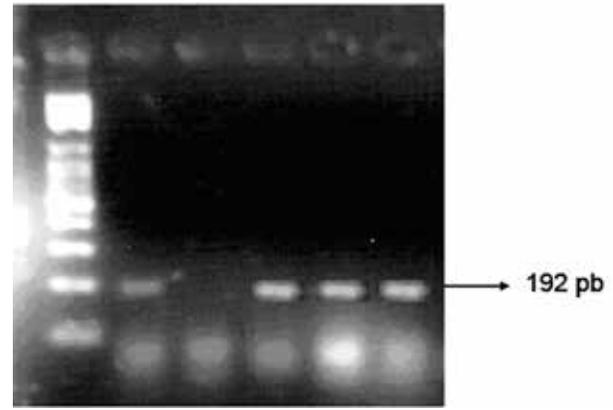


Figura 1. Detección de VEB mediante nested-PCR con primers W1-W2 para la primera amplificación y W3-W4 para la segunda amplificación. 1. Marcador de peso molecular (100 pb); 2. Control positivo; 3. Control negativo; Los carriles 4, 5 y 6 corresponden a muestras positivas donde se observa la banda de aproximadamente 192 pb.

Cuadro 3. Distribución de la infección por VEB detectados según la localización anatómica del tumor.

Localización	Pacientes Positivos
Anatómica	Para VEB %
Cavidad bucal	40,90 (9/22)
Laringe	31,8 (7/22)
Orofaringe	27,27 (6/22)
Seno paranasal	0
Fosa nasal	0
Total	100%

resaltar que el 68,18 % (15/22) de los casos positivos se encontraban en estadios avanzados de la enfermedad (datos no mostrados).

Al aplicar el contraste de independencia, no se encontraron evidencias suficientes que permitan concluir que existe asociación lineal entre la presencia de VEB y etiología del tumor en el conjunto de datos analizados ($P > 0,05$).

DISCUSIÓN

En este estudio se recolectaron muestras de lesiones malignas de diferentes localizaciones en el tracto aerodigestivo superior, obteniéndose la mayoría de estas de pacientes del género masculino con un promedio de edad superior a 60 años, lo cual concuerda con los resultados reportados por Arias y col.,⁽⁴⁾ cuyo trabajo demuestra que la incidencia de CCC es mayor a partir de los 50 años, aunque pueden presentarse a partir de la tercera década de la vida.

Aunque la mayoría de estos pacientes presentaba hábitos tabáquico y de consumo de alcohol es importante resaltar que el 12 % no incurría en ninguna de estas prácticas. Similarmente, De Petrini y col.,⁽¹³⁾ reportaron en un estudio realizado en pacientes con CCC que la incidencia de esta malignidad está fuertemente ligada al abuso en el consumo de alcohol y/o tabaco; sin embargo, entre el 15 %-20 % de dichos pacientes no tienen una historia de alcohol o tabaco conocida; este grupo puede incluir una gran porción de adultos jóvenes y mujeres, con posible exposición a otros factores como, por ejemplo, algunos virus asociados recientemente con el CCC⁽¹³⁾. Entre estos virus se puede mencionar al VEB, el cual es detectado consistentemente con alta y baja prevalencia, lo que sugiere que la infección por este virus y sus efectos son un importante factor epidemiológico en esta patología⁽¹⁴⁾.

Del total de casos evaluados se obtuvo que

44 % presentara el genoma viral. Estos resultados son comparables con los de una serie de trabajos realizados donde se ha detectado VEB tanto por inmunohistoquímica como por hibridación, cuyos reportes demuestran una positividad para dicho virus de aproximadamente 50 % que varía según la metodología empleada⁽¹⁴⁾. Es importante resaltar que la mayor positividad para VEB se encontró en estadios avanzados de la enfermedad lo que pudiera sugerir una mayor presencia del genoma viral en lesiones que han progresado y que presentan un peor pronóstico.

Por su parte, Cohen y col.,⁽¹⁵⁾ reportaron que el 100 % de los carcinomas anaplásicos o pobremente diferenciados contienen el genoma del VEB, el cual se encuentra en las células epiteliales transformadas. Los mismos autores han evaluado también títulos de IgA contra proteínas estructurales del virus, hallando títulos elevados, lo cual ha sido de gran ayuda en China para la detección precoz de carcinoma nasofaríngeo y para la valoración de la respuesta al tratamiento, porque el aumento de estos títulos se relaciona con un mayor riesgo de desarrollar la malignidad⁽¹⁶⁾.

Trabajos realizados Gelardi y col.,⁽¹⁶⁾ en muestras de células nasales con morfología de racimos multinucleados de un paciente con carcinoma de nasofaringe (sin historia de hábitos de tabaquismo) mediante serología y reacción en cadena de la polimerasa en suero, demuestran positividad para la infección por VEB que fue posteriormente confirmada mediante microscopía electrónica. A partir de estos resultados los autores concluyeron que es recomendable la realización de la evaluación clínica de todos los neoplasmas nasales, así como de citologías rutinariamente, y cuando estas muestras son positivas para VEB debe realizarse una endoscopia nasal y de nasofaringe para detectar evidencia de un posible carcinoma nasofaríngeo⁽¹⁶⁾.

Es importante resaltar que se ha especulado

acerca de la relación de este agente con la etiología del CCC, uno de estos casos es un estudio realizado por Oshima y col., quienes señalaron que el 33 % de los carcinomas epidermoide de cabeza y cuello que eran positivos para VEB mediante PCR, era debido a infección latente de linfocitos ⁽¹⁷⁾.

En nuestro país son pocos los estudios de este tipo que se han llevado a cabo, uno de ellos fue realizado por Ponce y col. ⁽¹⁸⁾ en el cual se evaluaron 31 muestras de pacientes de tumores malignos localizados en el tracto aerodigestivo superior empleando técnicas de biología molecular, obteniendo que 41,9 % de estas eran positivas para el genoma del VEB siendo la laringe la localización anatómica con mayor positividad, estos resultados apoyan los obtenidos en esta investigación, abriendo las puertas para futuras investigaciones en las que se analice el comportamiento de la población venezolana ante este tipo de infección, y se analice la relación que pudiera existir entre la infección por VEB y el desarrollo de CCC.

Podemos concluir: en este trabajo la mayor incidencia de CCC correspondió al género masculino donde, además, se observó el hábito de fumar y/o consumo de alcohol; las localizaciones anatómicas más frecuentes fueron la laringe y la cavidad oral y la laringe.

Por su parte, el VEB fue detectado en 44 % de las muestras evaluadas, encontrándose principalmente en la cavidad bucal y laringe. La detección de este agente infeccioso concuerda con los resultados registrados en diversos estudios moleculares y serológicos que sugieren al VEB como posible cofactor de riesgo de CCC. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios para continuar avanzando en el conocimiento de esta relación, que a su vez pueda ser utilizado en la optimización de protocolos de tratamiento y seguimiento de pacientes con esta patología.

Agradecimientos: Ing. Jean-Pierre Veitía por

la realización de los análisis estadísticos

Financiamiento: Proyecto FONACIT PG-2005000408.

REFERENCIAS

1. Abbas Abdul, Lichtman Andrew, Pillai Shiv. *Inmunología Celular y Molecular*. 6ª edición. Barcelona, España: Editorial Elsevier Saunders; 2008.
2. Li W1, Thompson CH, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Cossart YE, et al. Human Papillomavirus positive predict favorable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *Int J Cancer*. 2003;106(4):553-558.
3. Ringstrom E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human Papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2002;8(10):3187-3192.
4. Arias F, Villafranca E, Dueñas MT, Vera R. Factores pronósticos en el carcinoma de cabeza y cuello. *An Sist Sanit Navarra*. 2001;24(Suppl 1):73-81.
5. Badulescu F, Crisan A, Badulescu A, Schenker M. Recent data about the role of human papillomavirus (HPV) in oncogenesis of head and neck cancer. *Rom J Morphol Embryol*. 2010;51(3):437-440.
6. Veitía D, De Guglielmo Z, Ávila M, Liuzzi JF, Correnti M. Detección de VPH y Expresión de p53 en carcinoma de cabeza y cuello. *Rev Venez Oncol*. 2009;21(3):123-131.
7. Spitz MR, Fueger JJ, Goepfert H, Hong WK, Newell GR. Squamous cell carcinoma of the aero digestive tract. A case comparison analysis. *Cancer*. 1988;61(1):203-208.
8. Boffetto P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*. 2006;7(2):149-156.
9. Battista G, Comba P, Orsi D, Norpoth K, Maier A. Nasal cancer in leather workers: An occupational disease. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1995;121(Suppl 7):1-8.
10. Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, Goran Hansson B, Andersson G. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol*. 2005;125(12):1327-1336.
11. Correnti M, Uribe M, Cavazza M, Bajares M, Bello J,

- Cerruti R, et al. Detección de virus papiloma humano (VPH) mediante biología molecular y su asociación con neoplasia cervical uterina. *Rev Venez Oncol*. 1997;9(2):76-83.
12. Raab-Traub N, Webster-Cyriaque J. Epstein-Barr virus infection and expresión in oral lesions. *Oral Dis*. 1997;3(Suppl 1):164-170.
13. De Petrini M, Ritta M, Schena M, Chiusa L, Campisi P, Giordano C, et al. Head and neck squamous cell carcinoma: Role of the Human Papillomavirus in tumor progression. *New Microbiol*. 2006;29(1):25-33.
14. Preciado M, De Matteo E, Diez B, Menarguez J, Ginstein S. Presence of Epstein Barr Virus and strain type assignment in Argentine childhood Hodgkin's disease. *Blood*. 1995;86(10):3922-3929.
15. Cohen JI. Infection for Epstein-Barr Virus. *N Engl J Med*. 2000;343(7):481-492.
16. Gelardi M, Tomaiuolo M, Cassano M, Besozzi G, Fiorella LF, Calvario A, et al. Epstein-Barr virus induced cellular changes in nasal mucosa. *Virology*. 2006;3:6.
17. Oshima K, Kikuchi M, Masuda Y, Sumiyoshi Y, Eguchi F, Mohtai H, et al. Epstein-Barr viral genomes in carcinoma metastatic to lymph nodes. *Acta Pathol Jpn*. 1991;41:437-443.
18. Ponce JG, Lares H, Mattar D, Correnti M, Ávila M. Determinación genómica de virus de Epstein Barr en tumores del tracto aerodigestivo superior. *Rev Venez Oncol*. 2008;20(1):11-15.