

**DETERMINACIÓN DE INMUNOSCORE, PD-1, PD-L1 Y EPSTEIN BARR VIRUS,
EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DE
TIPO INTESTINAL EN ESTADÍO AVANZADO, EN EL HOSPITAL SAN JOSÉ DE
POPAYÁN ENTRE LOS AÑOS 2014 – 2016**



LUCY LORENA BRAVO LUNA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
POPAYAN, CAUCA
2020**

**DETERMINACIÓN DE INMUNOSCORE, PD-1, PD-L1 Y EPSTEIN BARR VIRUS,
EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DE
TIPO INTESTINAL EN ESTADÍO AVANZADO, EN EL HOSPITAL SAN JOSÉ DE
POPAYÁN ENTRE LOS AÑOS 2014 – 2016**

LUCY LORENA BRAVO LUNA

**Trabajo presentado como Proyecto de Grado para optar por el título de
ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA**

Director

Dr. HAROLD BOLAÑOS BRAVO

Asesoras

Dra. ROSA AMALIA DUEÑAS CUELLAR

Dra. VICTORIA EUGENIA NIÑO CASTAÑO

Dra. ANGELA MARÍA MERCHÁN GALVIS

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
POPAYAN, CAUCA
2020**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma de tutor

Firma de tutor

Firma de tutor

Firma de tutor

Popayán, _____ de 2020

DEDICATORIA

Este trabajo de grado lo dedico con todo el cariño a mi querida familia, a mis padres y hermana por su apoyo incondicional, y por creer siempre en mis capacidades.

AGRADECIMIENTOS

Al director del proyecto, a los asesores científicos y epidemiológicos, a la Compañía de Patólogos del Cauca y a la Vicerrectoría de Investigaciones por la financiación del proyecto; así como a los estudiantes del Programa de Medicina de la Universidad del Cauca: Cristian Padilla y Luisa Orozco, ya que, sin su apoyo y disposición, este trabajo no habría sido posible.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVOS	15
MARCO TEÓRICO	16
ANTECEDENTES	32
METODOLOGÍA	35
CONSIDERACIONES ÉTICAS	41
RESULTADOS	42
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	65
FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO	66
REFERENCIAS	67

TABLAS

<i>Tabla 1. Sistema de Estadificación TNM</i>	19
<i>Tabla 2. Control de sesgos</i>	37
<i>Tabla 3. Distribución porcentual de las variables de antecedentes clínicos de riesgo de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 - 2016.</i>	43
<i>Tabla 4. Distribución porcentual para las variables histopatológicas de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.</i>	46
<i>Tabla 5. Densidad de la población con Linfocitos T CD3+ y CD8+ de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.</i>	48
<i>Tabla 6. Estadísticos descriptivos para las variables CD8+, CD3+ e Inmunoscore de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 - 2016.</i>	49
<i>Tabla 7. Distribución porcentual del EBER-ISH según las variables CD3+, CD8+ e inmunoscore de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.</i>	51
<i>Tabla 8. Distribución porcentual de la expresión de PD-1 de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.</i>	52
<i>Tabla 9. Distribución porcentual de EBER-ISH según las variables PD-1 y CPS de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 - 2016.</i>	54
<i>Tabla 10. Análisis bivariado por medio de tablas de contingencia y prueba Chi cuadrado para analizar la relación entre la variable EBER-ISH y demás variables asociadas.</i>	54

ILUSTRACIONES

<i>Ilustración 1. Expresión del Score Positivo Combinado</i>	31
<i>Ilustración 2. Rotulación de los bloques de parafina</i>	76
<i>Ilustración 3. Lámina para Coloración Hematoxilina & Eosina</i>	76

GRÁFICOS

<i>Gráfico 1. Distribución porcentual según genero de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.</i>	42
<i>Gráfico 2. Distribución porcentual de las variables histopatológicas de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.</i>	45
<i>Gráfico 3. Distribución porcentual según método EBER-ISH de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.</i>	47
<i>Gráfico 4. Distribución porcentual de las variables CD3+, CD8+ e Inmunoscore de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 - 2016.</i>	51

<i>Gráfico 5. Distribución porcentual del CPS de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.</i>	52
--	----

FIGURAS

<i>Figura 1. Hallazgos microscópicos de la neoplasia</i>	44
<i>Figura 2. Hallazgos microscópicos del microambiente tumoral</i>	49
<i>Figura 3. Infiltrado linfocítico CD3+, reactividad por inmunohistoquímica</i>	50
<i>Figura 4. Infiltrado linfocítico CD8+, reactividad por inmunohistoquímica</i>	50
<i>Figura 5. Reactividad por inmunohistoquímica para PD-1</i>	53
<i>Figura 6. Reactividad por inmunohistoquímica para PD-L1</i>	53

ANEXOS

<i>Anexo 1. Operacionalización de variables</i>	77
<i>Anexo 2. Protocolo de Recolección de la información</i>	80
<i>Anexo 3. Protocolo de Recolección y análisis de las muestras</i>	81
<i>Anexo 4. Protocolo Hematoxilina y Eosina</i>	82

FORMATOS

<i>Formato 1. Instrumento para Recolección de Información</i>	83
<i>Formato 2. Rotulación de las muestras</i>	86
<i>Formato 3. Características Histopatológicas</i>	87
<i>Formato 4. Reporte de Pruebas complementarias</i>	93

DETERMINACIÓN DE INMUNOSCORE, PD-1, PD-L1 Y EPSTEIN BARR VIRUS, EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DE TIPO INTESTINAL EN ESTADÍO AVANZADO, EN EL HOSPITAL SAN JOSÉ DE POPAYÁN ENTRE LOS AÑOS 2014 – 2016

RESUMEN

Objetivo: Determinar el inmunoscore, PD-1/PD-L1 y la presencia de Epstein Barr Virus en adenocarcinoma gástrico intestinal de estadio avanzado en pacientes del Hospital San José de Popayán entre los años 2014 y 2016.

Materiales y métodos: Este estudio descriptivo de corte transversal analizó mediante inmunohistoquímica las características de la expresión de PD-L1/PD-1 y la densidad de linfocitos infiltrantes (CD3+ CD8+) en el microambiente tumoral de casos de adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal en estadio avanzado (Etapa II y III), a quienes les realizaron gastrectomía en el Hospital San José de Popayán, durante los años 2014 y 2016. Adicionalmente, determinó la infección por el Virus del Epstein Barr en las células tumorales gástricas, mediante la técnica de hibridación in situ.

Los datos clínicos se obtuvieron de la historia médica de los pacientes, las características histológicas del estudio patológico microscópico de los tejidos y los hallazgos moleculares de los resultados de las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación in situ.

Resultados: La muestra estuvo constituida por 24 pacientes, el 66,7% fueron hombres y el 33,3% fueron mujeres, con edad media al momento del diagnóstico de 65 años. El 58,3% de los tumores fueron Borrmann tipo III (n=14), la localización tumoral con las más altas proporciones, fue el tercio medio y distal del estómago, con el 37,5% (n=9) y 33,3% (n=8) respectivamente. En el 87,5% de los casos el tumor invadía hasta la capa muscular propia (n=21) y el 45,8% fueron diagnosticados con grado histológico 2 (n=11) (moderadamente diferenciado). El 87,5% de los casos presentaban invasión linfovascular, junto con compromiso ganglionar (n=21) y el 41,7% de los pacientes presentaban invasión perineural (n=10). Se identificó invasión linfovascular y perineural concomitante en el 41,7% de los casos (n=10).

La densidad de la población de linfocitos fue variable, para el infiltrado CD3+, el valor máximo fue de 71% y el mínimo de 8,2%, con un promedio de 21,8% y en el caso del infiltrado CD8+, el mayor porcentaje fue del 54% y el menor del 2,5%, con

un promedio de 14,8%. El porcentaje más alto de inmunoscore fue del 62,5% y el más bajo del 6%, con un promedio de 18,1%. El 100% de los pacientes tenían expresión baja e intensidad débil de PD-1 y en el cálculo del Score Positivo Combinado (CPS), reveló que el 91,7% de los casos (n=22) tuvieron un score <1 y sólo el 8,3% (n=2) tenían un score >1.

El 20,8% de los pacientes fueron EBER-ISH positivo (n=4), todos con reporte de inmunoscore bajo, baja expresión de PD-1 y score CPS <1.

Conclusión: Los casos EBER-ISH positivos no se asociaron con infiltrado linfocitario alto, ni con la sobreexpresión de PD-1 y PD-L1, como se esperaba, considerando las características moleculares del subtipo de CG EBV+. Los 2 casos con CPS > 1, tenían inmunoscore alto, pero eran negativos para EBER-ISH, por lo tanto y teniendo en cuenta, lo mencionado en la literatura sobre los subtipos moleculares de CG que se asocian a abundante infiltrado linfocitario y sobreexpresión de PD-L1, es importante considerar en el futuro estudiar la MSI en el CG.

Palabras Clave: Cáncer gástrico, Epstein Barr Virus, Ligando de muerte celular programado, Receptor del Ligando de muerte celular programado, Linfocitos CD3+ CD8+, Inmunoscore, Score Positivo Combinado.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una de las primeras patologías después de las enfermedades cardiovasculares con mayor incidencia en el mundo, entre los diversos tipos de cáncer, las neoplasias gastrointestinales representan un problema de salud pública a nivel mundial (1). Especialmente, el cáncer gástrico (CG) es una de las neoplasias malignas más frecuentes y una de las principales causas de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres (2,3). Se ha relacionado esta alta tasa de mortalidad, a que la fase temprana de la enfermedad es asintomática, por lo que la mayor parte de los casos se diagnostican en un estadio avanzado (4) con opciones de tratamiento limitadas (3), lo que se asocia con una tasa de supervivencia general a 5 años del 20% y una mediana de supervivencia inferior a 12 meses (5); adicionalmente la tasa de recidiva locorregional puede alcanzar el 80% (6).

A causa de la heterogeneidad intra e intertumoral en la histopatología del CG, existen diferentes esquemas de clasificación para el diagnóstico del CG, siendo los más usados los publicados por la Asociación Japonesa de Cáncer Gástrico, la Organización Mundial de la Salud (OMS), Nakurama et al. y Lauren (7); pero estas clasificaciones solo se basan en la disposición arquitectural y las características citológicas de las células tumorales, sin aportar información sobre las bases moleculares y genéticas implicadas en la patogénesis del CG (8).

Además de las características arquitecturales y citológicas del CG, se identificaron casos con abundante infiltrado inflamatorio intratumoral y expresión de PD-L1 (Programmed death-ligand 1) en las células tumorales (9), característica muy importante dentro del microambiente tumoral, porque está relacionada con la evasión del sistema inmunológico por parte de las células tumorales, al reprogramar a las células inmunes linfoides (10). Estos hallazgos, se asociaron a los subtipos de CG, con Inestabilidad de microsatélites (MSI) e infección por Epstein Barr Virus (EBV) (11–16), agente infeccioso que actualmente es considerado factor de riesgo para el desarrollo de CG, y a quien se le atribuyen el 7-16% de los casos a nivel mundial (17).

El anterior descubrimiento impulsó el estudio a fondo del microambiente tumoral, con lo cual se determinó, que los linfocitos infiltrantes del tumor (TILS por su sigla en inglés), en particular los linfocitos T CD8+, apoyan las funciones de destrucción de las células tumorales (10); pero esta función, es regulada de forma negativa cuando el receptor PD-1 (Programmed cell death protein 1) presente en su superficie celular, se une con su ligando PD-L1 expresado por las células

tumorales (18). Así, este mecanismo, es el utilizado por las células neoplásicas para evadir la respuesta inmune del huésped frente al cáncer y seguir proliferando e invadiendo los tejidos (19).

Todos estos hallazgos en el microambiente tumoral del CG, impulsaron el estudio minucioso de este cáncer, para determinar las características genéticas y moleculares, que promueven la carcinogénesis y determinan diferentes tipos de fenotipo histológico, ya que como se mencionó anteriormente, las clasificaciones histopatológicas disponibles, no aportan información adicional a los hallazgos morfológicos de la neoplasia.

En nuestro medio, los casos de adenocarcinoma gástrico siguen siendo reportados usando las clasificaciones histopatológicas de Lauren o de la OMS, pero en el momento, no se realizan estudios adicionales para caracterizar el microambiente tumoral de las neoplasias. Por lo que se planteó la pregunta de investigación: ¿Cuál es la expresión de las proteínas PD-L1/PD-1, la presencia de linfocitos infiltrantes en el estroma tumoral y la frecuencia de infección por EBV, en muestras de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico, a quienes se les practicó gastrectomía en el Hospital Universitario San José de Popayán, Cauca, durante el periodo comprendido entre el año 2014 y 2016?.

JUSTIFICACIÓN

Aunque la incidencia del CG ha disminuido de forma importante en los últimos 30 años (8,20), en Colombia continúa siendo la primera causa de muerte por cáncer en hombres y la cuarta en mujeres (21). Para el Departamento del Cauca, se documenta que entre los años 2007 al 2013 se presentaron por CG 1426 decesos (60% hombres), ocupando así el tercer lugar en mortalidad por este cáncer en el país, con una tasa del 15.90%, la cual está por encima del promedio nacional (20,22).

En la práctica clínica, para determinar el pronóstico de los pacientes con cáncer se utiliza el Sistema de estadificación TNM, pero múltiples estudios clínicos en los últimos años evidenciaron variaciones en el curso y pronóstico de pacientes con el mismo tipo histopatológico, misma estadificación de la enfermedad y regímenes de tratamiento similares (23), lo cual es explicado por la heterogeneidad histológica y etiológica de este cáncer (24).

Para explicar la heterogeneidad intertumoral del CG, en 2014 The Cancer Genome Atlas (TCGA) reportó los resultados del estudio del genoma y proteoma del CG, proyecto que identificó los subtipos moleculares y las vías desreguladas en este tipo de cáncer (25). Así, se definieron 4 subtipos moleculares: 1. Epstein Barr Positivo-EBV+, 2. Inestabilidad de microsatélites-MSI, 3. Genómicamente estable y 4. Inestabilidad cromosómica-CIN.

Este perfil realizado y reportado por TCGA, revolucionó la comprensión de los mecanismos heterogéneos que subyacen a la patogénesis del cáncer gástrico (8,9), al definir las características moleculares de cada subtipo (5,8,26), información que explica las diferencias en la respuesta a tratamiento y el curso clínico de los pacientes (9).

Una de las características histopatológicas importantes de los subtipos moleculares del CG, es el infiltrado inflamatorio en el microambiente tumoral, el cual varía según la patobiología del subtipo tumoral, conociéndose que los casos EBV+ y MSI están asociados con un alto infiltrado inflamatorio y alta expresión de PD-L1 (9), que está relacionado con la evasión del sistema inmunitario (27). La comprensión de estos mecanismos de evasión inmunológica, condujo a avances importantes en el campo de la inmunooncología, con el desarrollo farmacéutico de la inmunoterapia, con agentes específicos inhibidores del punto de control inmune PD-L1/PD-1 (19,28),

los cuales aumentan la capacidad del sistema inmune para detectar y destruir las células cancerígenas, al bloquear la interacción entre PD-1 y PD-L1/L2 (18) y así contrarrestar la táctica de evasión inmune, al restaurar la respuesta antineoplásica adecuada por parte de los linfocitos T CD8+ (19).

Estos hallazgos patológicos aportan nueva información relevante para el diagnóstico y tratamiento de los pacientes con CG en estadios avanzados, ya que caracterizar el microambiente tumoral por medio del inmunoscore es de gran importancia clínica (23), dado que un inmunoscore alto se asocia con una mayor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en varios tipos de cáncer (29). Así, el inmunoscore se está usando en la actualidad como un nuevo componente en la clasificación del cáncer colorectal y se denomina TNM-Inmune (23); adicionalmente, en el momento existen estudios que buscan estandarizar un inmunoscore para el CG, como los realizados por Yuming Jian y colaboradores en 2018 (23) con su última publicación en marzo de 2020, en donde mencionan que se requieren estudios prospectivos futuros que confirmen el potencial para predecir la respuesta al tratamiento y así seleccionar pacientes que se puedan beneficiar de la quimioterapia (30).

Con las técnicas actuales disponibles, es posible determinar caracterizar el infiltrado linfocitario en el estroma tumoral, la expresión de las moléculas PD-L1 y PD-1, y la infección por EBV en las células tumorales. Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar el inmunoscore, la expresión de PD-1/PD-L1 y la presencia de EBV en adenocarcinoma gástrico intestinal de estadio avanzado en pacientes del Hospital San José de Popayán entre los años 2014 y 2016. Estos resultados contribuirán para que a futuro se logre integrar el diagnóstico clínico, las características moleculares y el fenotipo tumoral, con los métodos terapéuticos disponibles en los pacientes diagnosticados con cáncer gástrico.

Adicionalmente, esta investigación estuvo enmarcada en las necesidades planteadas en los lineamientos del Plan Nacional para el Control del Cáncer en Colombia 2012-2020 estipulados por el Ministerio de Salud y Protección social - Instituto Nacional de Cancerología (31), por lo que los resultados obtenidos en el presente estudio, contribuirán a mejorar la comprensión del CG en nuestra población, teniendo en cuenta que la incidencia reportada para este cáncer en Colombia es de las más altas en Latinoamérica y además el Departamento del Cauca reporta el tercer lugar en mortalidad por este cáncer en el país.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar el inmunoscore, PD-1/PD-L1 y la presencia de Epstein Barr Virus en adenocarcinoma gástrico intestinal de estadio avanzado en pacientes del Hospital San José de Popayán entre los años 2014 y 2016.

Objetivos específicos

- Caracterizar clínicamente los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal en estadio II o III.
- Identificar la presencia de EBV en muestras de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal en estadio II o III.
- Calcular la densidad de la población de linfocitos citotóxicos CD3+ CD8+ y el Inmunoscore, en muestras de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal en estadio II o III.
- Cuantificar la expresión de PD-1 y PD-L1 y determinar el Score Positivo Combinado en muestras de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal en estadio II o III.

MARCO TEÓRICO

A. ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Definición

El adenocarcinoma es el tipo más común de carcinomas del estómago (32), dando lugar al 90% de los casos (6). Corresponde a una neoplasia maligna de origen epitelial que se origina en la mucosa gástrica y muestra diferenciación glandular (7).

Epidemiología

Según las estadísticas de GLOBOCAN 2018, el CG fue la quinta causa de cáncer en el mundo con un estimado de 1.033.701 casos y la tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial, con un estimado de 782.685 casos (21). Se ha encontrado que, la incidencia y mortalidad por CG es mayor en las regiones en vía de desarrollo (2), con una incidencia de hasta 71% (21). Los países latinoamericanos tienen algunas de las tasas de mortalidad más altas por este tumor, con una distribución que se concentra en los países ubicados a lo largo del pacífico (33).

En Colombia, para el 2018, el CG ocupó el cuarto lugar en incidencia, con un número estimado de 7.419 casos, y fue la primera causa de muerte por cáncer con 5.505 casos (21). Aunque no se cuenta con datos recientes sobre la incidencia del CG en el Departamento del Cauca, según estadísticas del Instituto Nacional de Cancerología, en el periodo 2007-2013 se presentaron por este cáncer 857 fallecimientos en hombres y 569 en mujeres (20), con tasa ajustada de mortalidad a 2014 del 15.9%, poniendo al departamento en el tercer lugar después del Huila y Norte de Santander (22).

Esta neoplasia se presenta más en hombres que en mujeres, con una relación 2:1 (2,3) y está fuertemente relacionada con la edad (2). En la mayoría de países de Centro y Sur América, el 80 a 97% de los casos son diagnosticados en mayores de 50 años, con una edad media al momento del diagnóstico que varía de 61 a 68 años en hombres y de 59 a 73 años en mujeres (2,3).

Características clínicas

Los pacientes pueden ser asintomáticos en estadios iniciales por lo tanto el diagnóstico se realiza en la mayoría de los casos en etapas avanzadas de la enfermedad (7). En estadio avanzado, los pacientes pueden referir síntomas inespecíficos que incluyen: dolor epigástrico, náuseas o vómitos, saciedad precoz, pérdida de peso, disfagia, sensación de masa epigástrica o abdominal, además de hemorragia digestiva alta asociada a anemia, hematemesis o melenas (34). De este espectro de síntomas, los más frecuentes al momento del diagnóstico son la pérdida de peso (60%) y el dolor abdominal epigástrico (50%) (6).

Etiología

El 90% de los casos ocurren de forma esporádica y el 10% restante está asociado a anomalías genéticas – familiares (7), como el Síndrome de Li-Fraumeni, la poliposis adenomatosa familiar, el cáncer de colon hereditario sin poliposis y mutaciones en el gen BRCA2 (32), así como mutación en línea germinal de la E-cadherina (CDH1) o genes de reparación de desajustes (24). La patogénesis de los casos esporádicos comprende un proceso multifactorial en el cual factores ambientales y propios del huésped se ven implicados (7,35)

Se han identificado como factores de riesgo definitivos para el desarrollo de CG: el *Helicobacter Pylori* (*H.pylori*) considerado el principal factor de riesgo para el desarrollo de este cáncer a nivel mundial (36), siendo Latinoamérica una de las regiones con las tasas más altas de infección (33), con una prevalencia entre el 50-95% (2). En consecuencia, al *H.pylori* se le atribuyen el 77% de los casos de CG ubicados en la región distal del estómago (3). Sin embargo, existe otro agente infeccioso dentro de los factores de riesgo, el Virus del Epstein Barr (EBV), el cual se asocia con el 7-16% de los casos en el mundo (17,24)

Adicionalmente el consumo de cigarrillo, el antecedente de cirugía bariátrica (Billroth II), los pólipos gástricos adenomatosos y la secuencia gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y displasia. Además, se han considerado otros factores de riesgo como probables, entre los que está la alta ingesta de sal, la obesidad y la historia de úlcera gástrica (34).

Lesiones precursoras

En la mayoría de los casos, el cáncer invasivo está precedido por un prolongado proceso precanceroso que dura varias décadas y el avance entre las etapas está determinado por factores etiológicos ligados al proceso inflamatorio (37). La secuencia de eventos es conocida como la Cascada de la carcinogénesis gástrica de Correa, que comprende: inflamación, metaplasia, displasia y finalmente el carcinoma. Sin embargo, es la displasia epitelial la lesión precursora neoplásica directa (6,35).

Diagnóstico inicial

Teniendo en cuenta las últimas guías 2020 del National Comprehensive Cancer Network para CG, la endoscopia digestiva se ha convertido en una herramienta importante para el diagnóstico, cuyo objetivo es determinar la presencia y ubicación de lesiones sospechosas o enfermedad neoplásica. El diagnóstico definitivo, se realizará luego del estudio microscópico de la muestra, en donde se indicará el tipo histológico, el grado de diferenciación y la invasión tumoral (38).

Apariencia macroscópica

De acuerdo a los hallazgos y características de la lesión en el estudio endoscópico, para el estadio temprano se usa la Clasificación endoscópica para CG temprano (Elevado, Superficial elevado, Superficial plano, Superficial deprimido y Excavado) y en las lesiones infiltrantes la Clasificación de Borrmann (Masa, Ulcerado, Infiltrante ulcerado e Infiltrante difuso) (7,35).

Clasificación Histológica

Los hallazgos microscópicos son heterogéneos tanto en las características citológicas como en las arquitecturales, por lo tanto a lo largo de los años se han propuesto diferentes sistemas de clasificación, la mayoría basados en la apariencia microscópica (35).

Las clasificaciones más utilizadas son las de Lauren, la Asociación Japonesa de Cáncer Gástrico (JGCA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). La clasificación de Lauren descrita en 1965 divide los adenocarcinomas gástricos en dos tipos: intestinal o difuso, la clasificación de la JGCA de 2017 los divide en: papilar, tubular, pobremente diferenciado, en anillo de sello y mucinoso; y la última

actualización de la OMS en 2019, define cinco subtipos histológicos: tubular, papilar, pobremente cohesivo (incluyendo células en anillo de sello y otros subtipos), mucinoso y mixto (7).

Otras clasificaciones que se han propuesto incluyen: Broders (Diferenciación celular), Mulligan (Tipo histológico y citológico) Ming (Patrón de crecimiento), Hirota, Hemanek, Kim y Kubo, Oota, Stout, Sugano y Nakamura, Takisawa (39).

Estadificación

Luego del diagnóstico confirmado por histopatología, al paciente se le realizan estudios de imagen adicionales para estadificar su enfermedad y definir si se trata de un estadio temprano o avanzado, entre los cuales están: la ecoendoscopia para determinar el grado de las extensiones tumorales directas, la tomografía computarizada de tórax, de abdomen y pelvis para determinar si hay enfermedad metastásica, y la tomografía por emisión de positrones y evaluación por laparoscopia para identificar a los pacientes que no se benefician de manejo quirúrgico (6,40).

Se considera estadio temprano, la lesión que está confinada a la capa mucosa o submucosa, independiente de si el paciente presenta o no, metástasis a ganglios linfáticos, en la mayoría de los casos, la lesión es pequeña, con un tamaño que oscila entre los 2 y 5 cm. Por otro lado, el estadio avanzado corresponde al tumor que invade la pared del estómago más allá de la capa submucosa (35).

El sistema de estadificación más utilizado es el propuesto por la American Joint Committee on Cancer / International Union Against Cancer (AJCC/UICC), al momento en su 8va edición, el cual utiliza un sistema de clasificación similar al TNM (profundidad de la invasión tumoral (T), número de ganglios linfáticos afectados (N) y presencia o ausencia de metástasis (M)) (6).

Tabla 1. Sistema de Estadificación TNM

Tumor primario (T)	
TX	El tumor primario no puede ser valorado
T0	Sin evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ; tumor intraepitelial sin invasión de la lámina propia

T1	El tumor invade la lámina propia, la muscular de la mucosa o la submucosa
T1a	El tumor invade la lámina propia o la muscular de la mucosa
T1b	El tumor invade la submucosa
T2	El tumor invade la muscular propia
T3	El tumor penetra en el tejido conjuntivo subseroso sin invadir el peritoneo visceral ni estructuras adyacentes.
T4	El tumor invade la serosa (Peritoneo visceral) o estructuras adyacentes
T4a	El tumor invade la serosa (Peritoneo visceral)
T4b	El tumor invade estructuras adyacentes

Ganglios linfáticos regionales (N)	
Nx	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
N0	Sin metástasis en ganglios linfáticos
N1	Metástasis en 1-2 ganglios linfáticos regionales
N2	Metástasis en 3-6 ganglios linfáticos regionales
N3	Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales
N3a	Metástasis en 7-15 ganglios linfáticos regionales
N3b	Metástasis en 16 o más ganglios linfáticos regionales

Metástasis a distancia (M)	
M0	Sin metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

Factores pronósticos

Los indicadores pronósticos más significativos son la extensión tumoral y las metástasis en ganglios linfáticos regionales. Sin embargo, el grado tumoral y el tipo histológico no parecen proporcionar información pronóstica independiente. La tasa de supervivencia disminuye de forma progresiva y proporcional al grado de infiltración de la pared gástrica y al número de ganglios linfáticos comprometidos. Además, en caso de presentarse metástasis hematógena o siembras peritoneales, el pronóstico es fatal (40).

B. EL ATLAS DEL GENOMA DEL CÁNCER

TCGA es una colaboración a gran escala dirigida por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) y el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NHGRI), para mapear los cambios genómicos y epigenómicos que ocurren en 32 tipos de cáncer humano. Su objetivo es apoyar nuevos descubrimientos a través de la generación de un catálogo de aberraciones somáticas que ocurren en las diferentes neoplasias y así, acelerar el ritmo de la investigación dirigida a mejorar el diagnóstico, el tratamiento y la prevención del cáncer (41).

En Julio de 2014, TCGA reportó los resultados obtenidos del análisis de datos genómicos y proteómicos de tejidos de CG, los cuales se encuentran para el público en el sitio de portal de datos TCGA (<http://cancergenome.nih.gov/>). El análisis reveló 4 subtipos moleculares: 1. Epstein Barr positivo – EBV+, 2. Inestabilidad de microsatélites – MSI, 3. Genómicamente estable, 4. Inestabilidad cromosómica – CIN (5,8).

C. EPSTEIN BARR VIRUS

El EBV, también conocido como Virus del Herpes humano 4, es un virus gamma-herpes que consiste en un ADN de doble cadena de ~170 kb de longitud (36), que corresponden a casi 100 genes (26). Es el primer virus oncogénico que se asoció con malignidad en los humanos (42) y fue descubierto en 1964 por Tony Epstein e Yvonne Barr, cuando utilizaron microscopía electrónica para identificar partículas de tipo Herpes virus en una subpoblación de líneas celulares de linfoma de Burkitt. Desde entonces, el EBV ha sido reconocido como el primer virus asociado directamente con el cáncer en humanos (5).

Actualmente, se clasifica como carcinógeno del grupo 1 por su asociación con el desarrollo de un amplio espectro de cánceres (5) como el linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaríngeo, el linfoma de Hodgkin y el linfoma extranodal de células NK/T de tipo nasal (36). Por consiguiente, EBV se considera un patógeno transformador directo, al expresar sus propios genes reguladores que afectan las vías del ciclo celular de la célula huésped (5). De modo que, si el virus no es eliminado por el sistema inmune del huésped, puede contribuir al desarrollo de cáncer, por su capacidad de evadir el reconocimiento del sistema inmune (42).

Transmisión

El virus se propaga por gotitas de aire, contacto oral íntimo, relaciones sexuales, saliva, sangre y sus productos, así como por trasplante de órganos (43). Infecta a los linfocitos B al unirse al receptor viral CD21 (44), lo cual implica la subsecuente activación policlonal de los linfocitos B con proliferación benigna (45) y la propagación de la infección desde al resto del organismo. En las personas normales, la mayor parte de las células infectadas por el EBV se eliminan, pero algunos linfocitos con infección latente persisten durante toda la vida del huésped (1 en 10^5 - 10^6 linfocitos B) (44).

Infección

En países en vía de desarrollo, la mayoría de los niños se han infectado a la edad de los 2 años. Pero en naciones más desarrolladas la infección se adquiere en la infancia tardía o incluso durante la adolescencia (45). La infección primaria generalmente es asintomática o muestra solo síntomas leves (43), pero cuando ocurre en la segunda década de la vida o después, se presenta como mononucleosis infecciosa en la mitad de los casos (45).

Antígenos virales

Se dividen en 3 clases, con base en la fase del ciclo vital del virus en la cual se expresan: 1) Antígenos de fase latente, se sintetizan en células con infección latente y comprenden los EBNA y los LMP, su expresión revela que hay un genoma de EBV y sólo EBNA1 es expresado de forma invariable, dado que es necesario para mantener los episomas de ADN viral; 2) Antígenos iniciales, son proteínas no estructurales cuya síntesis no depende de la replicación del ADN, pero su expresión indica la aparición de la replicación viral productiva; y 3) Antígenos tardíos, son los

componentes estructurales de la cápside viral y la envoltura viral, y se producen de manera abundante en las células sometidas a infección viral productiva (44).

Latencia

El EBV infecta a los linfocitos B vírgenes y estimula su diferenciación a células B de memoria, que son reservorio para el virus (46), así el virus entra directamente en un estado latente sin experimentar un periodo de replicación viral completa (44), estableciendo de esta forma en el huésped, un estado portador de por vida, llamado “infección latente”, en el cual el virus persiste como episoma dentro del núcleo de la célula huésped (5) y establece distintos patrones de expresión génica latente, tanto en células en reposo, como en proliferación (17).

Las características distintivas del estado de latencia son: la persistencia viral, la expresión restringida del virus y el potencial de reactivación y replicación lítica. Los genomas latentes comprenden los antígenos nucleares (EBNA 1, 2, 3A a 3C, LP) (44), proteínas latentes de membrana (LMP1, 2A y 2B) (46), pequeños RNA (EBER) y BART (43).

Pueden ocurrir cuatro posibles tipos de latencia en los linfocitos B. Las células con Latencia III son las más replicativas y expresan todos los EBNA, las LMP y los EBER. (47) Por el contrario, las células con Latencia II solo expresan EBNA-1, LMP1, LMP-2, EBER1 y EBER 2; y las células con Latencia I, solo expresa EBNA-1, EBER-1 y EBER2 (46). Por último, se cree que existe una Latencia final 0, en la que la expresión génica codificada por el virus está completamente silenciada (47).

Reactivación o Fase lítica

En un determinado momento, muy pocas células (<10%) de la población inmortalizada liberan partículas virales. La latencia se altera y el genoma del EBV se activa para replicarse en la célula (44). Durante esta fase, el genoma del EBV se amplifica hasta 1000 veces y expresa casi 100 genes del virus. El programa lítico, detiene la progresión del ciclo celular favoreciendo la fase S y permitiendo la replicación del ADN viral, el cual se replica como moléculas grandes y completas, que se escinden y empaquetan en la progenie viral que se libera para infectar a las células vecinas (46).

Técnicas moleculares para detección del virus

La hibridación de ácido nucleico es el medio más sensible para detectar EBV. El RNA de EBER se expresa de forma abundante en las células infectadas tanto en fase latente, como en la lítica, y proporciona un objetivo diagnóstico útil para detectar las células infectadas (44).

D. CÁNCER GÁSTRICO ASOCIADO A EBV

Definición

Proliferación monoclonal de células de CG con infección latente por EBV (48) en las cuales el virus no está integrado al genoma de la célula huésped, sino que se mantiene como episoma; por lo tanto, la uniformidad en el número de repeticiones terminales (TR) para EBV entre las células cancerígenas, refleja el origen clonal del tumor (36). Estas células tumorales presentan latencia tipo I, con expresión muy restringida de genes virales latentes a EBNA1, EBER, LMP2 y Bam HI A (17), pero LMP1 a menudo está ausente (26).

El primer reporte sobre la asociación entre la infección por EBV y el carcinoma gástrico, fue realizado en 1990 por Burke et al, basados en técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en células de carcinoma gástrico con histología característica similar al linfopitelioma (5,36). Se cree que la infección por EBV en las células epiteliales gástricas es un evento temprano en la carcinogénesis, debido a la evidencia de infección viral en lesiones premalignas o displásicas (49), pero no en la mucosa normal adyacente (5).

Subtipo molecular - TCGA

Según la clasificación The Cancer Genome Atlas, EBVaCG exhibe una mayor hipermetilación extrema del ADN, transversiones de Adeninas a Citocinas, mutación en PIK3CA, amplificaciones recurrentes en JACK2 y ERBB2, señalización mediada por IL-12 (18) y la amplificación del gen CD247 que codifica para PD-L1 y el gen PDCD1LG2 que codifica para PD-L2 (27). Además, la presencia de antígenos virales da como resultado una mayor presentación de neoepítopos, lo que contribuye a una respuesta inmune antitumoral (18).

Incidencia

Tiene una incidencia anual de 75.000 – 90.000 casos por año, lo que representa la subpoblación más grande entre los tumores relacionados con EBV (5).

Factores de riesgo

Coinfecciones con el Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el *H.pylori*; el humo del cigarrillo, que contribuye a la reactivación de la infección por EBV en las líneas celulares gástricas, lesiones repetitivas como el reflujo biliar y la inflamación crónica, como en la gastritis atrófica; en donde se permite el contacto célula-célula entre los linfocitos infiltrantes portadores de EBV y las células epiteliales gástricas (5).

También son factores de riesgo, comer alimentos salados o picantes, beber café con frecuencia, bebidas a altas temperaturas, exposición a polvo de madera y /o limaduras de hierro (36).

Patogenia y Oncogénesis

La inflamación en la mucosa gástrica recluta linfocitos B infectados con EBV en la proximidad del epitelio (43) y el virus es transmitido por los linfocitos infectados a las células epiteliales gástricas, cuando este se reactiva (pasa de estado latente a replicativo) en los linfocitos B. Pero el mecanismo de infección de las células epiteliales gástricas es diferente al de los linfocitos B, dado que estas células carecen de la expresión del MHC II y de CD21. Por lo tanto, lo que desencadena la fusión entre las partículas virales y las células epiteliales, es la formación de complejos entre la proteína viral gHgL y las integrinas av β 5, av β 6 o av β 8 humanas; además, la infección también está mediada por BMRF-2 (glucoproteína viral) que igualmente interactúa con las integrinas celulares (50).

En EBVaCG, la anormalidad molecular primaria que desencadena la cascada de eventos oncogénicos, es la metilación global y no aleatoria de islas CpG en las regiones promotoras de genes relacionados con el cáncer, lo que conduce a la represión de la transcripción y posterior inactivación de la función de los genes. Los genes con mayores frecuencias de metilación son p14ARF, p15, p16INK4A, p73, TIMP3, E-cadherina, DAPK y GSTP1. Por lo tanto, la metilación de las islas CpG y la posterior represión de genes supresores de tumores, parecen jugar un papel central en la carcinogénesis de EBVaGC (51).

Características clinicopatológicas

Tiene predominio por el sexo masculino con una relación 2:1 o 3:1, edad menor de 60 años (5) y población caucásica e hispana (49). Se localiza preferencialmente en las regiones medias y proximales del estómago (58% en el cardias y 33% en el cuerpo gástrico) (50), por lo tanto los tumores en el muñón - restos gástricos postquirúrgicos tienen cuatro veces más probabilidades de ser EBV positivos (48).

Hallazgos macroscópicos

Usualmente se observa un tumor ulcerado o en forma de platillo con engrosamiento marcado de la pared gástrica (50).

Histopatología

Se caracteriza por una marcada infiltración de células inmunes intra o peritumorales (48). En etapas iniciales, el tumor tiene un “patrón de encaje”, compuesto por túbulos y cordones de células neoplásicas, anastomosados de forma irregular, que está asociado a infiltrado linfocítico moderado a denso, lo cual da como resultado el patrón de encaje o patrón reticular, en el estudio a bajo aumento (50).

Se divide en 3 subtipos histológicos de acuerdo a los hallazgos microscópicos de la respuesta inmune celular del huésped (48):

- Carcinoma similar al linfopitelioma (LELC): Adenocarcinoma con células tumorales de bordes citoplasmáticos indistintos, que se disponen en un patrón de crecimiento sincitial y formando estructuras glandulares mal definidas. El margen tumoral es bien definido, tiene infiltración linfocítica densa (número de TILs es mayor que las células tumorales), y no presenta desmoplasia (48).
- Carcinoma con reacción linfoide similar a la Enfermedad de Crohn (CLR): Adenocarcinoma con formación frecuente de túbulos o de glándulas, aumento de los TILS (pero el número de TILS es menor en comparación a las células tumorales) y presencia o ausencia de desmoplasia. La infiltración linfocítica es irregular, con 3 o más folículos linfoides con centros germinales activos por sección de tejido, en el borde de avanzada del tumor (48).

- Adenocarcinoma de tipo convencional (CA): Adenocarcinoma bien a moderadamente diferenciado (36), con Infiltración dispersa de linfocitos y desmoplasia prominente en ausencia de folículos linfoides, o con solo uno o dos agregados linfoides por sección de tejido (5).

Inmunoperfil

Casi la mitad de los casos son positivos para las mucinas de tipo gástrico (MUC5AC y MUC6) y claudina de tipo gástrico (CLDN18). La otra mitad son negativos para estas mucinas y para marcadores de tipo intestinal (MUC2, CD10 y CLDN3) (50).

La amplificación del gen CD247 que codifica para PD-L1 (27), se puede determinar mediante tinción de inmunohistoquímica, con tinción en membrana celular parcial o completa (52).

Pronóstico

La supervivencia general a 5 años es del 71.4% y la supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 67.5%, en comparación con el 56,1% y el 55,2% respectivamente, en los casos negativos para EBV (5).

Mecanismos de evasión inmune

EBVaCG se acompaña de linfocitos infiltrantes de tumor (TILS) CD8+ o CD4+, acompañadas de histiocitos (36) y células dendríticas, que crean un microambiente tumoral inmunoactivo (5), característica que refleja la inmunogenicidad del EBV (36). Los TILS constituyen el componente celular principal del microambiente del tumor y contribuyen al menos parcialmente a la inmunidad antitumoral al promover la erradicación de las células malignas infectadas con EBV (48). Pero hay mecanismos particulares, que permiten que el virus evada la respuesta inmune del huésped, permitiendo así que la infección persista, como: la sobreexpresión de IL-1 β , IFN- γ , amplificación de PDL1, expresión del gen lítico temprano BNLF2a, mutaciones en LMP2A y, repeticiones y polimorfismos en EBNA1 (5).

Detección de virus en las células tumorales

Aunque, LMP1 un conocido oncogén viral en otras neoplasias relacionadas con EBV, rara vez se expresa en EBVaCG (53). El estándar de oro para identificar la infección es mediante Inmunofluorescencia in situ (ISH) para identificar EBER1 /

EBER2, el cuál es abundante en las células cancerígenas infectadas, en tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina (36,50).

E. RESPUESTA INMUNE TUMORAL

En 1909 se postuló por primera vez el papel de la inmunidad en el cáncer, en donde se especulaba que el sistema inmune podía reprimir el crecimiento tumoral al reconocer a las células tumorales como extrañas. Después de 50 años, Burnet propuso la teoría de la vigilancia inmune tumoral, pero esta teoría solo se completó con la identificación de la inmunoedición propuesta por Schreiber, que consta de tres periodos: una fase inicial de eliminación o inmunovigilancia, seguida por la fase de equilibrio y finalmente la fase de escape, en la cual las células tumorales pueden evitar la destrucción por el sistema inmune, lo que acelera la progresión del tumor (1).

Las células tumorales, expresan en su superficie antígenos específicos del tumor y formas aberrantes de antígenos que usualmente se expresan en las células humanas normales o no neoplásicas. Estos antígenos extraños, pueden ser reconocidos por el sistema inmune del huésped y de esta forma activar la respuesta inmunitaria contra la neoplasia. Pero las células tumorales pueden evadir esta respuesta, por medio de diferentes mecanismos, como la pérdida de la expresión del antígeno y la inhibición de la respuesta inmune, a través de la expresión de moléculas con efectos inmunosupresores, como los moduladores del punto de control inmune PD-1 / PD-L1 (19).

PD-L1 puede estar sobreexpresado en las células tumorales, y su unión al receptor PD-1 en las células linfoides activadas, conduce la regulación negativa de los linfocitos T CD8+ (18). Es importante resaltar, que PD-L1 es el ligando inhibitorio dominante de PD-1 en el microambiente tumoral (54), lo cual facilita que las células cancerígenas evadan al sistema inmunológico, al inhibir las funciones de los linfocitos T CD8+ (19), como su proliferación, supervivencia, acción citotóxica y liberación de citocinas. Adicionalmente, la interacción PD-L1/PD-1 induce la apoptosis de las células T específicas del tumor, promueve la diferenciación de los linfocitos T CD4+ en células T reguladoras Foxp3+ (Treg) y aumenta la resistencia de las células tumorales a los ataques de los linfocitos T CD8+ (48).

Linfocitos infiltrantes del tumor (TILS)

Los TILS constituyen el principal componente celular, del microambiente en tumores inmunoactivos. Están representados por células T, células B, células NK y células dendríticas (55). Esta población de células T presentan reactividad inmunológica específica contra las células tumorales, la cual es mayor a la de los linfocitos no infiltrantes. Así, el microambiente tumoral, está conformado por TILS que están compuestos por fracciones de linfocitos T CD3+ y CD4+ (Colaboradores) y linfocitos T CD3+ y CD8+ (Citotóxicos) (56).

Teniendo en cuenta lo anterior, se han propuesto tres fenotipos inmunológicos relacionados con el microambiente tumoral: Tipo I - tumor inflamado, el cual está infiltrado por células T CD8+ y otras células inmunes que no son funcionales en el margen invasivo o en el centro tumoral; Tipo II - tumor inmune excluido, con células T CD8+ que no han infiltrado eficazmente el tumor y Tipo III - Tumor sin infiltrado o con ausencia de células T CD8+ (19).

Por lo tanto, se está estudiando el infiltrado en el tejido tumoral (Tipo, densidad, distribución dentro del tumor, fenotipo y estado de activación), para de esta forma obtener información útil sobre la respuesta inmune del huésped frente al tumor (57).

Receptor del ligando de muerte celular programada (PD-1)

PD-1 (CD279) es una proteína transmembrana de tipo I de 55kDa (58), que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y funciona como receptor co-inhibidor para los ligandos de muerte celular programada 1 y 2 (PD-L1 o CD274 y PD-L2 o CD273), en la superficie de las células inmunes activadas (54) como linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, monocitos activados y células dendríticas (19), suprimiendo la respuesta inmune del huésped y las funciones de las efectoras de las células T (28).

Ligandos de muerte celular programada

PD-L1 es una proteína transmembrana de 40 kDa, que está involucrada en el sistema inmunoregulador (29). Se expresa en células hematopoyéticas (Linfocitos T y B, macrófagos, células dendríticas, mastocitos y células mieloides. Fuera del sistema hematopoyético también se expresa en el endotelio vascular, células hepáticas no parenquimatosas, queratinocitos, células de islotes pancreáticos, astrocitos, placenta, sincitiotrofoblasto, queratinocitos y, células epiteliales y

endoteliales corneales. (19,54). PD-L2 es una proteína transmembrana estructuralmente similar a PD-L1 de 25 kDa, pero con expresión restringida a macrófagos, células dendríticas mastocitos (54,58).

Tanto PD-L1 como PD-L2 pueden expresarse en las células tumorales y en el estroma tumoral (54). La unión de PD-L1 y PD-L2 a su receptor (PD-1) en las células T activadas, conduce a la regulación a la baja de la actividad de las células T citotóxicas (18). Este mecanismo es utilizado por las células tumorales para evadir la respuesta inmune del huésped frente al cáncer (19), siendo PD-L1 el ligando inhibidor dominante de PD-1 en el microambiente tumoral (54).

F. INMUNOSCORE

Es un puntaje aplicado al cáncer, que se basa en un algoritmo de imagen para cuantificar la combinación de inmunotinciones para CD3+ y CD8+ en el centro tumoral y en el margen de invasión del tumor (57).

Hasta el momento, solo se ha realizado la validación del inmunoscore para el cáncer de colon, el cual fue reportado en 2018 por Franck Pages et al. y en donde recomiendan que la cuantificación debe realizarse mediante patología digital (59).

G. SCORE POSITIVO COMBINADO (CPS)

Según las guías 2020 del NCCN para el tratamiento del cáncer gástrico, la evaluación de la expresión de la proteína PD-L1 debe realizarse y reportarse siguiendo el Score Positivo Combinado o CPS (sigla en inglés)(38). Este score corresponde al número de células positivas para PD-L1 (células tumorales, linfocito y macrófagos), divididas por el número total de células tumorales viables y multiplicadas por 100.

Se considera que la muestra tiene expresión de PD-L1 si el CPS es mayor a 1. Aunque el resultado del cálculo puede superar los 100, la puntuación máxima se define como CPS: 100 (52).

$$CPS = \frac{\# \text{ de células positivas para PDL1 (Células tumorales, linfocitos y macrófagos)}}{\text{Número total de células tumorales viables}} \times 100$$

Cualquier tinción de membrana (parcial o completa) para PD-L1, puntuación $\geq 1+$ en las células tumorales viables, linfocitos y macrófagos debe incluirse en la puntuación (52). (Ilustración 1).

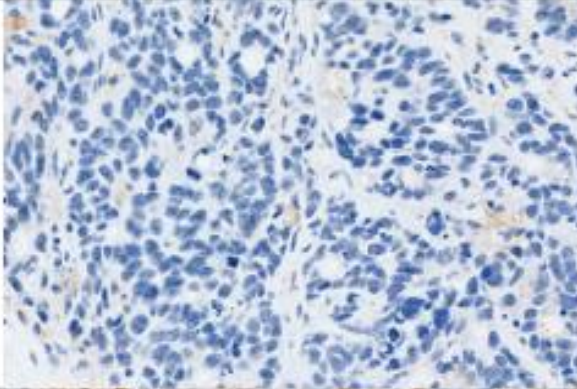
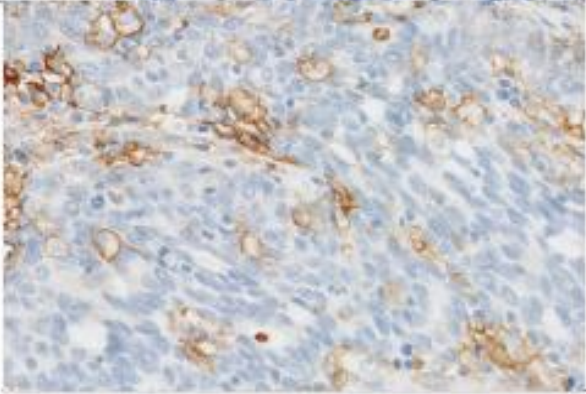
CPS	Nivel de expresión	Imagen (20x)
<1	Sin expresión de PD-L1	
>1	Expresión de PD-L1	

Ilustración 1. Expresión del Score Positivo Combinado

Tomado y modificado de: Agilent Technologies, Inc 2019. Interpretation Manual – Gastric or Gastroesophageal Junction Adenocarcinoma, PD-L1 IHC 22C3 pharmDx [Manual] Recuperado de https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29219_pd-l1-ihc-22C3-pharmdx-gastric-interpretation-manual_us.pdf

ANTECEDENTES

Para la documentación de este estudio se realizó una búsqueda sistemática en las bases de datos: PUBMED, TRIP DATA BASE, GOOGLE SCHOLAR, SCIENCE DIRECT, PROQUEST PUBMED, con el uso de términos MESH – DeCS y palabras clave:

- MESH: Stomach Neoplasms; Epstein-Barr Virus, Infections; Herpesvirus 4, Human; Programmed Cell Death Receptor; Programmed Cell Death 1 Ligand, 2 Protein; CD8 – Positive T – Lymphocytes; Lymphocytes tumor-infiltrating.
- DeCS: Stomach Neoplasms, Herpesvirus 4 Human, Epstein-Barr Virus Infections.
- Palabras clave: Immunoscore, Gastric Adenocarcinoma, PD-L1, immune response, Combined positive score (CPS)

Se obtuvieron 110 artículos de los cuales solo 17 cumplían con los criterios de inclusión. Se tuvieron en cuenta estudios publicados a partir de 2015 en idioma inglés o español, que evaluaran mediante inmunohistoquímica la expresión de PD-L1, PD1 y la presencia de Linfocitos T CD3+ CD8+ en el microambiente tumoral del CG y del CG positivo para Epstein Barr Virus.

En 2016, Sara Derksy colaboradores demostraron que el CG asociado a EBV (EBVaCG) tiene expresión robusta de PD-L1, la cual no se observa en otros tipos de CG; adicionalmente, reportaron que las células inflamatorias PD-L1+ eran infiltrantes del tumor (60). Estos hallazgos en la expresión del ligando de muerte celular programada (PD-L1) fueron corroborados también por Min Dong et al. quienes reportaron que EBVaCG tenía una mayor expresión de PIK3CA y PD-L2 que los casos negativos para EBV (61). Posteriormente, Zhongwu Li y colaboradores manifestaron que la expresión de PD-L1 se asoció significativamente con la infiltración masiva de linfocitos (62), resultados similares a los indicados por Changqing Ma et al, quienes expresaron que el CGaEBV e inestabilidad de microsatélites (MSI) presentan tasas significativamente más altas de PD-L1 y más células T CD8+ en el frente invasivo tumoral, en comparación con los casos negativos para EBV y MSI (12).

Para el 2017, Ruri Saito y colaboradores detectaron mayor expresión de PD-L1 en células de EBVaGC con infiltrado inflamatorio PD-L1+ en su estroma (63). Akihito Kawazoe y colaboradores observaron una fuerte asociación entre la expresión de PD-L1 y altas densidades de linfocitos infiltrantes de tumor CD3+ y CD8+ (64), resultados similares a los expuestos por Elizabeth D Thompson y colaboradores quienes refirieron que el aumento en la densidad del infiltrado linfocitario CD8+ se asoció con un porcentaje creciente de expresión de PD-L1 tanto en células tumorales como en las células del estroma tumoral (65).

En el 2018, Byeong-Joo Noh y colaboradores, manifestaron que la expresión de PD-L1 se asoció significativamente con la infección por el EBV y el estado de MSI, además la inmunoreactividad de PD-L1 se correlacionó positivamente con los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) con sobreexpresión de CD8 o PD-1 (13), esto también fue reportado por Yangyang Wang y colaboradores, quienes confirmaron la correlación positiva mediante el análisis de ARNm PD-L1 y CD8, adicionalmente indicaron que la expresión de PD-L1 y una alta densidad de células T CD8+, se asociaron con un mejor pronóstico, mientras que no observaron diferencias significativas entre la expresión de PD-1 y CD3 (66).

En ese mismo año, Marina A Pereina y colaboradores señalaron que los casos de CG EBV+, se presentan con infiltrado inflamatorio severo y expresión de PD-L1 (14), resultados similares a los proporcionados por Charles J Cho y colaboradores que indican mayor proporción en la sobreexpresión de PD-L1, densidad de TIL y densidad de células TCD8+ intratumorales en los casos de EBVaCG, en comparación a su contraparte negativa (15). Pero posteriormente, Raghav Sundar et al. denotan que una proporción sustancial de EBVaCG, no expresan altos niveles de PD-L1 y otros genes inmunes (67). Jing Ma y colaboradores, compararon 3 clones de anticuerpos disponibles para PD-L1 (SP142, 28-8 y E1LN3), concluyendo que el clon SP142 fue superior en la tinción celular, particularmente en las células inmunes / estromales y pronóstico (68).

En 2019, Irene Gullo y colaboradores, reportaron que la expresión de la proteína PD-L1 observada en las células neoplásicas e inmunes del estroma, y la amplificación de PD-L1 está restringida a tumores con niveles elevados de EBV y MSI (69). Adicionalmente, Joo Yeo Kim y colaboradores, indican que el CG EBV+ y MSI, que son considerados subtipos con mejor pronóstico, se asocian significativamente con niveles más altos de linfocitos infiltrantes de tumor (16). Finalmente Rong Yan y colaboradores, encontraron que la expresión de PD-L1

aumentó en los tejidos de CG y que esta expresión se asocia con metástasis a distancia y una mayor densidad de linfocitos infiltrantes (70).

El último estudio publicado por Kohei Yamashita y colaboradores, quienes buscaron dilucidar el papel del TPS y CPS como biomarcadores pronósticos en cáncer gástrico, demostrando que el CPS es un método de evaluación más útil para determinar la expresión de PD-L1 que el TPS, sugiriendo que el número total de células que expresan PD-L1, incluidas las células tumorales e inmunes, son un biomarcador de pronóstico más sensible que solo el número de células tumorales que expresan PD-L1 (71).

METODOLOGÍA

6.1 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal que usó la técnica de hibridación *in situ* colorimétrica para determinar la infección por EBV y la técnica de inmunohistoquímica para precisar la expresión de las proteínas PD-1 y PD-L1, y el porcentaje de infiltrado inflamatorio CD3+ y CD8+, en muestras de tejido embebido en parafina, de pacientes con gastrectomía y diagnóstico de adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal en estadio II o III, entre los años 2014 y 2016 en el Hospital San José de Popayán.

6.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Población

Pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico, a quienes se les realizó gastrectomía en el Hospital Universitario San José de Popayán, Cauca, durante el periodo comprendido entre el año 2014 y 2016.

Muestra

Pacientes con adenocarcinoma gástrico tipo intestinal en estadio avanzado TNM II o III, a quienes se les realizó gastrectomía en el periodo comprendido entre el año 2014 y 2016, y que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión.

Previo al inicio y desarrollo del proyecto, se solicitó ante el Hospital San José de Popayán el aval de ética para este estudio, el cual fue expedido por la oficina legal del hospital.

6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Diagnóstico de adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal, según la clasificación de Lauren.
- Estadio TNM II o III, según la clasificación del American Joint Committee on Cancer (Ver Tabla 1).
- Realización de gastrectomía entre los años 2014 y 2016.

- Bloques de tejido embebido en parafina en adecuado estado de conservación para la realización de estudios de inmunohistoquímica e hibridación in situ colorimétrica.

6.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Diagnóstico de adenocarcinoma gástrico de tipo difuso, según la clasificación de Lauren.
- Estadío TNM I o IV según la clasificación del American Joint Committee on Cancer.
- Diagnóstico confirmado de inmunosupresión – VIH.
- Antecedente confirmado de neoplasia maligna o enfermedad autoinmune.
- Antecedente de quimioterapia, radioterapia o tratamiento inmunosupresor.

6.5. VARIABLES

- Variables de caracterización clínica: edad al momento del diagnóstico, género, exposición a humo de leña, antecedente endoscópico de: gastritis atrófica, úlcera péptica, *H.pylori*.
- Variables de caracterización histopatológica del tumor gástrico: localización del tumor, tamaño del tumor, clasificación de Borrmann, grado histológico, extensión tumoral, compromiso de ganglios linfáticos, pTNM patológico (Ver Tabla 3), Hallazgos adicionales de: atrofia, metaplasia intestinal, *H.pylori*.
- Variables de caracterización molecular: EBER-ISH, CD3+, CD8+, Inmunoscore, PD-1, Score positivo combinado – CPS.

VARIABLES Dependientes:

- Expresión ISH: EBER
- Expresión IHQ: CD3+, CD8+, Inmunoscore, PD-1, PD-L1 en células tumorales y células inflamatorias (linfocitos y macrófagos) y Score positivo combinado - CPS.

VARIABLES Independientes:

- Edad del paciente al momento del diagnóstico
- Género
- Tabaquismo

- Exposición a humo de leña
- Antecedente endoscopia-biopsia de: gastritis atrófica, úlcera péptica, *H.pylori*
- Tamaño y localización del tumor
- Clasificación de Borrmann
- Grado histológico, extensión tumoral, compromiso de ganglios linfáticos.
- TNM patológico
- Hallazgos histológicos: gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, *H.pylori*.

Ver Anexo 1. Operacionalización de las variables

Variables de Confusión

- Diferenciar la expresión de PD-L1 en linfocitos y macrófagos, de otras células inflamatorias.
- Alteración en la expresión de las inmunotinciones por mala ejecución en la fase preanalítica.

6.6 CONTROL DE SEGOS

Tabla 2. Control de sesgos

Posible sesgo	Corrección
Tinciones de Inmunohistoquímica no concluyentes	Se revisó y ajustó el protocolo para la realización de inmunohistoquímica con el fin de optimizar el proceso.
Error en la interpretación de las tinciones de inmunohistoquímica	Se definió mediante un protocolo la localización del marcaje positivo y cuales corresponden a Background.

6.7 PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS E INSTRUMENTOS

- Se recolectó la información clínica de los pacientes, del sistema electrónico de historias del Hospital Universitario San José de Popayán, Cauca. Se diligenció por cada paciente el instrumento de Recolección de Información (Formato 1) y se asignaron los números de caso, para la codificación de las muestras y resultados, siguiendo el Protocolo de Recolección de la información (Anexo 2).

- Se recolectaron y manejaron las muestras de tejido embebido en parafina de cada uno de los pacientes siguiendo el Protocolo para Recolección y manejo de las muestras (Anexo 3).
- Un especialista en Anatomía Patológica, realizó el estudio patológico microscópico de las muestras con coloración de Hematoxilina & Eosina, en donde confirmó el diagnóstico de adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal y definió el grado histológico, la extensión tumoral, el compromiso ganglionar y el TNM patológico. Estos datos se consignaron en el formato para el Reporte de las características histopatológicas (Formato 3).
- La infección por EBV en las células tumorales, se demostró con la técnica de hibridación in situ EBER-ISH, con la prueba INFORM EBER probe de Roche. El resultado se reportó en el formato de Reporte de pruebas complementarias (Formato 4).
- El infiltrado inflamatorio linfocítico en el centro tumoral y el frente invasivo, se determinó con la técnica de inmunohistoquímica para CD3 (Clon MRQ-39 Cell Marque) y CD8 (Clon SP16 Cell Marque). Los resultados se reportaron en el formato de Reporte de pruebas complementarias (Formato 4).
- La expresión de la proteína PD-1, se estableció con la técnica de inmunohistoquímica para PD-1 (Clon EP239 Cell Marque). Los resultados se reportaron en el formato de Reporte de pruebas complementarias (Formato 4).
- El inmunoscore, se determinó al promediar el porcentaje de infiltrado linfocítico en el centro tumoral y el frente invasivo. El resultado se reportó en el formato de Reporte de pruebas complementarias (Formato 4).
- Se calculó el Score Positivo Combinado – CPS, usando la técnica de inmunohistoquímica para establecer la expresión de PD-L1 (Clon ZR3 Zeta Corporation) en las células tumorales y las células inflamatorias (linfocitos y macrófagos). El resultado se reportó en el formato de Reporte de pruebas complementarias (Formato 4).
- Con los datos clínicos, histopatológicos y el resultado de las pruebas complementarias se creó y desarrolló una base de datos para el análisis estadístico.

6.8 INTERPRETACIÓN DE TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* E INMUNOHISTOQUÍMICA

- La infección por EBV mediante en EBER-ISH (INFORM EBER probe de Roche). Se determinó positiva, la tinción a nivel nuclear en más del 80% de las células tumorales y negativa un porcentaje menor.
- El infiltrado inflamatorio linfocítico CD3+ y CD8+ mediante técnica de inmunohistoquímica. Se consideró positiva, la tinción en la membrana celular, y se cuantificó visualmente el porcentaje promedio de 4 campos de alto poder (40x) representativos del proceso tumoral. Se determinó infiltración baja cuando el porcentaje promedio fue < 20%, infiltración alta si el porcentaje promedio es $\geq 20\%$ (72).
- La expresión de la proteína PD-1, mediante técnica de inmunohistoquímica. Se consideró positiva, la tinción en la membrana celular de los linfocitos infiltrantes del tumor. Se cuantificó el porcentaje de células y la intensidad de la tinción como: 0 =Negativo, 1+ =Débil (tinción amarillo canario) y 2+ = Intermedia - Fuerte (tinción marrón). Se estableció Intensidad Baja: 0 a 1+ e Intensidad Alta: Intensidad 2+ (72).
- Para calcular el inmunoscore, se evaluó por separado el infiltrado linfocítico del centro tumoral (CT) y del frente invasivo (FI). Se promedió el porcentaje del infiltrado CD3+ y CD8+ y se definió un inmunoscore Bajo: 0-25% y Alto: $\geq 25\%$ (59). Se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Inmunoscore} = \frac{\%CD3 \text{ CT} + \%CD3 \text{ FI}}{2} + \frac{\%CD8 \text{ CT} + \%CD8 \text{ FI}}{2}$$

- Para calcular el Score Positivo Combinado – CPS. Se consideró positiva, la tinción en membrana celular (parcial o completa, con un score mayor a 1 (52) utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{CPS} = \frac{\# \text{ de células positivas para PDL1 (Células tumorales, linfocitos y macrófagos)}}{\text{Número total de células tumorales viables}} \times 100$$

6.9 HIPÓTESIS DE TRABAJO

El adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal con inmunoscore alto y sobreexpresión de la proteína PD-L1, está asociado con la infección por el Epstein

Barr Virus. Los casos negativos para el virus, no tienen sobreexpresión de la proteína PD-L1 y el inmunoscore es bajo.

El adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal con inmunoscore alto y sobreexpresión de la proteína PD-L1 no está asociado con la infección por el Epstein Barr Virus. Los casos negativos para el virus, tienen sobreexpresión de la proteína PD-L1 y el inmunoscore es alto.

6.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De acuerdo con los objetivos planteados, se propuso

- Para las variables de caracterización clínica de los pacientes se realizó una distribución porcentual y de frecuencias.
- Para las variables de hallazgos patológicos se realizó una distribución porcentual y de frecuencias.
- Para el EBER-ISH, los resultados se graficaron de manera circular, para identificar los casos positivos en relación a los negativos.
- Se calculó el inmunoscore utilizando los porcentajes de CD3+ y CD8+, caso similar ocurrió con el cálculo del CPS utilizando el PD-L1
- Se realizó un análisis Bivariado entre la variable EBER-ISH y las variables clínicas y patológicas. Para comparar la relación entre variables, se utilizó el estadístico chi-cuadrado de Pearson o estadístico exacto de Fisher según el número de categorías de las variables.
- Los datos se analizaron en el programa estadístico SPSS versión 25.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se siguieron los principios establecidos en la Declaración de Helsinki y la Resolución 008430 de Octubre 4 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, que establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.

El proyecto, buscó contribuir al estudio del infiltrado inflamatorio intratumoral, la expresión de proteínas de control inmunológico como PD-1 y PD-L1, y la infección de las células tumorales del CG por EBV. Además espera que los resultados obtenidos puedan ser utilizados para impulsar nuevos estudios que permitan establecer la incidencia, mortalidad y el impacto de la infección del EBV en el CG, en la población del departamento del Cauca.

Según la Resolución 008430 de 1993 en su artículo 11, el estudio se clasificó como una investigación de riesgo mínimo, en la que se estudiaron muestras de tejido, de los pacientes incluidos en la investigación.

- Los procedimientos se realizaron por personal capacitado.
- Se garantizó la confidencialidad de la información de los pacientes incluidos en el estudio y de los resultados obtenidos mediante el estudio de las muestras.
- La investigación se realizó posterior a la aprobación de la propuesta por parte del Comité de Investigaciones de la Universidad del Cauca y de recibir el aval ético del Hospital San José de Popayán.

El proyecto fue ambientalmente viable y no generó impactos negativos para la salud humana. Los reactivos que se utilizaron en el estudio fueron dispuestos y desechados siguiendo las normas de bioseguridad, por lo tanto; no se presentaron efectos adversos significativos sobre la calidad de los recursos naturales (suelo, agua y aire). Todos los residuos fueron manejados de acuerdo a lo dispuesto en el decreto No. 2676 de diciembre 22 del 2000, el cual reglamenta la gestión de los residuos hospitalarios y similares, el decreto 2811 de 1974 (Código Nacional de Recursos Naturales y de Protección al Medio Ambiente) y el decreto 4741 de 2005 del Ministerio del Medio Ambiente.

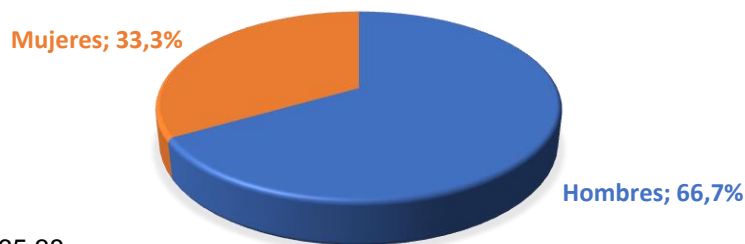
RESULTADOS

Se obtuvieron los resultados y hallazgos que se describen a continuación. Inicialmente se realizó una caracterización clínica de la población y posteriormente se abordó las variables histopatológicas y moleculares.

8.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

En el periodo 2014-2016, en el Hospital San José de Popayán, se diagnosticó adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal en producto de gastrectomía, en un total de 48 pacientes, de los cuales se excluyeron 24 pacientes, por no cumplir con los criterios de inclusión o presentar algún criterio de exclusión.

La población estuvo constituida por los 24 pacientes admitidos en el presente estudio; de los cuales el 66,7% fueron hombres (n=16) y el 33,3% fueron mujeres (n=8). La edad media al momento del diagnóstico fue 65 años con desviación estandar de 12,8 años (Grafico 1).



Edad promedio: 65,38
Desviación Estandar: 12,8

Gráfico 1. Distribución porcentual según género de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.

Al evaluar los antecedentes de los pacientes, el 58,3% no tenía antecedente de consumo de alcohol (n=14) y el 45,8% negó exposición a humo de leña (n=11) (Tabla 3). De igual forma, al valorar los antecedentes endoscópicos, sólo el 12,5% tenía antecedente de gastritis atrófica (n=3), el 8,4% presentaba antecedente de úlcera péptica (n=2) y únicamente el 4,2% tenía antecedentes de *H.pylori* (n=1) (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución porcentual de las variables de antecedentes clínicos de riesgo de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 - 2016.

Variables de antecedentes Clínicos del paciente	n	%
Consumo de alcohol		
No	14	58,3
Si	2	8,4
Sin dato	8	33,3
Expuesto al humo de leña		
No	11	45,8
Si	2	8,4
Sin dato	11	45,8
Antecedente de gastritis atrófica		
No	15	62,5
Si	3	12,5
Sin dato	6	25,0
Antecedente endoscópico de úlcera péptica		
No	15	62,5
Si	2	8,4
Sin dato	7	29,1
Antecedente de <i>H.pylori</i>		
No	16	66,7
Si	1	4,2
Sin dato	7	29,1

8.2 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

Al analizar los hallazgos histopatológicos (Figura 1), el 58,3% de los tumores fueron clasificados endoscópicamente como Borrmann tipo III (n=14) o tumores ulcerados que infiltraban la pared gástrica. La localización tumoral con las más altas proporciones, fue el tercio medio y distal del estómago, con el 37,5% (n=9) y 33,3% (n=8) respectivamente. En el 87,5% de los casos, la extensión tumoral llegaba hasta la muscular propia (n=21) y el 45,8% fueron diagnosticados con grado histológico 2 (n=11) (moderadamente diferenciado). El 75% de los pacientes, les fue realizada gastrectomía total (n=18), como manejo quirúrgico oncológico. El 79,2% de los pacientes presentaron un tumor con mas de 4 cm (n=19) (Grafico 2).

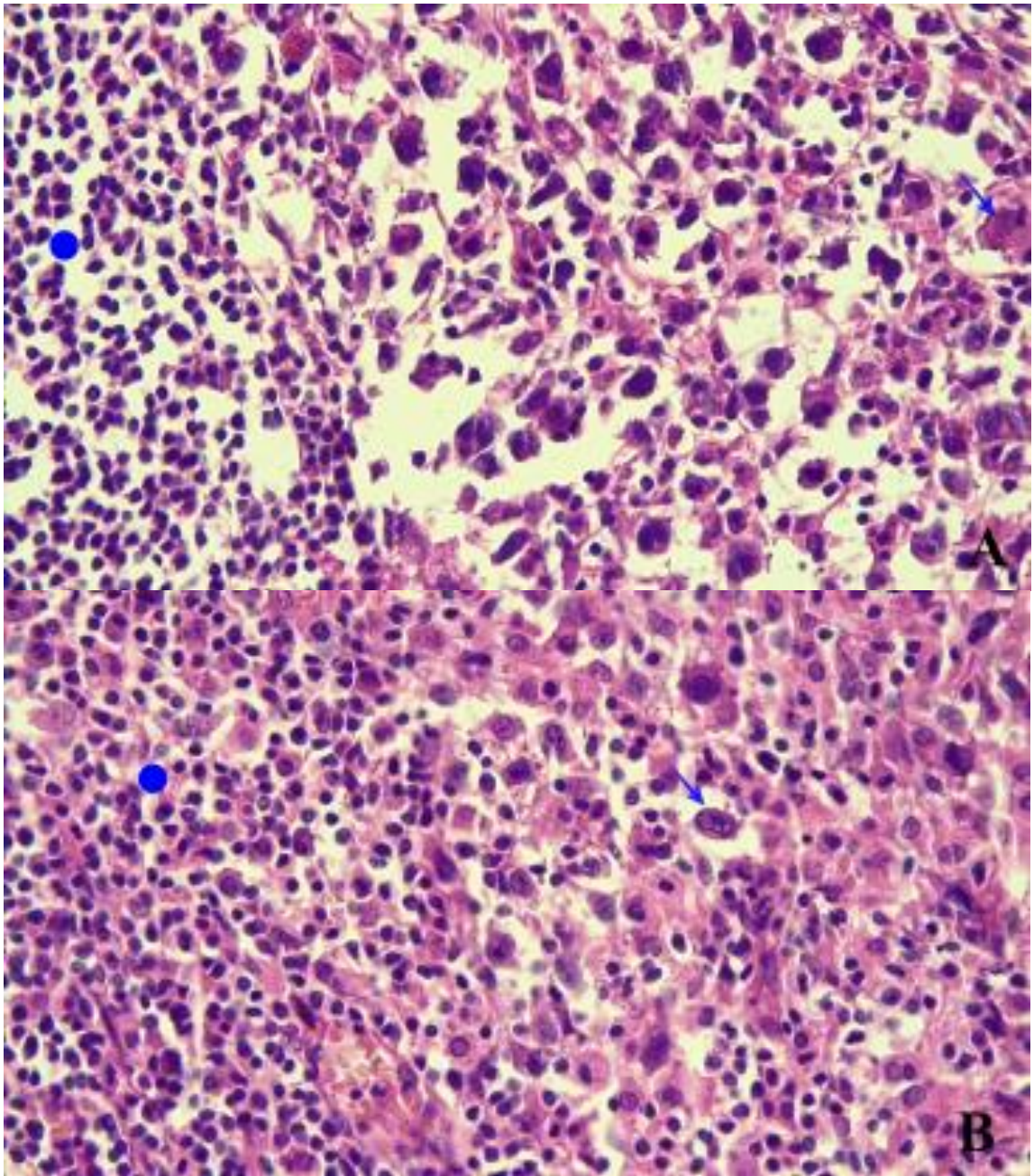


Figura 1. Hallazgos microscópicos de la neoplasia

A y B. Las imágenes muestran ocasionales células neoplásicas pleomórficas (flecha), rodeadas por infiltrado linfoplasmocitario prominente (punto). (Hematoxilina & Eosina, Aumento 40x).

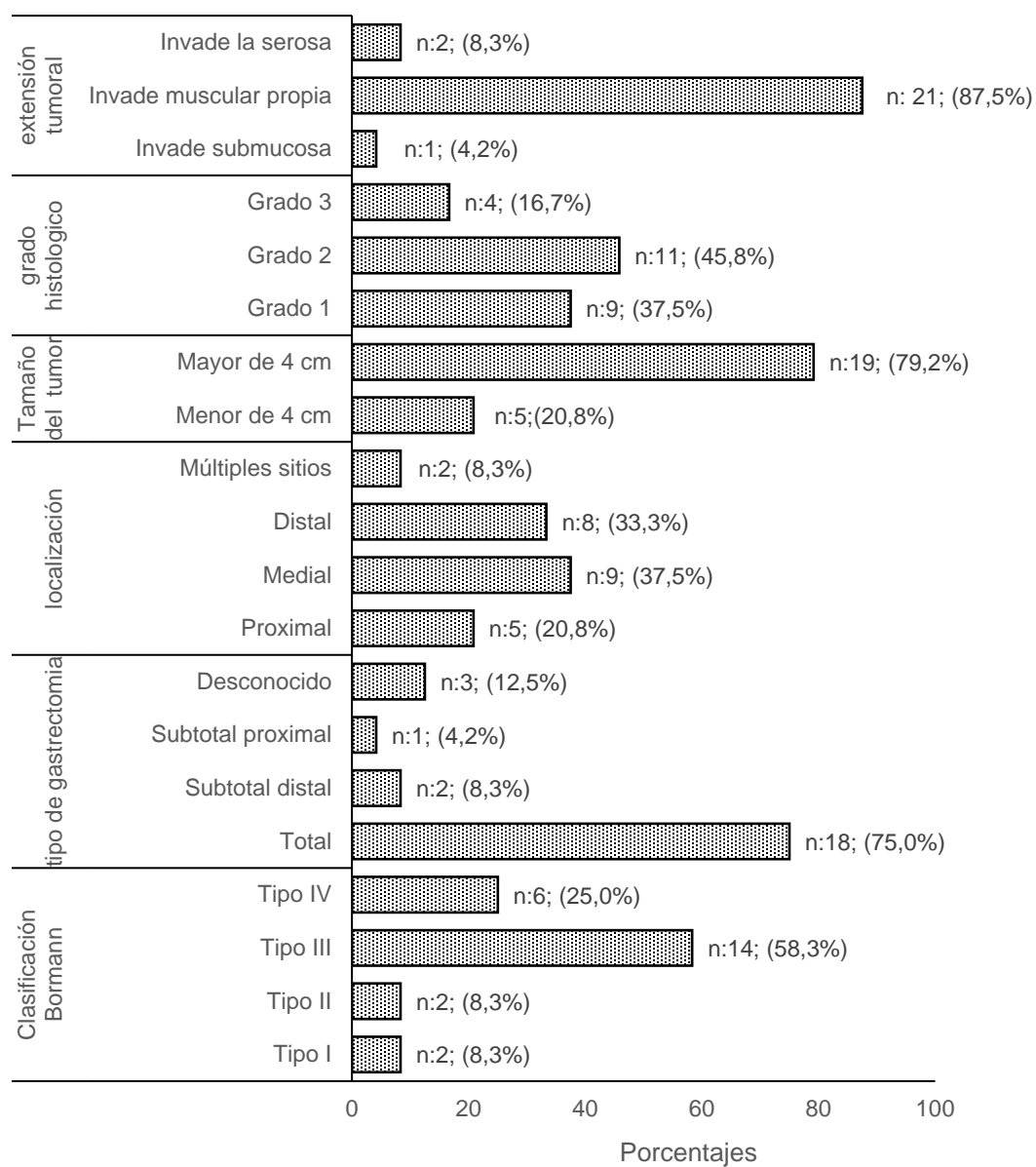


Gráfico 2. Distribución porcentual de las variables histopatológicas de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.

El 87,5% de los casos presentaban invasión linfovascular, al igual que compromiso ganglionar (n=21) y el 41,7% de los pacientes presentaban invasión perineural (n=10). Se identificó invasión linfovascular y perineural concomitante en el 41,7% de los casos (n=10). En el cálculo del TNM patológico, el 45,8% de los pacientes se encontraban en estadio IIIA (n=11) y al evaluar los hallazgos patológicos adicionales, el 83,3% de los pacientes presentaban atrofia (n=20), el 62,5% tenían

metaplasia intestinal (n=15) y en la mitad de los casos (50%) se identificó con infección por *H.pylori* (n=12) (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución porcentual para las variables histopatológicas de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.

Variablen	n (n=24)	%
Invasión Linfovacular		
No identificado	3	12,5
Presente	21	87,5
Invasión Perineural		
No identificado	14	58,3
Presente	10	41,7
Invasión Linfovacular y perivascular concomitante		
No identificado	14	58,3
Presente	10	41,7
Número positivo de ganglios linfáticos		
1 a 2	5	20,8
3 a 6	4	16,7
7 a 15	8	33,3
Igual o mayor a 16	4	16,7
Negativos	3	12,5
TNM Patológico		
IIB	2	8,3
IIIA	11	45,8
IIIB	6	25,0
IIIC	5	20,8
Atrofia		
No	4	16,7
Si	20	83,3
Metaplasia intestinal		
No	9	37,5
Si	15	62,5
H. pylori		
No	12	50,0
Si	12	50,0

8.3 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

EBER-ISH

La expresión de EBV por medio de EBER-ISH, evidenció que de los pacientes del estudio, 5 de ellos correspondientes al 20,8%, presentaban infección por el virus en las células cancerígenas, con esto se confirmó la subpoblación de pacientes EBER-ISH positivos (Gráfico 3).

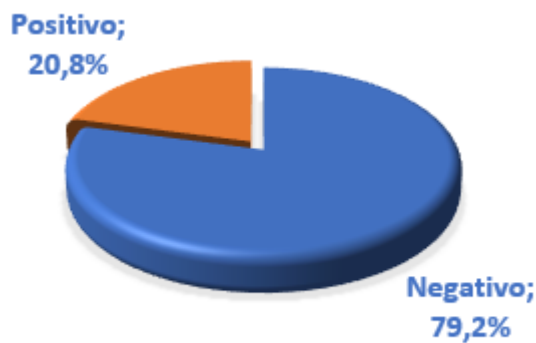


Gráfico 3. Distribución porcentual según método EBER-ISH de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.

De los pacientes EBER-ISH positivos, el 60% eran mujeres y tenían más de 60 años (n=3). Sólo el 40% de los casos tenían como localización del tumor la región proximal o medial del estómago (n=2), y en el 60% (n=3) el tumor tenía diferenciación Grado 1 (bien diferenciado). En el 80,0% de los pacientes (n=4), la extensión tumoral infiltraba hasta la capa muscular propia y tenían invasión linfovascular, pero solo el 60% (n=3) presentaban invasión perineural evidente. El 100% de los pacientes (n=5) tenían compromiso ganglionar y el 60% (n=3) fueron clasificados según el TNM como IIB-III A.

En los hallazgos histopatológicos adicionales, en el 80,0% de los casos (n=4) se identificó atrofia de la mucosa gástrica y en 40% de los pacientes (n=2) se identificó coinfección con *H.pylori* (Tabla 9).

DENSIDAD DE LA POBLACIÓN DE LINFOCITOS T CD3+ Y CD8+, Y PORCENTAJE DE INMUNOSCORE

En cuanto a la densidad de la población de linfocitos asociados al tumor (Figura 2), se encontró variabilidad en el porcentaje del infiltrado linfocítico (Tabla 5). Para el infiltrado CD3+, el valor máximo fue de 71% y el valor mínimo de 8,2%, con un promedio de 21,8% (D.E: 13,6%); en el caso del infiltrado CD8+, el mayor porcentaje fue del 54% y el menor del 2,5%, con un promedio de 14,8% (D.E: 10,9%) (Tabla 6). Por último, en el cálculo del inmunoscore el porcentaje más alto fue del 62,5% y el mas bajo del 6%, con un promedio de 18,1% (D.E: 12,2%) (Tabla 5 y 6).

Tabla 5. Densidad de la población con Linfocitos T CD3+ y CD8+ de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.

Consecutivo	Porcentaje CD3+	Porcentaje CD8+	Porcentaje Inmunoscore
1	13,0	7,5	10,2
2	20,5	10,2	15,4
3	30,5	16,0	23,2
4	14,0	10,5	12,2
5	10,5	6,5	8,5
6	15,5	12,0	13,7
7	18,5	12,0	15,2
8	30,5	20,0	25,2
9	29,0	21,0	25,0
10	8,0	5,5	7,0
11	11,0	7,5	9,2
12	18,0	8,0	13,0
13	22,5	14,0	18,2
14	41,5	28,0	34,7
15	18,0	7,0	12,5
16	27,5	20,0	23,7
17	9,5	2,5	6,0
18	21,0	14,0	17,5
19	8,5	4,0	6,2
20	13,5	7,5	10,5
21	15,0	12,0	13,5
22	22,0	16,5	19,2
23	71,0	54,0	62,5

Tabla 6. Estadísticos descriptivos para las variables CD8+, CD3+ e Inmunoscore de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.

Estadísticos descriptivos	CD3	CD8	Inmunoscore
Promedio	21,8%	14,3%	18,1%
Desviación Estándar	13,6%	10,9%	12,2%
Mediana	18,3%	12,0%	14,5%
Valor Mínimo	8,2%	2,5%	6,0%
Valor Máximo	71,0%	54,0%	62,5%

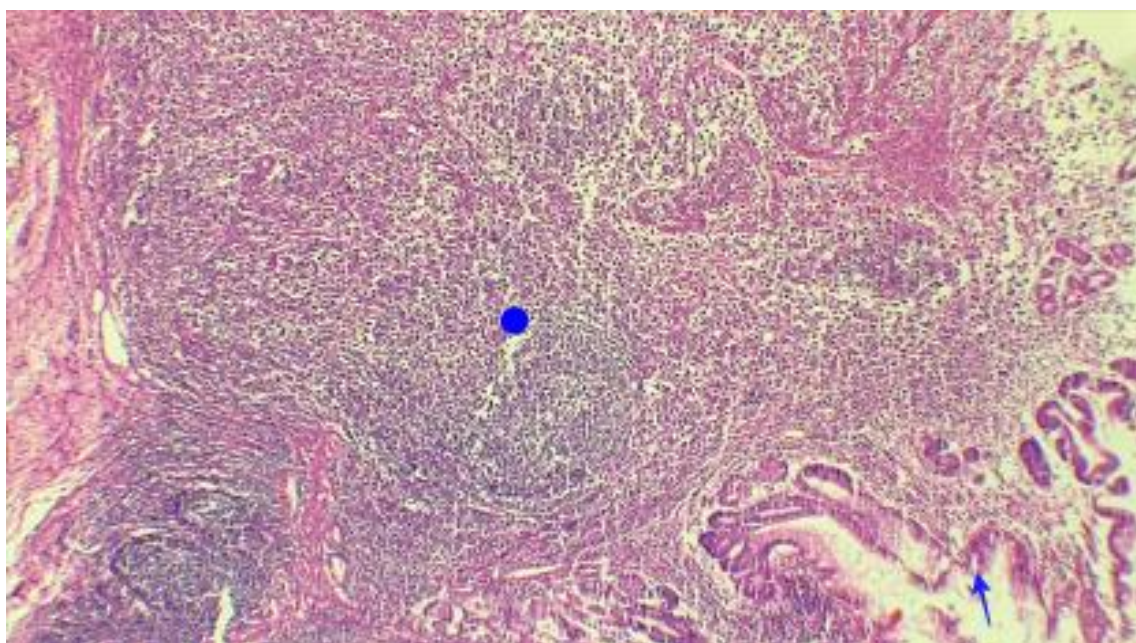


Figura 2. Hallazgos microscópicos del microambiente tumoral
Denso infiltrado inflamatorio mononuclear, con formación folículos linfoides secundarios (punto), en la esquina inferior derecha se reconoce epitelio gástrico reactivo (flecha) (Hematoxilina & Eosina – Aumento 4x).

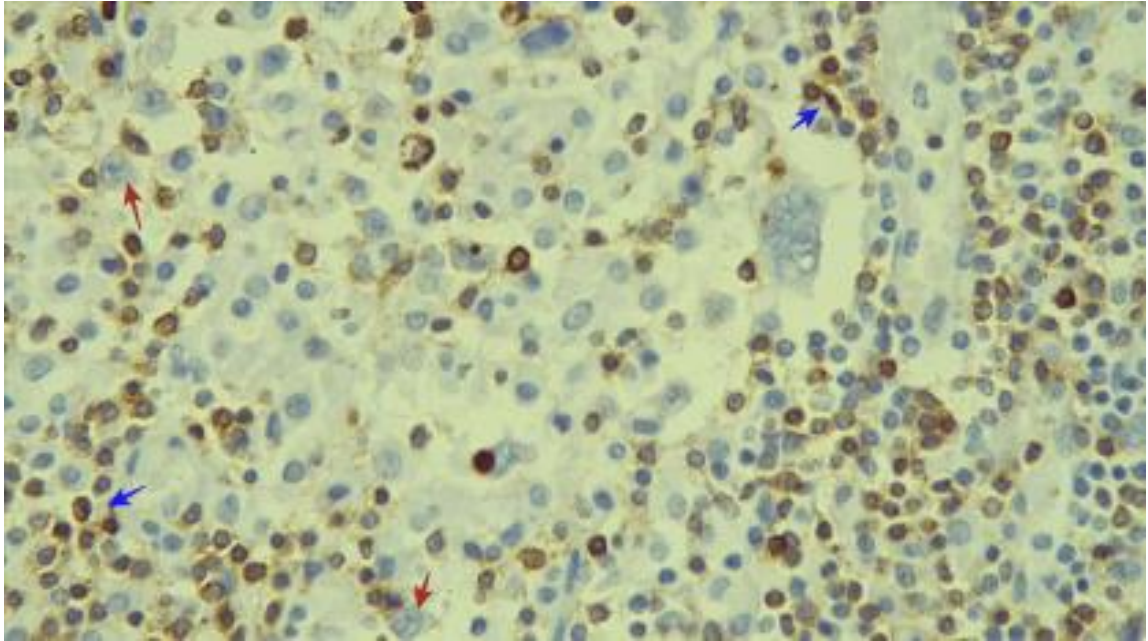


Figura 3. Infiltrado linfocítico CD3+, reactividad por inmunohistoquímica
Células linfoides infiltrantes (flechas azules) y ocasionales células neoplásicas
pleomórficas (flechas rojas) (Inmunohistoquímica - Aumento 40x)

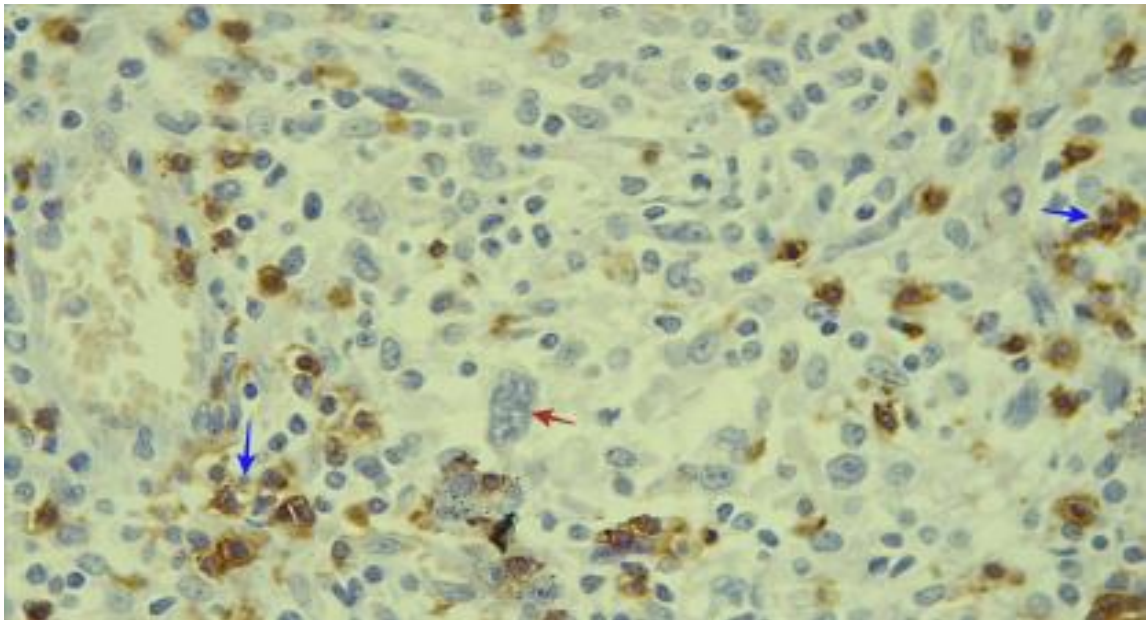


Figura 4. Infiltrado linfocítico CD8+, reactividad por inmunohistoquímica
Células linfoides infiltrantes (flechas azules) y ocasionales células neoplásicas
pleomórficas (flecha roja) (Inmunohistoquímica - Aumento 40x)

Para evaluar la densidad del infiltrado linfocítico CD3+ y CD8+, se tuvo como valor del corte el rango de 20%. El 45,8% de los casos (n=11) fueron CD3+ alto (Figura 4) y solo el 25% CD8+ alto (n=6) (Figura 5). Finalmente, al realizar el cálculo del inmunoscore (score alto >25%) solo el 16,7% de los casos eran inmunoscore alto (n=4) (Grafico 4).

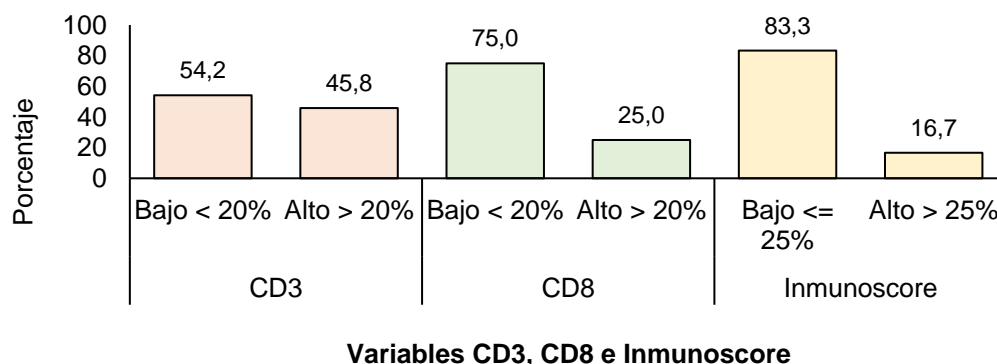


Gráfico 4. Distribución porcentual de las variables CD3+, CD8+ e Inmunoscore de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 - 2016.

El 100% de los pacientes positivos para EBER-ISH (n=5), reportaron inmunoscore bajo ($\leq 25\%$) y densidad del infiltrado CD8+ bajo (<20%). En la evaluación de la densidad del infiltrado CD3+, el 80% de los pacientes (n=4) fueron CD3+ bajo (<20%) y solo el 20% (n=1) tuvo CD3+ alto (>20%) (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución porcentual del EBER-ISH según las variables CD3+, CD8+ e inmunoscore de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.

	EBER-ISH			
	Positivo		Negativo	
	n	%	n	%
CD-3				
Alto > 20%	1	20,0	10	52,6
Bajo < 20%	4	80,0	9	47,4
CD-8				
Alto > 20%	0	0,0	6	31,6
Bajo < 20%	5	100,0	13	68,4
Inmunoscore				

Alto > 25%	0	0,0	4	21,1
Bajo =<25%	5	100,0	15	78,9

INTENSIDAD Y PORCENTAJE DE EXPRESIÓN DE PD-1, Y REPORTE DEL SCORE POSITIVO COMBINADO (CPS)

Al evaluar la expresión de PD-1, el 100% de los pacientes tenían expresión baja de la proteína (<20%) e intensidad débil (1+) (Figura 6). El porcentaje más alto de expresión fue del 5,0% y el más bajo de 0,5%, cada uno se presentó en el 4,2% de los casos (n=1). El 70,8% de los pacientes (n=17) tenían PD-1 del 1,0% y el 20,8% (n=5) del 1,5% (Tabla 8).

Tabla 8. Distribución porcentual de la expresión de PD-1 de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.

PD-1	n	%
1,0%	17	70,8
1,5%	5	20,8
0,5%	1	4,2
5,0%	1	4,2
Total	24	100

El calculo del Score Positivo Combinado (CPS), con el cual se reporta la expresión de la proteína PD-L1, reveló que el 91,7% de los casos (n=22) tuvieron un score <1 y sólo el 8,3% (n=2) tenían un score >1 (Figura 7) (Gráfico 5).

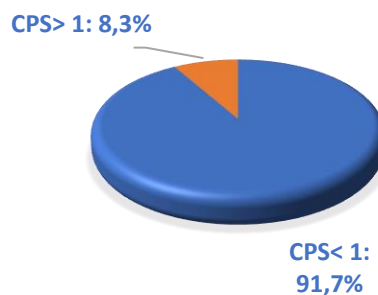


Gráfico 5. Distribución porcentual del CPS de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 -2016.

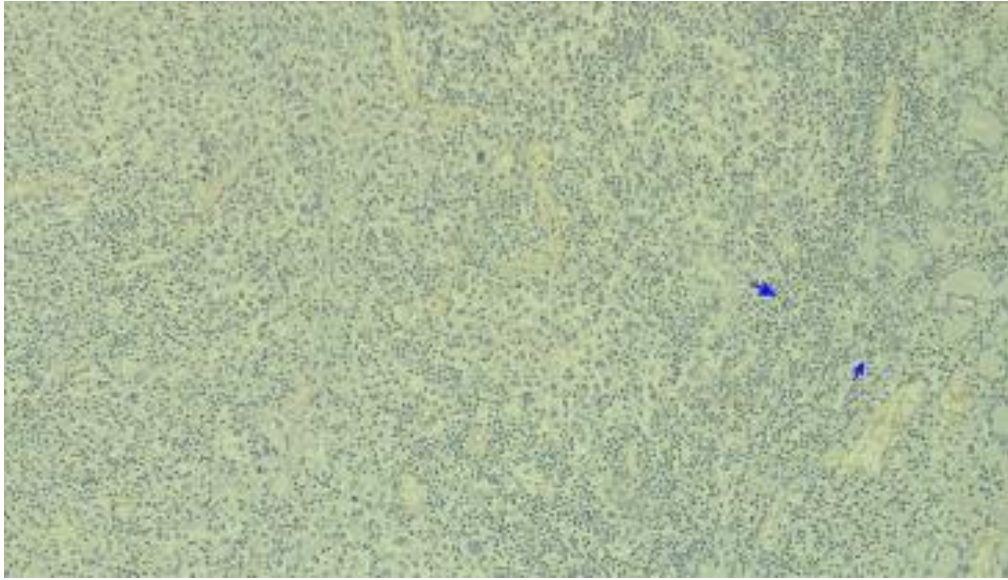


Figura 5. Reactividad por inmunohistoquímica para PD-1
Se observan muy escasos linfocitos con reactividad débil (1+) para PD-1 (flechas).
(Inmunohistoquímica - Aumento 10x).

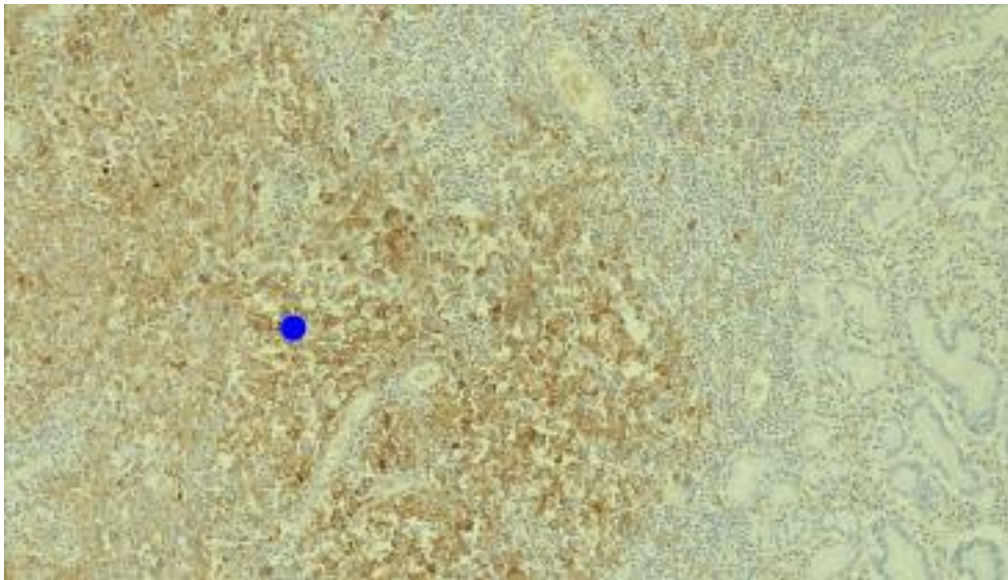


Figura 6. Reactividad por inmunohistoquímica para PD-L1
Reactividad en células neoplásicas e inflamatorias (linfocitos y macrófagos) para PD-L1 (punto). (Inmunohistoquímica - Aumento 10x).

El 100% de los pacientes positivos en la prueba EBER-ISH (n=5), presentaron expresión baja de PD-1 (<20%) e intensidad débil (1+), de igual forma en el 100% de los casos (n=5) el cálculo del CPS el score fue <1 (Tabla 9).

Tabla 9. Distribución porcentual de EBER-ISH según las variables PD-1 y CPS de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 2014 - 2016.

	EBER-ISH			
	Positivo		Negativo	
	n	%	n	%
PD-1				
Alta 2+	0	0,0	0	0,0
Baja: 0 - 1+	5	100,0	19	100,0
CPS				
> 1	0	0,0	2	10,5
< 1	5	100,0	17	89,5

ANÁLISIS BIVARIADO

Al momento de identificar si existían o no diferencias estadísticas entre la prueba EBER-ISH en relación con las variables del estudio se encontró que con ninguna de las variables presentó asociación dado que sus valores de p son mayores a 0,05 (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis bivariado por medio de tablas de contingencia y prueba Chi cuadrado para analizar la relación entre la variable EBER-ISH y demás variables asociadas.

Variables	EBER-ISH				Total	Chi - Cuadrado
	Negativo		Positivo			
	n	%	n	%		
Grupo edad						
Mayor 60 años	12	63,2%	3	60,0%	15	62,5%
Menor o igual a 60 años	7	36,8%	2	40,0%	9	37,5%
Genero						

0,640**

Variables	EBER-ISH				Total		Chi - Cuadrad o
	Negativo		Positivo		n	%	
	n	%	n	%			
Masculino	14	73,7%	2	40,0%	16	66,7%	0,186**
Femenino	5	26,3%	3	60,0%	8	33,3%	
Invasión Linfo Vascular							
No identificado	2	10,5%	1	20,0%	3	12,5%	0,521**
Presente	17	89,5%	4	80,0%	21	87,5%	
Invasión Perineural							
No identificado	12	63,2%	2	40,0%	14	58,3%	0,332**
Presente	7	36,8%	3	60,0%	10	41,7%	
H.pylori							
No	9	47,4%	3	60,0%	12	50,0%	0,500**
Si	10	52,6%	2	40,0%	12	50,0%	
Atrofia							
No	3	15,8%	1	20,0%	4	16,7%	0,635**
Si	16	84,2%	4	80,0%	20	83,3%	
Clasificación Bormann							
Tipo I, II, III	14	73,7%	4	80,0%	18	75,0%	0,634**
Tipo IV	5	26,3%	1	20,0%	6	25,0%	
Grado histológico							
Grado 1	6	31,6%	3	60,0%	9	37,5%	0,255**
Grado 2 y 3	13	68,4%	2	40,0%	15	62,5%	
TNM Patológico							
IIIA y IIB	10	52,6%	3	60,0%	13	54,2%	0,949*
IIIB	5	26,3%	1	20,0%	6	25,0%	
IIIC	4	21,1%	1	20,0%	5	20,8%	
Número positivo de ganglios linfáticos							
Negativos / 1 a 2	7	36,8%	1	20,0%	8	33,3%	0,427*
3 a 6	2	10,5%	2	40,0%	4	16,7%	
7 a 15	7	36,8%	1	20,0%	8	33,3%	
Igual o mayor a 16	3	15,8%	1	20,0%	4	16,7%	
Localización							
Proximal	4	21,1%	1	20,0%	5	20,8%	0,652*
Medial	8	42,1%	1	20,0%	9	37,5%	
Distal	6	31,6%	2	40,0%	8	33,3%	
Múltiples sitios	1	5,3%	1	20,0%	2	8,3%	
Extensión tumoral							

Variables	EBER-ISH				Total		Chi - Cuadrad o
	Negativo		Positivo		n	%	
	n	%	n	%			
Submucosa, muscular propia y Serosa	1	5,3	0	0,0	1	4,2%	0,267*
Invade muscular propia	17	89,5	4	80,0	21	87,5%	
Invade la serosa	1	5,3	1	20,0	2	8,3%	

DISCUSIÓN

Este estudio buscó caracterizar una serie de 24 casos, de pacientes llevados a gastrectomía por diagnóstico de adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal en etapa II y III, en el Hospital San José de Popayán dentro del periodo 2014 a 2016. En estos casos se analizó mediante inmunohistoquímica la expresión de PD-L1/PD-1 y la densidad de linfocitos infiltrantes (CD3+ CD8+) en el microambiente tumoral. Adicionalmente, se determinó la infección por el Virus del Epstein Barr en las células tumorales gástricas, mediante la técnica de hibridación *in situ* colorimétrica.

En la evaluación de las características sociodemográficas, el presente estudio encontró que la media de edad de la población fue de 65 años, con predominio del género masculino (66,7%), lo cual es coincidente con diversos estudios, que reportan mayor riesgo de CG en los hombres en comparación con las mujeres y adicionalmente mencionan que la edad tiene un papel importante en el aumento del riesgo, dado que la población de mayor edad es la afectada principalmente por este cáncer (73–76).

Está establecido que el CG surge como consecuencia de la interacción compleja entre factores propios del huésped y factores ambientales (77). A lo largo del tiempo, se ha descrito la asociación entre estos factores y el desarrollo del cáncer. Se han identificado un total de 52 factores de riesgo (78); pero los factores definitivos para el desarrollo de CG, son el *H.pylori*, el consumo de cigarrillo, el antecedente de cirugía bariátrica (Billroth II), los pólipos gástricos adenomatosos y la secuencia de gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y displasia (3,34,36,79). Estos factores se buscaron en las historias clínicas de los pacientes; sin embargo, en la revisión de los registros médicos, muchos de estos datos no fueron consignados o estaban parcialmente registrados, dificultando la caracterización clínica de los pacientes a estudio.

En esta serie, la exposición previa al humo de leña y el consumo de alcohol (80,81), estuvieron presentes en solo 2 de los pacientes del estudio. De forma similar, solo 1 de los pacientes tenía antecedente de infección por *H.pylori*, 3 tenían antecedente de gastritis atrófica y 2 antecedente de úlcera péptica. Estos hallazgos endoscópicos e histopatológicos, son los que aportan la mayor y mejor información sobre la mucosa gástrica de los pacientes (78,82,83), de igual forma esta información fue limitada y en la mayoría de los casos no fue consignada en las historias clínicas. Desconocer el número de endoscopias realizadas previo al diagnóstico de la malignidad, el intervalo de la vigilancia endoscópica, los hallazgos

endoscópicos y el reporte histopatológico con la clasificación OLGA (Operative Link for Gastritis Assessment) de las muestras de biopsia, no permitió caracterizar adecuadamente a los pacientes y detectar la presencia de lesiones precursoras en la mucosa gástrica, especialmente en la patogénesis del CG de tipo intestinal (84).

Al momento del diagnóstico, en el 70% de los pacientes los tumores se localizaban en la región media y distal del estómago, hallazgo que se correlaciona con lo reportado por la OMS, que indica que el 80% de los casos de CG ocurren en el cuerpo, antro y/o píloro gástrico (7). Como dato adicional al estudio macroscópico, cerca del 80% de los casos la lesión neoplásica era de un tamaño mayor a 4 cm, esto concuerda con lo informado en la literatura sobre los hallazgos macroscópicos de las lesiones en estadios avanzados de la enfermedad (35).

El estudio microscópico de los casos, permitió establecer que en el 87,5% de los pacientes las células neoplásicas infiltraban la capa muscular propia, esto se correlaciona con la definición de CG avanzado, que se caracteriza porque las células tumorales invaden la pared gástrica más allá de la capa submucosa del estómago (85), un hallazgo que se ha relacionado significativamente con esta extensión tumoral avanzada, es la invasión linfovascular (86). Este tipo de invasión, siempre es evaluada y su reporte es de carácter obligatorio en los informes histopatológicos (38), porque provee al médico tratante de un indicador de agresividad y factor pronóstico del cáncer (7,87,88). En nuestro estudio alrededor del 90% de los casos presentaban invasión linfovascular y estos pacientes también tenían afectación ganglionar metastásica, que corrobora la diseminación a través de la linfa hacia los ganglios linfáticos en este cáncer (87,89,90).

Adicionalmente, se determinó la presencia de invasión perineural en el 40% de los pacientes. Así como la invasión linfovascular, este tipo de invasión está relacionada con un estadio avanzado de la enfermedad, así como con una supervivencia precaria a largo plazo (91). Por último, la existencia concomitante de invasión linfovascular y perineural, tiene un impacto pronóstico significativo sobre la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global en los pacientes en estadio II o III (92). En nuestro estudio, se identificó esta invasión concomitante en el 41,7% de los casos.

La evaluación de hallazgos histopatológicos adicionales en las muestras de tejido de las gastrectomías, evidenciaron un aumento en el número de pacientes con infección por *H. pylori* y gastritis atrófica en la mucosa no neoplásica, en comparación con los datos de los antecedentes endoscópicos y de biopsias

gástricas. En el 50% de los casos (n=12), se identificaron formas bacilares de *H.pylori*, infección que inicia la secuencia carcinogénica, que comienza con inflamación crónica de la mucosa gástrica que conduce a gastritis atrófica y posteriormente a metaplasia intestinal (93,94), siendo esta la que precede a la displasia, mejor conocida como condición premaligna del CG (6,35,37). En nuestro estudio, se observó gastritis atrófica en más del 80% de los pacientes y metaplasia intestinal en el 60%, estas cifras se correlacionan mejor con lo descrito sobre la carcinogénesis gástrica, a pesar de no disponer de adecuados datos endoscópicos y clínicos en las historias médicas de los pacientes.

Al igual que la infección por *H.pylori*, se ha establecido que la infección por EBV es otro factor de riesgo para el desarrollo del CG, siendo este el responsable del 7-16% de los casos de este cáncer en el mundo (5,17); además, es considerado desde el 2014 como un subtipo molecular de CG (18,27). Mediante la técnica de hibridación *in situ* colorimétrica, se determinó la infección por EBV en las células gástricas neoplásicas del 20% de los pacientes de nuestro estudio. Teniendo en cuenta esta subpoblación, el 60% de los casos eran mujeres y tenían más de 60 años al momento del diagnóstico, lo cual no se correlaciona con lo reportado para el CG asociado a EBV, que tiene predominio por el sexo masculino con una relación 2:1 o 3:1 y una edad de presentación menor de 60 años (5,49,95).

Este subtipo de CG, se localiza preferencialmente en las regiones medias y proximales del estómago (50,96), en nuestro caso el 40% de los pacientes (n=2) tenían esta localización tumoral. A la evaluación endoscópica según lo descrito por la literatura, este subtipo de CG se presenta como un tumor ulcerado o en forma de platillo con engrosamiento marcado de la pared gástrica (50), estos hallazgos fueron observados en el 80% de los pacientes (n=4) quienes fueron diagnosticados con tumores Bormman tipo III o tumor ulcerado infiltrante.

Al evaluar las características histopatológicas, el 100% de los casos EBV positivos, presentaban lesiones bien a moderadamente diferenciadas, que encajan con las características histopatológicas descritas para este subtipo molecular de CG, específicamente con el subtipo histológico adenocarcinoma de tipo convencional que corresponde a un adenocarcinoma bien a moderadamente diferenciado con infiltración dispersa de linfocitos (36,96). En el 40% de los casos (n=2) se observaron bacilos de *H. pylori*, coinfección importante porque en la literatura se ha informado que el CG asociado a EBV que se deriva de una mucosa gástrica con inflamación crónica inducida por la infección por *H. pylori* (95), corresponde a tumores más agresivos, que refuerzan el papel de esta interacción en el desarrollo

y/o progresión del adenocarcinoma gástrico (97). Adicional a esto, en el 80% de los pacientes (n=4) se observó atrofia en la mucosa gástrica no neoplásica, condición reportada como factor de riesgo para el CG asociado a EBV, porque permite el contacto célula-célula entre los linfocitos portadores de EBV localizados en la lámina propia y las células epiteliales gástricas, favoreciendo la infección del epitelio gástrico por este virus (5).

En los últimos años, se ha estudiado el microambiente tumoral de muchos tipos de cáncer incluido el CG, porque los tumores pueden desregular la expresión de las proteínas del control inmunológico, como un mecanismo para la resistencia inmunitaria frente al sistema inmunológico (11,98). En el caso del CG, múltiples estudios han determinado que los subtipos moleculares asociados EBV y MSI, se caracterizan por presentar abundante infiltrado linfoide en el microambiente tumoral (11–16). Los casos incluidos en este estudio, fueron seleccionados por presentar abundante infiltrado inflamatorio linfocítico en el tejido tumoral, este infiltrado se caracterizó usando la técnica de inmunohistoquímica, con la cual se resaltó la población de linfocitos T citotóxicos, que expresan las moléculas CD3+ y CD8+ (99,100). La densidad del infiltrado inflamatorio en el microambiente tumoral fue variable, siendo las proporciones de CD3+ mayores a las de CD8+, que se explican porque los linfocitos citotóxicos (CD8+) comprenden un subtipo de linfocitos T CD3+ (101).

Para puntuar la densidad del infiltrado linfoide en el microambiente tumoral, se usaron los parámetros del inmunoscore de cáncer de colon, debido a que es el único score validado para evaluar el recuento de los linfocitos T (59). El propósito de este score es proporcionar una estimación relativa de recurrencia de cáncer de colon. Para el caso del CG, se han publicado en la literatura, alrededor de 8 estudios, que correlacionaron el inmunoscore con la supervivencia posquirúrgica y los beneficios quimioterapéuticos para predecir la recurrencia tumoral y la supervivencia de los pacientes, y así complementar el valor pronóstico del sistema de estadificación TNM (72,102–105).

Yuming Jiang y colaboradores en 2018, evaluaron 4 marcadores: CD3, CD8, CD45 y CD66 en el tejido tumoral, con lo cual encontraron diferencias significativas en la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global entre los pacientes con infiltrado alto y los de infiltrado bajo. Concluyeron, que el score del infiltrado inmune es un factor pronóstico independiente, al evaluar casos de CG (104). Posteriormente, Linhai y colaboradores, manifestaron que la puntuación inmunológica podría usarse para reforzar la predicción de resultados clínicos del

sistema de estadificación TNM, y así proporcionar una herramienta para la evaluación de riesgos y selección de tratamiento en pacientes con CG (103). Los hallazgos reportados en estos estudios (72,102–105), son de gran impacto en la estimación del pronóstico y curso clínico de los pacientes con CG; pero dado que la finalidad de este estudio no es determinar la supervivencia, ni el curso clínico de los pacientes, no es posible confrontar los resultados de la literatura, con el inmunoscore de los casos, ya que el valor reportado del inmunoscore corresponde al promedio de células infiltrantes en el microambiente tumoral, como característica de cada tejido neoplásico.

En los casos del estudio, menos el 20% de los pacientes presentaron un inmunoscore alto (puntuación $\geq 25\%$), estos pacientes fueron clasificados en estadio clínico III, 3 de ellos tenían una extensión tumoral que invadía la capa serosa y en el restante las células neoplásicas llegaban hasta la capa muscular, los 4 pacientes tenían invasión linfovascular y compromiso metastásico a los ganglios linfáticos, hallazgos reportados como factores de mal pronóstico en la literatura (7,87–90). Sería de gran interés para futuro estudios, correlacionar el curso clínico de los pacientes y su desenlace, con los hallazgos histopatológicos de cada caso en particular; así, se podría estimar la relación pronóstica del inmunoscore con la supervivencia de los pacientes.

Según la literatura el CG asociado a EBV, se relaciona con un abundante infiltrado inflamatorio en el microambiente tumoral (12,16,55,106), debido a la presencia de antígenos virales que dan como resultado una mayor presentación de neoepítomos, que contribuyen a una respuesta inmune antitumoral (18). Hallazgos corroborados en varios estudios, como el publicado por Marina A Pereina y colaboradores, quienes señalaron que el CG EBV+, se presenta con infiltrado inflamatorio severo (14), y lo referido por Charles J Cho y colaboradores, quienes manifestaron que los casos de CG EBV+ se asocian a una alta densidad de células CD8+ intratumorales, en comparación a su contraparte negativa (15). Sin embargo, en el presente estudio los 5 pacientes EBER-ISH positivos, reportaron un inmunoscore bajo, hallazgo contrario a las características de este subtipo molecular de CG, que como lo mencionamos previamente, se caracteriza por estar asociado a abundante infiltrado linfoide (11–16).

El hallazgo de un bajo inmunoscore en los casos EBER-ISH positivo, puede estar relacionado con la heterogeneidad intratumoral en el tejido neoplásico, que se asocia a la presencia de distintas poblaciones de células tumorales en un tumor y a varios patrones de expresión de genes (107). No obstante, hasta el momento en la

literatura no hay reportes de casos de CG asociados a EBV, que se presenten con bajo infiltrado linfocitario (12,62) por lo tanto no podemos asociar este hallazgo con una causal clara.

Los 4 pacientes que se presentaron con inmunoscore alto, fueron EBER-ISH negativo; al no asociarse a la infección por EBV, se plantea que el cáncer en estos pacientes podría estar relacionado con MSI, otro subtipo molecular de CG que se presenta con abundante infiltrado inflamatorio, el cual se da como respuesta a la alta tasa de mutaciones somáticas, que generan neoantígenos que de igual forma provocan una respuesta del sistema inmunitario (108). La única forma de definir con certeza, si estos pacientes corresponden a este subtipo molecular, sería realizando un panel con marcadores de microsatélites (109).

La determinación y reporte de PD-L1, se realizó siguiendo las guías 2020 de la NCCN para el manejo de CG (38), las cuales indican que el Score Positivo Combinado (CPS) es el método de evaluación más útil para esta molécula (71). En este estudio, solo el 8,3% de los casos (n=2) tuvieron un score >1, los cuales también reportaron los porcentajes más altos en cuanto infiltrado linfocitario CD3+ y CD8+, pero estos pacientes fueron negativos para EBV. Por el contrario, los pacientes positivos para EBV, no tuvieron sobreexpresión de PD-L1 y su score fue <1. Estos resultados, son contrarios a las características del CG EBV+, ya que este subtipo tiene amplificación del gen CD274 que codifica para la proteína PD-L1 (27), lo que conlleva a la expresión robusta de PD-L1, particularidad que no se observa en otros tipos de CG (60). Esta sobreexpresión de PD-L1 ha sido evaluada y corroborada en varios estudios, como el publicado por Byeong-Joo Noh y colaboradores, quienes refieren que la expresión de la molécula se asoció significativamente con la infección por EBV y el estado de MSI (13); estos hallazgos son similares a los divulgados por Marina A Pereina et al. y Charles J Cho et al., quienes indican que los casos de CG EBV+, sobreexpresan PD-L1 en comparación con su contraparte negativa para el virus (14,15).

Aunque los pacientes positivos para EBV no tuvieron sobreexpresión de PD-L1 como se esperaba, este hallazgo puede estar relacionado a lo referido por Raghav Sundar y colaboradores en 2018, quienes manifestaron que una proporción sustancial de casos con CG asociado a EBV, no expresa niveles elevados de PD-L1 y otros agentes inmunes, por una baja expresión transcriptómica de la proteína (67), situación que podría haberse presentado en nuestros casos. Pero este hallazgo, aún no ha sido ampliado en la literatura disponible, por lo tanto desconocemos la razón molecular para la baja transcripción de la proteína al estar

amplificado el gen que la codifica. Adicionalmente, según lo publicado por Zhongwu Li y colaboradores (62) y Byeong-Joo Noh y colaboradores (13), la expresión de PD-L1 se asoció significativamente con la infiltración masiva de linfocitos en el microambiente tumoral. Por lo tanto y debido a que en este estudio, los casos positivos para EBER-ISH presentaron un inmunoscore bajo, esta situación pudo influir en los resultados de la expresión de PD-L1, pero este hallazgo solo se podría confirmar mediante el análisis de ARNm de PD-L1 (66).

Otra explicación para la baja expresión de PD-L1 y la ausencia de sobreexpresión en los casos EBER-ISH positivos, podría deberse a las limitaciones que tiene la inmunohistoquímica como la variabilidad en el rendimiento en los clones que existen en el mercado y los problemas técnicos en la prueba (110). En referencia a esta problemática, existen varios resultados discrepantes en grandes ensayos que utilizan la expresión por inmunohistoquímica para evaluar PD-L1, lo cual ha puesto en duda la utilidad y fiabilidad de este método, al encontrar discordancia entre varios anticuerpos PD-L1 disponibles en el mercado. Por lo tanto, el anticuerpo y algoritmo aprobados por la FDA para determinar la expresión de PD-L1 para su uso clínico como diagnóstico, es Agilent 22C2 PharmDx de Dako Autostainer (67,111).

Al utilizar en nuestro estudio el clon ZR3 de Zeta Corporation para determinar la expresión de PD-L1, es posible que la pobre expresión esté asociada al clon de inmunohistoquímica, como fue reportado en 2020 por Yun Liang y colaboradores en su estudio "Variation of PD-L1 expresión un locally advanced cervical cancer following neoadjuvant chemotherapy", quienes utilizaron el mismo clon y encontraron discrepancias en la intensidad de tinción y la proporción positiva de células (112).

Como se mencionó previamente, la heterogeneidad tumoral también puede reflejar la variabilidad en la expresión de PD-L1, dado que no existe una distribución uniforme en las diversas subpoblaciones tumorales dentro del mismo cáncer (111). Así, publicaciones han demostrado que la heterogeneidad espacial dentro de los distintos tipos de cáncer, se asocia con la expresión versátil de los marcadores de inmunohistoquímica (113,114).

El último marcador evaluado fue la proteína PD-1 que corresponde al receptor presente en la superficie de las células inmunes activadas para el ligando PD-L1 (54). Los resultados de obtenidos en la determinación del porcentaje e intensidad de expresión para esta molécula, evidenciaron que el 100% de los casos presentaron baja expresión de la proteína (<20%) y una intensidad de expresión

igualmente baja (1+). Este hallazgo puede ser explicado, de igual forma por lo referido por Raghav Sundar et al., quienes manifestaron que los tumores con baja expresión de PD-L1 tienden a tener una expresión igualmente reducida de la molécula PD-1 y los demás genes inmunes (67). Situación similar a la encontrada en este estudio, en el cual la mayoría de los casos no presentaron sobreexpresión de PD-L1. Aunque a este momento no hay información adicional que explique y aclare esta asociación, en nuestro estudio se encontró baja expresión tanto de PD-L1 como de PD-1.

Es importante mencionar, que hasta el momento no existe un consenso, para el estudio y la determinación de PD-1, ni la cuantificación del inmunoscore en CG. Por lo tanto, los trabajos que se han realizado y publicado son de carácter investigativo, pero no clínico, ni de diagnóstico. Teniendo esto en cuenta, ni los protocolos del Colegio Americano de Patólogos (CAP), ni las pautas de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) indican la realización de estudios que determinen la expresión de PD-1, ni la cuantificación del inmunoscore en ningún tipo de cáncer humano, dado que no se requiere para el diagnóstico, estadificación, ni el tratamiento de los pacientes (38).

Por el contrario, para la determinación de PD-L1 mediante inmunohistoquímica, hay un clon aprobado por la FDA y en las guías 2020 de la NCCN de CG, están las indicaciones para realizar esta prueba y el algoritmo para su reporte, dado que la determinación de PD-L1 en el tejido tumoral no se efectúa de forma rutinaria en todos los pacientes con diagnóstico de CG. El estudio solo se realiza en pacientes que son candidatos a terapia con inhibidores de PD-1, los cuales tienen enfermedad local avanzada, recurrente o metastásica, debido a que la opción de terapia con Pembrolizumab que es un agente específico para el punto de control inmune PD-L1/PD-1, solo se ofrece como terapia adicional en tercera línea de manejo, para los pacientes con pobre respuesta al manejo oncológico estándar (18,19,28,38).

CONCLUSIONES

Las características del infiltrado linfoide intratumoral, el resultado del cálculo del inmunoscore y la expresión de las moléculas PD-1 y PD-L1, rechazan la hipótesis del trabajo al evidenciar que los casos EBER-ISH positivos no se asociaron con un alto infiltrado inflamatorio, ni con la sobreexpresión de PD-1 y PD-L1, como son las características del subtipo molecular de CG EBV+. Los 2 casos con CPS > 1, tenían inmunoscore alto, pero eran negativos para EBER-ISH. Teniendo en cuenta lo referido en la literatura, sobre los subtipos moleculares de CG que se asocian a abundante infiltrado linfoide y sobreexpresión de PD-L1, es importante considerar en el futuro estudiar el estado de MSI en el CG.

FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Las fortalezas del estudio, están dadas por la innovación y uso de técnicas moleculares para la caracterización de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal en estadio avanzado. Las muestras fueron recolectadas y manejadas desde el inicio, siguiendo los protocolos establecidos, sin presentarse pérdida del material muestreado. Un aspecto importante, es que la determinación del EBER-ISH se realizó mediante el protocolo automatizado de VENTANA (Roche) y adicionalmente la interpretación de los resultados fue realizada por dos patólogos expertos.




La limitación principal, fue la realización manual de la técnica de inmunohistoquímica para los marcadores CD3+, CD8+, PD-1 y PD-L1, debido a que al no realizarse en plataforma automatizada, los factores preanalíticos durante la inmunoreactividad de la prueba, no se pudieron controlar totalmente. Adicionalmente, el anticuerpo utilizado en el estudio para determinar PD-L1, no corresponde al validado y aceptado por la FDA, y se ha reportado que los anticuerpos disponibles en el mercado, presentan diferentes rendimientos, lo cual influye en el resultado de la inmunohistoquímica. Por otro lado, la interpretación del inmunoscore se realizó de forma visual y no sistematizada con software para análisis de imágenes, como fue establecido en el consenso sobre inmunoscore.

Finalmente, el pequeño tamaño de la muestra, fue un valor que no se podía modificar y que dificultó la determinación de asociaciones entre las variables, por lo tanto, los resultados no se pueden extrapolar a la totalidad de la población caucana; además muchos de los datos clínicos necesarios para la caracterización de los pacientes, no se encontraron en los registros porque no fueron consignados en las evaluaciones o controles médicos.

REFERENCIAS

1. Procaccio L, Schirripa M, Fassan M, Vecchione L, Bergamo F, Prete AA, et al. Immunotherapy in Gastrointestinal Cancers. *Biomed Res Int*. 2017;2017.
2. Sierra MS, Cueva P, Bravo LE, Forman D. Stomach cancer burden in Central and South America. *Cancer Epidemiol*. 2016;44:S62–73.
3. Piazuolo MB, Correa P. Gastric cáncer: Overview. *Colomb medica (Cali, Colomb [Internet]*. 2013;44(3):192–201. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4002033&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Redalyc. Cáncer gástrico: una enfermedad infecciosa. 2011;
5. Naseem M, Barzi A, Brezden-Masley C, Puccini A, Berger MD, Tokunaga R, et al. Outlooks on Epstein-Barr virus associated gastric cancer. *Cancer Treat Rev [Internet]*. 2018;66:15–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.03.006>
6. Bello MN, Biarge FS, Arnal MJD, Sejas AG, González MAG. Gastric cancer: an update. *Med [Internet]*. 2020;13(3):117–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.med.2020.01.020>
7. Lokuhetty D, White VA, Watanabe R, Cree IA, Organization. WH, Cancer. IA for R on. *Digestive system tumours*. 2019.
8. Liu X, Meltzer SJ. Gastric Cancer in the Era of Precision Medicine. *Cmgh [Internet]*. 2017;3(3):348–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.02.003>
9. Kim TS, da Silva E, Coit DG, Tang LH. Intratumoral Immune Response to Gastric Cancer Varies by Molecular and Histologic Subtype. *Am J Surg Pathol [Internet]*. 2019 Jun;43(6):851–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30969179>
10. Choi E, Chang MS, Byeon S-J, Jin H, Jung KC, Kim H, et al. Prognostic perspectives of PD-L1 combined with tumor-infiltrating lymphocytes, Epstein-Barr virus, and microsatellite instability in gastric carcinomas. *Diagn Pathol [Internet]*. 2020 Jun 4;15(1):69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32498695>
11. Lazăr DC, Avram MF, Romoșan I, Cornianu M, Tăban S, Goldiș A. Prognostic significance of tumor immune microenvironment and immunotherapy: Novel insights and future perspectives in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2018;24(32):3583.
12. Ma C, Patel K, Singhi AD, Ren B, Zhu B, Shaikh F, et al. Programmed Death-Ligand 1 Expression Is Common in Gastric Cancer Associated With Epstein-Barr Virus or Microsatellite Instability. *Am J Surg Pathol*. 2016 Nov;40(11):1496–506.
13. Noh B-J, Kim JH, Eom D-W. Prognostic Significance of Categorizing Gastric Carcinoma by PD-L1 Expression and Tumor Infiltrating Lymphocytes. *Ann Clin Lab Sci*. 2018 Nov;48(6):695–706.
14. Pereira MA, Ramos MFKP, Faraj SF, Dias AR, Yagi OK, Zilberstein B, et al. Clinicopathological and prognostic features of Epstein-Barr virus infection,

- microsatellite instability, and PD-L1 expression in gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2018 Apr;117(5):829–39.
15. Cho CJ, Kang HJ, Ryu Y-M, Park YS, Jeong HJ, Park Y-M, et al. Poor prognosis in Epstein-Barr virus-negative gastric cancer with lymphoid stroma is associated with immune phenotype. *Gastric cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Japanese Gastric Cancer Assoc*. 2018 Nov;21(6):925–35.
 16. Kim JY, Kim WG, Kwon CH, Park DY. Differences in immune contexts among different molecular subtypes of gastric cancer and their prognostic impact. *Gastric cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Japanese Gastric Cancer Assoc*. 2019 Nov;22(6):1164–75.
 17. Asakawa Y, Okabe A, Fukuyo M, Li W, Ikeda E, Mano Y, et al. Epstein-Barr virus-positive gastric cancer involves enhancer activation through activating transcription factor 3. *Cancer Sci*. 2020;(February):1–11.
 18. Kankeu Fonkoua L, Yee N. Molecular Characterization of Gastric Carcinoma: Therapeutic Implications for Biomarkers and Targets. *Biomedicines* [Internet]. 2018;6(1):32. Available from: <http://www.mdpi.com/2227-9059/6/1/32>
 19. Maleki Vareki S, Garrigós C, Duran I. Biomarkers of response to PD-1/PD-L1 inhibition. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2017;116:116–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.06.001>
 20. Pardo C, de Vries E, Buitrago L, Gamboa O. Atlas de mortalidad por cancer en Colombia [Internet]. 2017. 124 p. Available from: http://www.cancer.gov.co/files/libros/archivos/ATLAS_de_Mortalidad_por_cancer_en_Colombia.pdf
 21. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I BF. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer [Internet]. 2018 [cited 2020 May 3]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>
 22. Ministerio de Salud y Protección Social. Observatorio Nacional de Cáncer. *ONC Colomb*. 2018;1–59.
 23. Jiang Y, Zhang Q, Hu Y, Li T, Yu J, Zhao L, et al. ImmunoScore Signature: A Prognostic and Predictive Tool in Gastric Cancer. *Ann Surg*. 2018;267(3):504–13.
 24. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* [Internet]. 2014;513(7517):202–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature13480>
 25. Sohn BH, Hwang J-E, Jang H-J, Lee H-S, Oh SC, Shim J-J, et al. Clinical Significance of Four Molecular Subtypes of Gastric Cancer Identified by The Cancer Genome Atlas Project. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2017 Jul 26;10.1158/1078-0432.CCR-16–2211. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28747339>
 26. Zhang J, Huang T, Zhou Y, Cheng ASL, Yu J, To KF, et al. The oncogenic role of Epstein–Barr virus-encoded microRNAs in Epstein–Barr virus-associated gastric carcinoma. *J Cell Mol Med*. 2018;22(1):38–45.

27. Kawazoe A, Kuwata T, Kuboki Y, Shitara K, Nagatsuma AK, Aizawa M, et al. Clinicopathological features of programmed death ligand 1 expression with tumor-infiltrating lymphocyte, mismatch repair, and Epstein–Barr virus status in a large cohort of gastric cancer patients. *Gastric Cancer*. 2017;20(3):407–15.
28. Kim HJ, Oh SC. Novel systemic therapies for advanced gastric cancer. *J Gastric Cancer*. 2018;8(1):1–19.
29. Kim K, Yang HK, Kim WH, Kang GH. Combined prognostic effect of PD-L1 expression and immunoscore in microsatellite-unstable advanced gastric cancers. 2017;8(35):58887–902.
30. Jiang Y, Wang H, Wu J, Chen C, Yuan Q, Huang W, et al. Noninvasive imaging evaluation of tumor immune microenvironment to predict outcomes in gastric cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2020 Mar;
31. Londoño, Beatriz; Ramirez, Carlos; Urquijo, Lenis, Ospino, Martha; Londoño, Carolina; Ortiz, Luis; Murillo, Raúl; Piñeros, Marion; Acosta, Jesus; Castellanos V. Plan nacional para el control del cáncer en Colombia 2012-2020. *Minist Salud Y Protección Soc*. 2012;21.
32. Park JY, Fenton HH, Lewin MR, Dilworth HP. <Stomach Epith Neo Iaco 12.Pdf> [Internet]. SECOND EDI. GASTROINTESTINAL AND LIVER PATHOLOGY. Elsevier Inc.; 2020. 142–160 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4377-0925-4/00013-4>
33. Torres J, Correa P, Ferreccio C, Hernandez-Suarez G, Herrero R, Cavazza-Porro M, et al. Gastric cancer incidence and mortality is associated with altitude in the mountainous regions of Pacific Latin America. *Cancer Causes Control* [Internet]. 2013;24(2):249–56. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10552-012-0114-8>
34. D RRM.  Gastric Cancer   [Internet]. Ferris Clinical Advisor 2018. Elsevier Inc.; 2018. 506-507.e2 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-28049-5.00311-1>
35. Lauwers GY. C H A P T E R 2 5 Epithelial Neoplasms of the Stomach [Internet]. Third Edit. Odze and Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas. Elsevier Inc.; 2013. 707-721.e5 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-0747-8.00025-X>
36. Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Fukayama M. Update on epstein-barr virus and gastric cancer (review). *Int J Oncol*. 2015;46(4):1421–34.
37. Correa P. Cáncer gástrico: una enfermedad infecciosa. *Rev Colomb Cirugía* [Internet]. 2011;26:111–7. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2011-75822011000200007&nrm=iso
38. National Comprehensive Cancer Network. Gastric Cancer Version 1.2020 - March 19,2020 [Internet]. [cited 2020 May 12]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/gastric.pdf
39. Espejo Romero H, Navarrete Siancas J. Clasificación de los Adenocarcinomas de estómago . Vol. 23, *Revista de Gastroenterología del Perú* . scielo ; 2003. p. 199–212.

40. Digestivo F, Ku GY. 72 - Cáncer gástrico [Internet]. Sixth Edit. Abeloff. *Oncología Clínica*. Elsevier España, S.L.U.; 2020. 1197–1210 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-84-9113-520-3/00072-2>
41. Wang Z, Jensen MA, Zenklusen JC. A Practical Guide to The Cancer Genome Atlas (TCGA). *Methods Mol Biol*. 2016;1418:111–41.
42. Zuo L, Yue W, Du S, Xin S, Zhang J, Liu L, et al. An update: Epstein-Barr virus and immune evasion via microRNA regulation. *Virol Sin*. 2017;32(3):175–87.
43. Piñuela A, Kwietniewska M, Rawicz-Pruszyński K, Ciseł B, Skórzewska M, Gęca K, et al. The importance of Epstein-Barr virus infection in the systemic treatment of patients with gastric cancer. *Semin Oncol*. 2020;(xxxx).
44. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF. *Microbiología médica [de] Jawetz, Melnick y Adelberg : 26a edición*. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2014.
45. Ryan KJ, Ray CG. Sherris. *Microbiología médica [Internet]*. 2017. Available from: <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=2169>
46. Kerr JR. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *J Clin Pathol*. 2019;72(10):651–8.
47. Dunmire SK, Verghese PS, Balfour HH. Primary Epstein-Barr virus infection. *J Clin Virol [Internet]*. 2018;102(January 2018):84–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.03.001>
48. Cho J, Kang MS, Kim KM. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and specific features of the accompanying immune response. *J Gastric Cancer*. 2016;16(1):1–7.
49. Jácome AA dos A, de Lima EM, Kazzi AI, Chaves GF, de Mendonça DC, Maciel MM, et al. Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: A distinct molecular subtype of the disease? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(2):150–7.
50. Abe H, Kaneda A, Fukayama M. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: Use of host cell machineries and somatic gene mutations. *Pathobiology*. 2015;82(5):212–3.
51. Fukayama M, Ushiku T. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Pathol Res Pract [Internet]*. 2011;207(9):529–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2011.07.004>
52. Agilent DAKO. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Interpretation Manual - Gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. p. 72.
53. Ordonez P, Koriyama C, Ding S, Yoshiwara E, Corvalan AH, Takano J, et al. Identification of the distinctive type iXhol+ strain of Epstein-Barr virus in gastric carcinoma in Peru. *Anticancer Res*. 2011;31(10):3607–13.
54. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity [Internet]*. 2018;48(3):434–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.014>
55. Gong L ping, Chen J ning, Xiao L, He Q, Feng Z ying, Zhang Z gang, et al. The implication of tumor-infiltrating lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Hum Pathol*. 2019;85:82–91.

56. Badalamenti G, Fanale D, Incorvaia L, Barraco N, Listi A, Maragliano R, et al. Role of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with solid tumors: Can a drop dig a stone? *Cell Immunol*. 2019;343(October 2017).
57. Dabbs DJ. Diagnostic immunohistochemistry : theranostic and genomic applications. 2019.
58. Folkl A, Bienzle D. Structure and function of programmed death (PD) molecules. *Vet Immunol Immunopathol [Internet]*. 2010;134(1–2):33–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.006>
59. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou F-S, Bifulco C, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet (London, England)*. 2018 May;391(10135):2128–39.
60. Derks S, Liao X, Chiaravalli AM, Xu X, Camargo MC, Solcia E, et al. Abundant PD-L1 expression in Epstein-Barr Virus-infected gastric cancers. *Oncotarget [Internet]*. 2016 May 31;7(22):32925–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27147580>
61. Dong M, Wang HY, Zhao XX, Chen JN, Zhang YW, Huang Y, et al. Expression and prognostic roles of PIK3CA, JAK2, PD-L1, and PD-L2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Hum Pathol [Internet]*. 2016;53(2016):25–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2016.02.007>
62. Li Z, Lai Y, Sun L, Zhang X, Liu R, Feng G, et al. PD-L1 expression is associated with massive lymphocyte infiltration and histology in gastric cancer. *Hum Pathol [Internet]*. 2016;55:182–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2016.05.012>
63. Saito R, Abe H, Kunita A, Yamashita H, Seto Y, Fukayama M. Overexpression and gene amplification of PD-L1 in cancer cells and PD-L1(+) immune cells in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: the prognostic implications. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc*. 2017 Mar;30(3):427–39.
64. Kawazoe A, Kuwata T, Kuboki Y, Shitara K, Nagatsuma AK, Aizawa M, et al. Clinicopathological features of programmed death ligand 1 expression with tumor-infiltrating lymphocyte, mismatch repair, and Epstein-Barr virus status in a large cohort of gastric cancer patients. *Gastric cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Japanese Gastric Cancer Assoc*. 2017 May;20(3):407–15.
65. Thompson ED, Zahurak M, Murphy A, Cornish T, Cuka N, Abdelfatah E, et al. Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma. *Gut [Internet]*. 2016/01/22. 2017 May;66(5):794–801. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26801886>
66. Wang Y, Zhu C, Song W, Li J, Zhao G, Cao H. PD-L1 Expression and CD8(+) T Cell Infiltration Predict a Favorable Prognosis in Advanced Gastric Cancer. *J Immunol Res*. 2018;2018:4180517.
67. Sundar R, Qamra A, Tan ALK, Zhang S, Ng CCY, Teh BT, et al. Transcriptional analysis of immune genes in Epstein-Barr virus-associated

- gastric cancer and association with clinical outcomes. *Gastric cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Japanese Gastric Cancer Assoc*. 2018 Nov;21(6):1064–70.
68. Ma J, Li J, Qian M, Han W, Tian M, Li Z, et al. PD-L1 expression and the prognostic significance in gastric cancer: a retrospective comparison of three PD-L1 antibody clones (SP142, 28-8 and E1L3N). *Diagn Pathol*. 2018 Nov;13(1):91.
 69. Gullo I, Oliveira P, Athellogou M, Gonçalves G, Pinto ML, Carvalho J, et al. New insights into the inflamed tumor immune microenvironment of gastric cancer with lymphoid stroma: from morphology and digital analysis to gene expression. *Gastric cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Japanese Gastric Cancer Assoc*. 2019 Jan;22(1):77–90.
 70. Yan R, Yang X, Wang X, Wang B, Zhao Y, Huang W, et al. Association Between Intra-Tumoral Immune Response and Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) in Gastric Cancer. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2019 Sep;25:6916–21.
 71. Yamashita K, Iwatsuki M, Harada K, Eto K, Hiyoshi Y, Ishimoto T, et al. Prognostic impacts of the combined positive score and the tumor proportion score for programmed death ligand-1 expression by double immunohistochemical staining in patients with advanced gastric cancer. *Gastric cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Japanese Gastric Cancer Assoc*. 2020 Jan;23(1):95–104.
 72. Wen T, Wang Z, Li Y, Li Z, Che X, Fan Y, et al. A Four-Factor Immunoscore System That Predicts Clinical Outcome for Stage II/III Gastric Cancer. *Cancer Immunol Res [Internet]*. 2017;5(7):524–34. Available from: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2326-6066.CIR-16-0381>
 73. Lyons K, Le LC, Pham YT-H, Borron C, Park JY, Tran CTD, et al. Gastric cancer: epidemiology, biology, and prevention: a mini review. *Eur J cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ*. 2019 Sep;28(5):397–412.
 74. Venerito M, Vasapolli R, Rokkas T, Malfertheiner P. Gastric cancer: epidemiology, prevention, and therapy. *Helicobacter*. 2018;23:e12518.
 75. Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Prz Gastroenterol [Internet]*. 2018/11/28. 2019;14(1):26–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30944675>
 76. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev [Internet]*. 2014/03/11. 2014 May;23(5):700–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24618998>
 77. Ang TL, Fock KM. Clinical epidemiology of gastric cancer. *Singapore Med J*. 2014 Dec;55(12):621–8.
 78. Yusefi AR, Bagheri Lankarani K, Bastani P, Radinmanesh M, Kavosi Z. Risk Factors for Gastric Cancer: A Systematic Review. *Asian Pac J Cancer Prev*

- [Internet]. 2018 Mar 27;19(3):591–603. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29579788>
79. Negovan A, Iancu M, Fülöp E, Bănescu C. Helicobacter pylori and cytokine gene variants as predictors of premalignant gastric lesions. *World J Gastroenterol*. 2019 Aug;25(30):4105–24.
 80. Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R, Polkowski WP. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2018 Feb 7;10:239–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29445300>
 81. Cavatorta O, Scida S, Miraglia C, Barchi A, Nouvenne A, Leandro G, et al. Epidemiology of gastric cancer and risk factors. *Acta Biomed* [Internet]. 2018 Dec 17;89(8-S):82–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30561423>
 82. Graham DY. History of Helicobacter pylori, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014 May 14;20(18):5191–204. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24833849>
 83. Hwang JJ, Lee DH, Lee A-R, Yoon H, Shin CM, Park YS, et al. Characteristics of gastric cancer in peptic ulcer patients with Helicobacter pylori infection. *World J Gastroenterol*. 2015 Apr;21(16):4954–60.
 84. Watari J, Chen N, Amenta PS, Fukui H, Oshima T, Tomita T, et al. Helicobacter pylori associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. *World J Gastroenterol*. 2014 May;20(18):5461–73.
 85. Lewin KJ, Lewin P. Tumors of the esophagus and stomach. *American Registry of Pathology*; 1996.
 86. Li P, Ling Y-H, Zhu C-M, Hu W-M, Zhang X-K, Luo R-Z, et al. Vascular invasion as an independent predictor of poor prognosis in nonmetastatic gastric cancer after curative resection. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(4):3910.
 87. Zhang C-D, Ning F-L, Zeng X-T, Dai D-Q. Lymphovascular invasion as a predictor for lymph node metastasis and a prognostic factor in gastric cancer patients under 70 years of age: A retrospective analysis. *Int J Surg*. 2018 May;53:214–20.
 88. Lee J-H, Kim MG, Jung M-S, Kwon SJ. Prognostic significance of lymphovascular invasion in node-negative gastric cancer. *World J Surg*. 2015 Mar;39(3):732–9.
 89. Arranz PL, Forn FC, Martinez LP, Gonzalez JM, Ferrer CM, Martinez AT. Estadificación inicial del càncer gàstrico mediante TC. *Seram*. 2018;
 90. Osumi H, Kawachi H, Murai K, Kusafuka K, Inoue S, Kitamura M, et al. Risk stratification for lymph node metastasis using Epstein-Barr virus status in submucosal invasive (pT1) gastric cancer without lymphovascular invasion: a multicenter observational study. *Gastric cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Japanese Gastric Cancer Assoc*. 2019 Nov;22(6):1176–82.
 91. De Franco L, Marrelli D, Voglino C, Vindigni C, Ferrara F, Di Mare G, et al. Prognostic Value of Perineural Invasion in Resected Gastric Cancer Patients According to Lauren Histotype. *Pathol Oncol Res*. 2018 Apr;24(2):393–400.

92. Hwang J-E, Hong J-Y, Kim JE, Shim H-J, Bae W-K, Hwang E-C, et al. Prognostic significance of the concomitant existence of lymphovascular and perineural invasion in locally advanced gastric cancer patients who underwent curative gastrectomy and adjuvant chemotherapy. *Jpn J Clin Oncol*. 2015 Jun;45(6):541–6.
93. Ramos AR, Sánchez RS. Helicobacter pylori y cáncer gástrico. *Rev Gastroenterol del Perú*. 2017;28(3):258–66.
94. Yao X, Smolka AJ. Gastric Parietal Cell Physiology and Helicobacter pylori-Induced Disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2019/03/01. 2019 Jun;156(8):2158–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30831083>
95. Nishikawa J, Iizasa H, Yoshiyama H, Shimokuri K, Kobayashi Y, Sasaki S, et al. Clinical Importance of Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2018 May 29;10(6):167. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29843478>
96. Song H-J, Kim K-M. Pathology of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and its relationship to prognosis. *Gut Liver* [Internet]. 2011/06/24. 2011 Jun;5(2):143–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21814592>
97. de Souza CRT, Almeida MCA, Khayat AS, da Silva EL, Soares PC, Chaves LC, et al. Association between Helicobacter pylori, Epstein-Barr virus, human papillomavirus and gastric adenocarcinomas. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2018 Nov 21;24(43):4928–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30487702>
98. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252–64.
99. Carty SA, Riese MJ, Koretzky GA. T-Cell Immunity. In: Hoffman MD R, Benz MD EJ, Silberstein MD LE, Heslop MD, DSc (Hon) HE, Weitz MD JI, Anastasi MD J, et al., editors. 2018. p. 221–39. Available from: <https://www.clinicalkey.es/#!/content/3-s2.0-B9780323357623000214>
100. Riley RS. Laboratory Evaluation of the Cellular Immune System. In: McPherson MD, MSc RA, Pincus MD, PhD MR, editors. 2017. p. 890-912.e5. Available from: <https://www.clinicalkey.es/#!/content/3-s2.0-B9780323295680000450>
101. Hohl TM. Defensa contra la infección mediada por células. In: Bennett MD, MACP JE, Dolin MD R, Blaser MD MJ, editors. 2016. p. 55–76. Available from: <https://www.clinicalkey.es/#!/content/3-s2.0-B9788490229170000068>
102. Yun S, Koh J, Nam SK, Kwak Y, Ahn S-H, Do Park J, et al. Immunoscore is a strong predictor of survival in the prognosis of stage II/III gastric cancer patients following 5-FU-based adjuvant chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02694-6>
103. Li L, Ouyang Y, Wang W, Hou D, Zhu Y. The landscape and prognostic value of tumor-infiltrating immune cells in gastric cancer. *PeerJ*. 2019;7:e7993.

104. Jiang Y, Zhang Q, Hu Y, Li T, Yu J, Zhao L, et al. ImmunoScore Signature: A Prognostic and Predictive Tool in Gastric Cancer. *Ann Surg*. 2018 Mar;267(3):504–13.
105. Wang M. ImmunoScore predicts gastric cancer postsurgical outcome. Vol. 18, *The Lancet. Oncology*. England; 2017. p. e68.
106. Dai C, Geng R, Wang C, Wong A, Qing M, Hu J, et al. Concordance of immune checkpoints within tumor immune contexture and their prognostic significance in gastric cancer. *Mol Oncol [Internet]*. 2016/09/24. 2016 Dec;10(10):1551–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27720576>
107. Sung J-Y, Shin H-T, Sohn K-A, Shin S-Y, Park W-Y, Joung J-G. Assessment of intratumoral heterogeneity with mutations and gene expression profiles. *PLoS One*. 2019;14(7):e0219682.
108. Rodriquenz MG, Roviello G, D’Angelo A, Lavacchi D, Roviello F, Polom K. MSI and EBV Positive Gastric Cancer’s Subgroups and Their Link With Novel Immunotherapy. *J Clin Med [Internet]*. 2020 May 11;9(5):1427. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32403403>
109. Park J, Shin S, Yoo HM, Lee S-W, Kim JG. Evaluation of the Three Customized MSI Panels to Improve the Detection of Microsatellite Instability in Gastric Cancer. *Clin Lab*. 2017 Apr;63(4):705–16.
110. Wang X, Teng F, Kong L, Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther [Internet]*. 2016 Aug 12;9:5023–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27574444>
111. Yamashita K, Iwatsuki M, Ajani JA, Baba H. Programmed death ligand-1 expression in gastrointestinal cancer: Clinical significance and future challenges. *Ann Gastroenterol Surg*.
112. Liang Y, Yu M, Zhou C, Zhu X. Variation of PD-L1 expression in locally advanced cervical cancer following neoadjuvant chemotherapy. *Diagn Pathol*. 2020;15(1):1–8.
113. Yan T, Cui H, Zhou Y, Yang B, Kong P, Zhang Y, et al. Multi-region sequencing unveils novel actionable targets and spatial heterogeneity in esophageal squamous cell carcinoma. *Nat Commun*. 2019 Apr;10(1):1670.
114. Hatogai K, Fujii S, Kitano S, Kojima T, Daiko H, Yoshino T, et al. Relationship between the immune microenvironment of different locations in a primary tumour and clinical outcomes of oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2020 Feb;122(3):413–20.

ILUSTRACIONES

Ilustración 2. Rotulación de los bloques de parafina

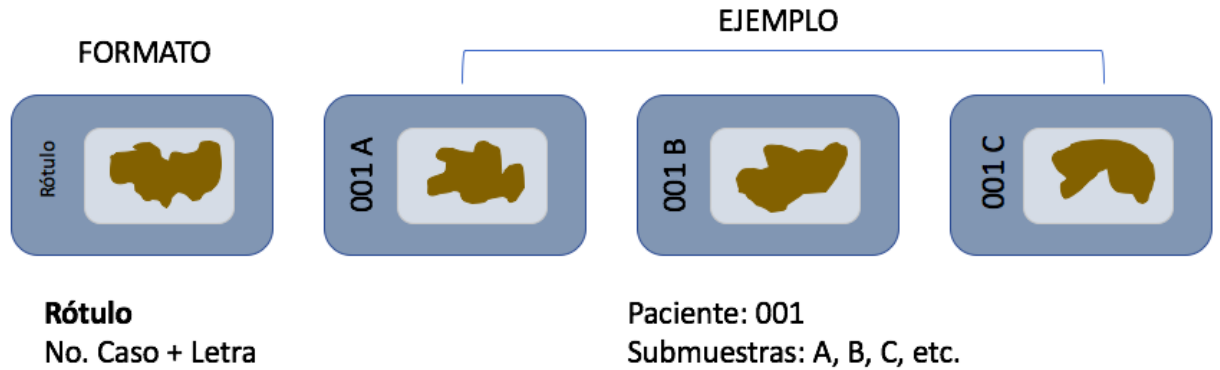
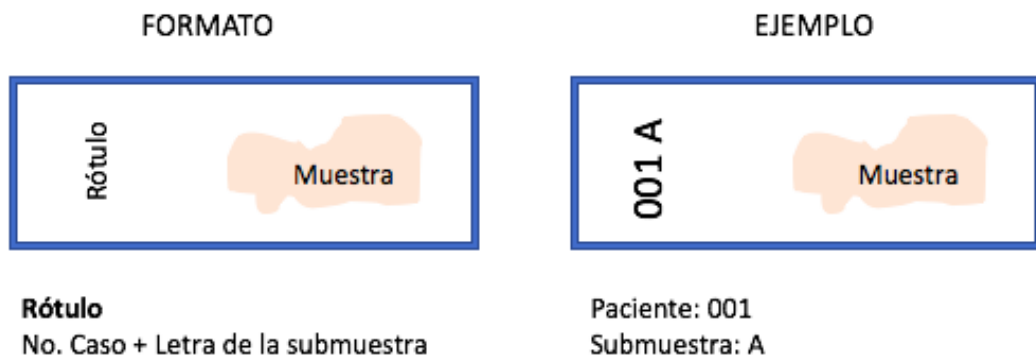


Ilustración 3. Lámina para Coloración Hematoxilina & Eosina



ANEXOS

Anexo 1. Operacionalización de variables

Nombre	Definición Operativa	Cualitativa / Cuantitativa	Escala	Codificación	Análisis
Edad	Edad en años cumplidos al momento de la toma de la biopsia diagnóstica	Cuantitativa	Razón	N. A	Media y DE
Sexo	Condición biológica que lo define como hombre o mujer.	Cualitativa	Nominal	1. Hombre 2. Mujer	Frecuencias y porcentajes
Tabaquismo	Hábito tabáquico, 5 cigarrillos o más por un periodo mayor a 5 años.	Cualitativa	Nominal	0. No 1. Si 2. Sin dato	Frecuencias y porcentajes
Humo de Leña	Número de horas de exposición al humo de leña al año.	Cualitativa	Nominal	0. No 1. Si 2. Sin dato	Frecuencias y porcentajes
Gastritis atrófica	Antecedente endoscópico-biopsia de gastritis atrófica, previo al diagnóstico de cáncer gástrico	Cualitativa	Nominal	0. No 1. Si 2. Sin dato	Frecuencias y porcentajes
Úlcera Péptica	Antecedente endoscópico-biopsia de úlcera péptica, previo al diagnóstico de cáncer gástrico	Cualitativa	Nominal	0. No 1. Si 2. Sin dato	Frecuencias y porcentajes
Helicobacter Pylori	Antecedente endoscópico-biopsia de infección por <i>H.pylori</i> , previo al diagnóstico de cáncer gástrico	Cualitativa	Nominal	0. No 1. Si 2. Sin dato	Frecuencias y porcentajes
Localización	Localización del tumor en el estómago	Cualitativa	Nominal	1. Cardias – Fondo 2. Fondo – Cuerpo	Frecuencias y porcentajes

				3. Cuerpo – Antro 4. Antro – Píloro 5. Fondo - Cuerpo – Antro – Píloro	
Tamaño del tumor	Diámetro mayor del tumor en el estudio macroscópico	Cuantitativa	Ordinal	1. <4cm 2. ≥4cm	Frecuencias y porcentajes
Clasificación de Borrmann	Clasificación para el cáncer gástrico avanzado que excede los 3-4cm de tamaño e invade la muscular como mínimo.	Cualitativa	Ordinal	1. Tipo I 2. Tipo II 3. Tipo III 4. Tipo IV 5. Sin dato	Frecuencias y porcentajes
Grado histológico	Grado de diferenciación histológica del cáncer gástrico	Cualitativa	Ordinal	1. Grado 1 2. Grado 2 3. Grado 3 4. Sin dato	Frecuencias y porcentajes
Extensión tumoral	Tejido comprometido por el tumor.	Cualitativa	Ordinal	1. Invade la muscular propia. 2. Invade la serosa 3. Invade estructuras adyacentes	Frecuencias y porcentajes
Número positivo de ganglios linfáticos	Número de ganglios linfáticos con presencia de metástasis	Cualitativo	Ordinal	1. 1-2 Ganglios 2. 3-6 Ganglios 3. 7-15 Ganglios 4. >16 Ganglios 5. Negativos	Frecuencias y porcentajes
TNM patológico 8va edición	Sistema de clasificación, que describe el tamaño del tumor y su diseminación, el compromiso de ganglios linfáticos y las metástasis	Cualitativo	Ordinal	1. Estadio IIA 2. Estadio IIB 3. Estadio IIIA 4. Estadio IIIB	Frecuencias y porcentajes

	a distancia, determinado por los hallazgos histológicos de las muestras de tejido.			5. Estadio IIIC	
Hallazgos histopatológicos asociados	Presencia de hallazgos histopatológicos adicionales al momento de la revisión de las láminas de hematoxilina & eosina. - Atrofia gástrica - Metaplasia intestinal - <i>H.pylori</i>	Cualitativo	Nominal	0. No 1. Si 2. Sin dato	Frecuencias y porcentajes
EBER-ISH	Inmunoreactividad en el núcleo de las células tumorales	Cualitativo	Nominal	0. Negativo 1. Positivo	Frecuencias y porcentajes
CD3+/IHQ	Inmuntinción en la membrana celular y citoplasma de los linfocitos, en el centro tumoral y en el frente invasivo.	Cualitativo	Ordinal	0.Bajo <20% 1.Alto ≥20%	Frecuencias y porcentajes
CD8+/IHQ	Inmuntinción en la membrana citoplasmática de los linfocitos, en el centro tumoral y en el frente invasivo.	Cualitativo	Ordinal	0.Bajo <20% 1.Alto ≥20%	Frecuencias y porcentajes
PD-1 en células linfoides	Inmuntinción en la membrana citoplasmática de los linfocitos infiltrantes del tumor.	Cualitativo	Ordinal	0.Bajo 0 – 1+ 1.Alto 2+	Frecuencias y porcentajes
Inmunoscore	Expresion de CD3+ y CD8+ en el microambiente tumoral	Cualitativo	Ordinal	0. Bajo <25% 2. Alto ≥25%	Frecuencias y porcentajes
Score Positivo Combinado	Expresión de PD-L1, mediante IHQ, en la membrana de las células tumorales y células inflamatorias (linfocitos y macrófagos)	Cualitativo	Ordinal	0. <1 1. >1	Frecuencias y porcentajes

Anexo 2. Protocolo de Recolección de la información

PROTOCOLO PARA RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

- 1.** Usando la base de datos del Hospital Universitario San José de Popayán, Cauca, seleccionar los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal a quienes se les realizó gastrectomía, en el periodo comprendido entre los años 2014 y 2016.
- 2.** Revisar las historias clínicas, para caracterizar sociodemográfica, clínica y patológicamente, a los pacientes seleccionados en el punto No.1
- 3.** Diligenciar para cada paciente seleccionado en el punto No. 1, el instrumento para la Recolección de la Información (Formato 1), y con los datos obtenidos elaborar la base de datos (Ver Documento Anexo).
 - Definir los pacientes que cumplen con los criterios de inclusión y de exclusión para el trabajo de investigación.
 - Asignar a los pacientes incluidos en la investigación el número de caso para la codificación de la información.
- 4.** Reportar los hallazgos de la caracterización histopatológica, definidos sobre las láminas de Hematoxilina y Eosina, por el especialista en Anatomía Patológica de la Universidad del Cauca, en el Formato: Reporte Características Histopatológicas (Formato 3).
 - Incluir las características histopatológicas en la base de datos de los pacientes.
- 5.** Reportar los hallazgos de EBER-ISH e inmunohistoquímica en el formato: Reporte de Pruebas Complementarias (Formato 4)
 - Incluir los resultados en la base de datos de los pacientes.

Anexo 3. Protocolo de Recolección y análisis de las muestras

PROTOCOLO RECOLECCIÓN Y MANEJO DE LAS MUESTRAS

1. Buscar los bloques de parafina de los pacientes incluidos en el trabajo de investigación (Pacientes que cumplen con los criterios de inclusión y exclusión).
2. Rotular los bloques de parafina de cada paciente con el número del caso (Ver Ilustración 2) y asignar una letra en orden alfabético a cada submuestra.
 - Consignar el rótulo (No. del caso + letra) y el tipo de muestra, en Formato 2
3. Elaborar las láminas para coloración con Hematoxilina y Eosina: (Ilustración 3)
 - Realizar 1 lámina por submuestra de cada caso. Con el micrótomo realizar cortes de 5µm a cada uno de los bloques de parafina y montar el tejido en las láminas portaobjetos.
 - Rotular las láminas portaobjetos con el número de caso + Letra correspondiente.
4. Realizar Protocolo de Coloración con Hematoxilina y Eosina (Ver Anexo 4), a las láminas elaboradas en Punto No.3.
5. Enviar a los laboratorios de Patología externos el bloque de tejido más representativo del proceso tumoral de cada paciente para la realización de EBER-ISH y los marcadores de Inmunohistoquímica.

Anexo 4. Protocolo Hematoxilina y Eosina

PROTOCOLO PARA COLORACIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA

1. Desparafinar las muestras:

Colocar las láminas portaobjetos en el horno a 60°C durante 10 min y posteriormente sumergir en Xilol; se deben realizar tres baños de 10 min c/uno.

Nota: Durante todo el proceso los diferentes reactivos / soluciones deben cubrir por completo las láminas portaobjetos.

2. Hidratar:

Sumergir las láminas portaobjetos en la batería de alcoholes a concentraciones decrecientes (de 100% al 50%) y agua, tres minutos en cada recipiente.

3. Hematoxilina:

Sumergir las láminas portaobjetos en el recipiente de Hematoxilina durante tres a cinco minutos, después pasar a un recipiente con agua y agitar varias veces, se debe cambiar el agua hasta que ésta sea transparente, momento en el cual se retirarán las láminas portaobjetos del recipiente.

4. Diferenciación en alcohol ácido:

Sumergir las láminas portaobjetos en el recipiente con alcohol ácido de forma rápida 1 -2 seg y retirarlas. Después pasar a un recipiente con agua y agitar varias veces durante 2 min.

5. Intensificación en carbonato de litio:

Sumergir las láminas portaobjetos en el recipiente en carbonato de litio durante 10 seg y retirarlas. Después pasar a un recipiente con agua y agitar varias veces durante 2 min.

6. Eosina:

Sumergir las láminas portaobjetos en el recipiente de Eosina durante tres minutos, después pasar a un recipiente con agua y enjuagar durante 2 min.

7. Deshidratación:

Sumergir las láminas portaobjetos en la batería de alcoholes a concentraciones crecientes, de alcohol al 50% a 96%, dejar en cada recipiente durante 30 segundos, luego sumergir las láminas portaobjetos en el recipiente con alcohol al 100% y dejar durante 10 min.

8. Xilol:

Sumergir las láminas portaobjetos en 3 recipientes con Xilol durante 5 min cada uno.

9. Montaje:

Colocar sobre la muestra una gota de líquido para montaje y una laminilla superpuesta. Dejar secar.

FORMATOS

Formato 1. Instrumento para Recolección de Información

INSTRUMENTO PARA RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

Nombre:			
Identificación:			
Edad al momento del diagnóstico:			
Género	1.Masculino		2. Femenino
Estado del paciente al momento de la encuesta	0.Fallecido		1. Vivo
Consumo de alcohol	0.No	1.Si	Consumo por semana:
Consumo de tabaco	0.No	1.Si	Consumo por semana:
Exposición a humo de leña	0.No	1.Si	Cuantos años:
Antecedente de Hipertensión arterial	0.No	1.Si	Edad al diagnóstico:
Antecedente de diabetes mellitus	0.No	1.Si	Edad al diagnóstico:
Antecedente endoscopia-biopsia gastritis atrófica	0.No	1.Si	Fecha o Edad:
Antecedente endoscopia-biopsia ulcera péptica	0.No	1.Si	Fecha o edad:
Antecedente endoscopia-biopsia <i>H.pylori</i>	0.No	1.Si	Recibió tratamiento:

TNM clínico	1.IIA	2.IIB	3.IIIA	4.IIIB	5.IIIC		
Clasificación de Borrmann	1.Tipo I	2.Tipo II	3.Tipo III	4.Tipo IV			
Tipo de Gastrectomía	1.Total	2. Subtotal Distal	3. Subtotal Proximal	4. Desconocido			
Localización	1.Cardias	2.Fondo	3.Fondo P anterior				
	4.Fondo posterior P	5.Cuerpo	6.Cuerpo P anterior				
	7.Cuerpo posterior P	8. Cuerpo C menor	9. Cuerpo C mayor				
	10.Antro		11. Píloro				
	12.Sitios superpuestos		13.No especificado				
Tamaño del tumor al examen macroscópico de la pieza quirúrgica	1.<4cm		2.>4cm				
Grado histológico	0.Grado 0	1.Grado 1	2.Grado 2	3.Grado 3			
Extensión tumoral	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Invasión linfovascular	0.No identificado			1.Presente			
Invasión perineural	0.No identificado			1.Presente			
Compromiso de ganglios linfáticos	0.No identificado			1.Presente			

Número positivo de ganglios linfáticos	1. 1-2	2. 3-6	3. 7-15	4. >16
TNM patológico	1. IIA	2. IIB	3. IIIA	4.IIIB 5.IIIC
Hallazgos histopatológicos asociados	0.No identificados		1.Metaplasia intestinal	
	2.Displasia de bajo grado		3.Displasia de alto grado	
	4. <i>H.pylori</i>		5.Gastritis crónica atrófica autoinmune	
	6.Pólipos			

Extensión tumoral

- 1.Invade lámina propia
- 2.Invade la muscular de la mucosa
- 3.Invade la submucosa
- 4.Invade la muscular propia
- 5.Penetra el tejido conectivo subseroso sin invasión del peritoneo visceral
- 6.Invade la serosa
- 7.Invade las estructuras adyacentes

Formato 2. Rotulación de las muestras

No. Caso: _____

Número de bloques (del caso): _____

	Muestra		Muestra		Muestra		Muestra
A		F		K		P	
B		G		L		Q	
C		H		M		R	
D		I		N		S	
E		J		O		T	

Formato 3. Características Histopatológicas

REPORTE CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

No. del Caso: _____

Edad: ____ años

DATOS DE LA ENCUESTA

I. PROCEDIMIENTO

- ____ Gastrectomía Total
- ____ Gastrectomía Subtotal Distal
- ____ Gastrectomía Subtotal Proximal
- ____ Gastrectomía, desconocida
- ____ Linfadenectomía D____

II. CLASIFICACIÓN TNM CLÍNICA: _____

III. DATOS MACROSCÓPICOS DEL TUMOR

Localización del Tumor:

- ____ Cardias
- ____ Fondo
 - ____ Pared anterior
 - ____ Pared posterior
- ____ Cuerpo
 - ____ Pared anterior
 - ____ Pared posterior
 - ____ Curvatura menor
 - ____ Curvatura mayor
- ____ Antro
- ____ Píloro
- ____ Sitios superpuestos
- ____ No especificado

Tamaño del tumor:

Dimensión mayor: ____ cm

IV. BLOQUES DE TEJIDO EN PARAFINA

Número de bloques (del caso): _____

Submuestras:

	Muestra		Muestra		Muestra		Muestra
A		F		K		P	
B		G		L		Q	
C		H		M		R	
D		I		N		S	
E		J		O		T	

V. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL TUMOR

Confirmación del Diagnóstico Histopatológico (Clasificación de Lauren):

____ Tipo Intestinal

____ Tipo Difuso (incluye carcinoma en anillo de sello, clasificado como > 50% de células de anillo de sello)

____ Mixto (cantidades aproximadamente iguales de tipo intestinal y difuso)

Grado histológico:

0. ____ Grado X No se puede determinar

1. ____ Grado 1 Bien diferenciado (más del 95% del tumor compuesto de glándulas)

2. ____ Grado 2 Moderadamente diferenciado (50% al 95% del tumor compuesto de glándulas)

3. ____ Grado 3 Pobremente diferenciado, indiferenciado (49% o menos del tumor compuesto de glándulas)

Los carcinomas de células de anillo de sello son de alto grado y se clasifican como grado 3.

Extensión tumoral:

1. ____ Tumor invade la lámina propia

2. ____ Tumor invade la muscular de la mucosa

3. ____ Tumor invade la submucosa

4. ____ Tumor invade la muscular propia

5. ____ Tumor penetra en el tejido conectivo subseroso sin invasión del peritoneo visceral o estructuras adyacentes

6. ____ Tumor invade la serosa (Peritoneo visceral)

7. ____ Tumor invade las estructuras adyacentes/órganos(especificar):

Nota: ^a Las estructuras adyacentes del estómago incluyen el bazo, colon transverso, hígado, diafragma, páncreas, pared abdominal, glándula suprarrenal, riñón, intestino delgado y retroperitoneo. La extensión intramural al duodeno o esófago no se considera invasión de estructura adyacente, pero se clasifica usando la profundidad de la mayor invasión en cualquiera de estos sitios.

Invasión linfovascular:

0. ____ No identificado

1. ____ Presente

Invasión perineural

0. ____ No identificado

1. ____ Presente

Nódulos linfáticos regionales

____ No se presentaron ni se encontraron ganglios linfáticos

Número de ganglios linfáticos afectados: ____

____ no pueden ser determinado (explicar): _____

Número de ganglios linfáticos examinados: ____

____ no pueden ser determinados (explicar): _____

1. 1 a 2 ganglios. ____

2. 3 a 6 ganglios ____

3. 7 a 15 ganglios ____

4. >16 ganglios ____

VI. CLASIFICACIÓN DE LA ETAPA PATOLÓGICA (PTNM, AJCC 8ªEDICIÓN).

Nota: La presentación de informes de las categorías pT, pN y cuando corresponda pM, se basa en la información disponible para el patólogo en el momento en que se emite el informe.

Tumor primario (pT)

- ___pTX: Tumor primario no puede ser evaluado
- ___pT0: No hay evidencia de tumor primario
- ___pTis: Carcinoma insitu: tumor intraepitelial sin invasión de la lámina propia, displasia de alto grado.
- ___pT1: Tumor invade la lámina propia, muscular de la mucosa o submucosa
- ___pT1a: Tumor invade la lámina propia o muscular de la mucosa
- ___pT1b: Tumor invade la submucosa
- ___pT2: Tumor invade la muscular propia^a
- ___pT3: Tumor penetra en el tejido conectivo subseroso sin invasión del peritoneo visceral o estructuras adyacentes^{aa}
- ___pT4: Tumor invade la serosa (peritoneo visceral) o estructuras adyacentes^{aaa}
- ___pT4a: Tumor invade la serosa (peritoneo visceral)
- ___pT4b: Tumor invade las estructuras adyacentes/órganos.

^a *Un tumor puede penetrar en la muscular propia con extensión en los ligamentos gastrocólico o gastrohepático, o en el epiplón mayor o menor, sin perforación del peritoneo visceral que recubre estas estructuras. En este caso, el tumor se clasifica como T3. Si hay una perforación del peritoneo visceral que cubre los ligamentos gástricos o epiplón, el tumor debe clasificarse como T4.*

^{aa} *Las estructuras adyacentes del estómago incluyen el bazo, colon transverso, hígado, diafragma, páncreas, pared abdominal, glándula suprarrenal, riñón, intestino delgado y retroperitoneo.*

^{aaa} *La extensión intramural al duodeno o esófago no se considera invasión de estructura adyacente, pero se clasifica usando la profundidad de la mayor invasión en cualquiera de estos sitios.*

Nódulos linfáticos regionales (pN)^a

- ___pNX: Los ganglios linfáticos regionales no pueden evaluarse
- ___pN0: No hay metástasis en ganglios linfáticos regionales
- 1. ___pN1: Metástasis en uno o dos ganglios linfáticos regionales
- 2. ___pN2: Metástasis en tres o seis ganglios linfáticos regionales
- 3. ___pN3: Metástasis en siete o más ganglios linfáticos regionales
- 4. ___pN3a: Metástasis en siete o 15 ganglios linfáticos regionales
- 5. ___pN3b: Metástasis en 16 o más ganglios linfáticos regionales

Nota: ^a Los depósitos tumorales metastásicos en la grasa subserosa adyacente al carcinoma gástrico, sin evidencia de ganglio linfático residual, se consideran metástasis a ganglio linfático regional, para fines de estadificación.

Metástasis a distancia (pM)

Sólo se requiere si se confirma patológicamente en el caso de estudio.

____pM1: Metástasis a distancia

Especifique sitio(s): _____

ETAPA PATOLÓGICA: pT____ pN____ pM____

ESTADÍO: 1. IIA____ 2. IIB____ 3.IIIA____ 4. IIIB____ 5.IIIC____

VII. RESULTADOS PATOLÓGICOS ADICIONALES:

- 0.____ No identificados
- 1.____ Metaplasia intestinal
- 2.____ Displasia de bajo grado
- 3.____ Displasia de alto grado
- 4.____ Helicobacter Pylori
- 5.____ Gastritis crónica atrófica autoinmune
- 6.____ Pólipo(s)

tipo(s):

VIII. MUESTRAS SELECCIONADOS PARA MICROARREGLOS:

Especificar el Número del caso + Letra de la submuestra seleccionada, para los núcleos del Centro Tumoral (CT) y Frente Invasivo (FI).

CT:

FI:

RECUERDE: *Demarcar con marcador de tinta permanente las áreas más representativas de la lesión neoplásica en las láminas de Hematoxilina y Eosina con mejor representación tumoral:*

- 5 núcleos de tejido: 2 núcleos del Centro tumoral y 3 núcleos del Frente invasivo.

Agrupaciones de Etapas para TNM patológico (pTNM)

Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIA	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIB	T1	N3a	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
Estadio IIIA	T2	N3a	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N1-2	M0
	T4b	N0	M0
Estadio IIIB	T1-2	N3b	M0
	T3	N3a	M0
	T4a	N3a	M0
	T4b	N1-2	M0
Estadio IIIC	T3	N3b	M0
	T4a	N3b	M0
	T4b	N3a o N3b	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Formato 4. Reporte de Pruebas complementarias

REPORTE DE PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

No. de caso: _____

I. EBV

Positivo:	Negativo:
------------------	------------------

II. CD3+ (Evaluar 4 campos representativos)

Centro Tumoral (CT)	Frente Invasivo (FI)
Promedio:	Promedio:

III. CD8+ (Evaluar 4 campos representativos)

Centro Tumoral (CT)	Frente Invasivo (FI)
Promedio:	Promedio:

IV. PD-1 (Evaluar 4 campos representativos)

Centro Tumoral	Frente Invasivo
Promedio:	Promedio:
Intensidad:	Intensidad:

V. INMUNOSCORE

Bajo (<25%)_____ Alto: (≥25%):_____

$$Inmunoscore = \frac{\%CD3 CT + \%CD3 FI}{2} + \frac{\%CD8 CT + \%CD8 FI}{2}$$

V. SCORE CPS

	< 1	> 1
CPS		

CPS:
