



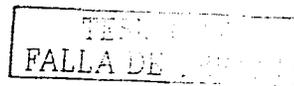
11201
18

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
ISSSTE
SUBDIRECCIÓN GENERAL MEDICA
CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"

EXPRESIÓN DE CITOCROMOS P450 EN EL PROCESO DE
CARCINOGENESIS GÁSTRICA.

TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE ESPECIALIDAD EN
ANATOMIA PATOLÓGICA



PRESENTA:
DR. LEONEL ESPINOSA COELLO.



MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE 2002

Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM en formato electrónico e impreso el
12 de septiembre de 2002.
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
UNAM

1

25/06/02



Universidad Nacional
Autónoma de México



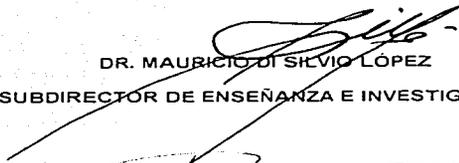
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**



DR. MAURICIO DI SILVIO LÓPEZ
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN



DRA. MA. TERESA GORRÁEZ DE LA MORA
ASESOR DE TESIS



DRA. MA. TERESA GORRÁEZ DE LA MORA
PROFESOR TITULAR



DR. LEONEL ESPINOSA COELLO
ALUMNO DE POSGRADO

7

REGION
BOGOTÁ

UNIVERSIDAD
COLOMBIANA

1991

TESIS CON
FALLA EN EL
EXAMEN

2



ISSSTE

**Instituto de Seguridad
y Servicios Sociales
para los Trabajadores
del Estado**

**CENTRO MEDICO NACIONAL
"20 DE NOVIEMBRE"**



México, D.F., 9 de enero del 2003

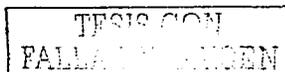
C. DR. SIEGFRIED A. FIGUEROA BARKOW
COORDINADOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION
PRESENTE.

Por medio de la presente le informo que el **DR. LEONEL ESPINOSA COELLO**, medico residente del servicio de Anatomia Patologica, participo en el proyecto de investigacion "**Expresión de citocromos P450 en el proceso de carcinogenesis gástrica**" proyecto con el cual obtuvo el titulo de maestria, la colaboracion del doctor y del servicio de anatomia patologica fue de suma importancia para la realizacion de este trabajo, por lo que le autorizo para que sea presentado como trabajo de fin de cursos con el enfoque anatomopatologico correspondiente con modificaciones minimas ya que los resultados no varian.

ATENTAMENTE

DRA. ALMA LAURA LADRON DE GUEVARA CETINA

MEDICO ADSCRITO AL SERVICIO
DE GASTROENTEROLOGIA.



3



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
APARTADO POSTAL 70220
CIUDAD UNIVERSITARIA
04510 MEXICO, D.F.

México, D.F., 9 de enero de 2003.

Dr. Sigfried Figueroa B.
Jefe de Enseñanza del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE.
Presente.

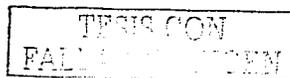
Por medio de la presente hago de su conocimiento que el **Dr. Leonel Espinosa Coello**, médico residente del servicio de Anatomía Patológica del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE, participo en el proyecto "**Expresión de cito cromos P450 en el proceso de carcinogénesis gástrica**" que se desarrollo en mi laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomedicas, en colaboracion con el hospital antes mencionado.

Una parte medular de nuestro proyecto fue la seleccion, analisis e identificación de las 295 muestras empleadas en el estudio, por lo que resultaba indispensable la participación de un patólogo, y es por esto que la colaboracion del Dr. Espinosa en este contexto fue de suma importancia para la realizacion de la investigación mencionada. Atentamente,



[Handwritten signature]

Dra. Julieta Rubio Lightbourn.
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental.
Instituto de Investigaciones Biomedicas.
U.N.A.M.



RESUMEN

OBJETIVOS El adenocarcinoma gástrico es la segunda neoplasia maligna más frecuente en el mundo. Se ha propuesto que el cáncer gástrico esta precedido por lesiones precursoras y se han sugerido al menos dos modelos epidemiológicos de carcinogénesis gástrica. Los citocromos P450 (CYPs) tienen uno de los papeles más importantes en la activación oxidativa y detoxificación de xenobióticos, así mismo se les ha implicado como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer, desde la mucosa gástrica normal pasando por los procesos inflamatorios (gastritis crónica activa y gastritis crónica inactiva, metaplasia intestinal, atrofia y adenocarcinoma gástrico). En este estudio se investigaron por inmunohistoquímica, la presencia y la localización celular en la mucosa gástrica de los CYPs que intervienen en el metabolismo de carcinógenos. Así mismo se correlacionaron factores que influyen en la expresión de estas enzimas: el género, la inflamación, la ingesta de medicamentos, la presencia de *Helicobacter pylori* y el tabaquismo.

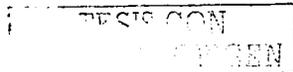
MÉTODOS Se realizó un estudio prospectivo, longitudinal y experimental con 295 casos de biopsias y piezas quirúrgicas con tejido gástrico de la zona antral, por dos patólogos con protocolo doble ciego para obtener concordancia inter-observacional utilizando los criterios de la clasificación de Sydney para gastritis y de la clasificación de Lauren para adenocarcinoma gástrico, se encontraron 51 casos de mucosa gástrica normal, 50 de gastritis crónica superficial inactiva, 50 de gastritis crónica folicular activa, 46 de gastritis atrófica, 50 de metaplasia intestinal tipo III y 48 de adenocarcinoma de tipo intestinal.



tipo intestinal. La inmunoreactividad a CYP se realizó utilizando anticuerpos policlonales que reconocen CYP1A2, CYP2B6, CYP2E1 y CYP3A de Chemicon International, Inc. Temecula, CA. Los anticuerpos fueron seleccionados por su especificidad a las enzimas estudiadas.

RESULTADOS La expresión de CYPs en la mucosa normal es un hallazgo importante en este trabajo. El CYP1A2 se encontró en el 76% y el CYP2E1 en el 73% mientras que el CYP2B6 en el 59% así como CYP3A4 en el 49%. Esta expresión disminuye con la inflamación. En la metaplasia intestinal tipo III se observó expresión del CYP2E1 en el 100% de las muestras analizadas. El género femenino es un factor importante para la expresión de CYP3A4, la inflamación aguda para CYP2E1, la presencia de *H. Pylori* para CYP1A2, CYP2B6 y CYP3A4, el ingesta de medicamentos inductores de CYP3A4 se asocia de forma positiva a la expresión de CYP3A4 y el tabaquismo podría asociarse a la expresión de CYP1A2.

CONCLUSIONES En nuestro estudio encontramos que existe una expresión de CYPs en la mucosa gástrica normal. En general, esta expresión se ve afectada por la inflamación que disminuye de forma significativa el porcentaje de las muestras investigadas con expresión positiva, particularmente para CYP2B6 y CYP2E1. La presencia de CYPs en la mucosa gástrica no es sorprendente, ya que estas enzimas tienen funciones muy importantes en el metabolismo de sustancias endógenas como las prostaglandinas y prostaciclina, que se han considerado como agentes de citoprotección gástrica.

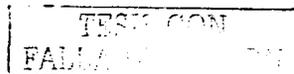


6

SUMMARY

AIMS The gastric adenocarcinoma is the second more frequent wicked neoplasia in the world. It has intended that the gastric cancer is preceded by lesions precursors and they have been suggested two epidemic models of gastric carcinogenesis at least. The cytochromes P450 (CYPs) they have one of the most important papers in the activation oxidativa and xenobióticos detoxification, likewise they have been implied as a factor of risk for the development of cancer, from the normal gastric mucosa going by the inflammatory processes (active chronic gastritis and inactive chronic gastritis), intestinal metaplasia, atrophies and gastric adenocarcinoma. In this study were investigated by inmunohistoquímica, the presence and the cellular localization in the gastric mucosa of the CYPs that intervene in the metabolism of carcinogen. Likewise factors were correlated that influence in the expression of these enzymes: the gender, the inflammation, the ingest of medications, the presence of *Helicobacter pylori* and the smoking.

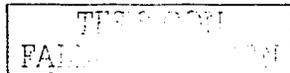
METHODS Were carried a prospective, longitudinal and experimental study with 295 cases of biopsies and surgical pieces with gastric fabric of the area antral, for two pathologists with blind double protocol to obtain Inter-observational agreement using the approaches of the classification of Sydney for gastritis and of the classification of Lauren for gastric adenocarcinoma. They were 51 cases of normal gastric mucosa, 50 of inactive superficial chronic gastritis, 50 of gastritis chronic active follicular, 46 of gastritis atrofica, 50 of metaplasia intestinal type III and 48 of adenocarcinoma of intestinal type.



The immunoreactive to CYP was carried using antibodies policlonales that CYP1A2 recognizes CYP2B6 CYP2E1 and CYP3A of Chemicon International, Inc Temecula CA The antibodies were selected by their specificity to the studied enzymes

RESULTS The expression of CYPs in the normal mucosa is an important discovery in this work. the CYP1A2 was in 76% and the CYP2E1 in 73% while the CYP2B6 in 59% as well as CYP3A4 in 49% this expression diminishes with the inflammation. In the metaplasia intestinal type III one observes an expression of CYP2E1 in 100% of the analyzed samples. with the feminine gender it is an important factor for the expression of CYP3A4 the sharp inflammation for CYP2E1 the presence of H pylori for CYP1A2 CYP2B6 and CYP3A4 the ingesta of medications abettors of CYP3A4 associates from a positive way to the expression of CYP3A4 and the smoking it could associate to the expression of CYP1A2

CONCLUSIONS In our study we find that an expression of CYPs exists in the normal gastric mucosa. In general this expression is affected particularly by the inflammation that diminishes in a significant way the percentage of the samples investigated with positive expression for CYP2B6 and CYP2E1. The presence of CYPs in the gastric mucosa is not surprising since these enzymes have very important functions in the metabolism of endogenous substances, as the prostaglandins and prostaciclins that have been considered as agents of gastric citoprotección



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1 EPIDEMIOLOGÍA	1
2 HISTOPATOLOGÍA	2
3 ETIOLOGÍA	4
4 FACTORES DE RIESGO DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO	6
5 METABOLISMO DE CARCINOGENOS POR ENZIMAS DE FASE I CITOCROMOS P450	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
HIPOTESIS	12
JUSTIFICACION	13
OBJETIVO PRINCIPAL	15
OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
METODOLOGIA	17
INMUNOHISTOQUIMICA	18
TÉCNICA	20
PARTICIPACION DEL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA	24
RESULTADOS	26
ANÁLISIS DE CYP1A2	27
ANÁLISIS DE CYP2B6	28
ANÁLISIS DE CYP2E1	28
ANÁLISIS DE CYP3A4	29



DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	33
GRAFICAS Y TABLAS.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	45

TESIS CON
FALLA DE CALIDAD

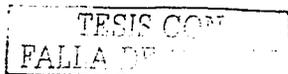
INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGIA

El adenocarcinoma gástrico es una de las neoplasias más frecuentes en el mundo, con un estimado de 75500 nuevos casos por año según datos de la Organización Mundial de la Salud^{1, 2, 3}. Sin embargo, aunque la frecuencia de este tipo de cáncer ha disminuido en casi todas las regiones sin conocerse las causas, constituye todavía un problema de salud pública particularmente en países como Japón donde continúa siendo el más frecuente, reportándose una incidencia de 77.9 por 100 000 habitantes y comprende el 25.51% de todos los cánceres^{1, 2, 3}. Países considerados de alto riesgo son China, Finlandia, Islandia, Polonia, Hungría, Portugal, Ecuador y Colombia, además Japón^{1, 3}.

América Latina es considerada un área de riesgo intermedio. Los únicos datos de incidencia anual existentes son los reportados por Costa Rica y Brasil de 45 por 100 000 habitantes en ambos países¹, aunque cabe hacer notar que no todos los países se registra la incidencia de tumores malignos, sino más bien se enumera la mortalidad por neoplasias.

Cuando se analiza la problemática de las neoplasias en México, se puede observar que ocupa el segundo lugar de causas de muerte natural, con una tasa reportada por la Secretaría de Salud en 1999 de 54.7 por 100 000 habitantes. Específicamente, el

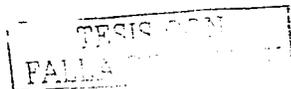


cáncer gástrico ha ocupado de forma alternativa durante muchos años el segundo y el tercer lugar de frecuencia en neoplasias con una tasa de mortalidad de 8.1 para la población entre 45 a 54 años acentuándose esta frecuencia en los segmentos de población mayor de 65 años con una tasa de 63.2 casos por 100.000 habitantes⁵. Las muertes reportadas por tumores malignos según entidad federativa de residencia habitual indican que el cáncer gástrico tiene una tasa de mortalidad más alta en Yucatán (8.56) Chiapas (8.08) Chihuahua (7.94) y Sonora (7.11) en comparación con otros estados como Querétaro (3.40) o el estado de México (3.00)^{5,6}.

2. HISTOPATOLOGIA

Se han propuesto varias clasificaciones histológicas para el cáncer gástrico y entre las más aceptadas se encuentran la Clasificación de Lauren y la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud. La Clasificación de Lauren considera dos prototipos de adenocarcinoma gástrico tomando en cuenta la morfología del tumor: el intestinal y el difuso. En la clasificación de la Organización Mundial de la Salud se describen cinco tipos: tubular mucinoso, papilar, indiferenciado y carcinoma de células en anillo de sello. Los primeros tres corresponden al de tipo intestinal y los dos últimos al adenocarcinoma de tipo difuso de la Clasificación de Lauren^{3,7}.

El grado de diferenciación de este tipo de tumores se establece a dos niveles: arquitectura y atipia celular. A nivel de la arquitectura un carcinoma bien diferenciado está constituido por glándulas bien formadas que pueden tener proyecciones



papilares presentes en los espacios glandulares dilatados. En el tipo moderadamente diferenciado las estructuras glandulares son irregulares, complejas o incompletas y las células tumorales pueden formar agregados que semejan bandas o masas. En los pobremente diferenciados las glándulas son poco definidas o, inclusive, puede no haberlas y presentarse como células aisladas³. Con referencia a la atipia celular, un carcinoma bien diferenciado está compuesto de células epiteliales propias funcionales y células calciformes secretoras de mucinas y en un carcinoma pobremente diferenciado las células son primitivas y no funcionales³. Estos dos niveles de diferenciación pueden o no coincidir del todo en un mismo tumor. En general el criterio que se utiliza para determinar el grado de diferenciación de un carcinoma es "la arquitectura glandular". Todos los adenocarcinomas bien diferenciados secretan moco que pueden tener una localización intracelular o intraglandular. El exceso de moco puede romper células y glándulas formando lagos de moco en el estroma característica que se puede observar a simple vista. Cuando el moco ocupa más del 50% del tumor se designa adenocarcinoma mucinoso o coloide.

Los tumores de patrón difuso no tiene formaciones glandulares y se caracterizan, como su nombre lo indica, por la infiltración de células individuales en anillo de sello, estos tumores no forman masas y la periferia del tumor es poco definida con sitios focales de infiltración profunda³. Se considera que este tipo de tumor es caracterizado por su comportamiento biológico agresivo.

TESIS CON
FALLA

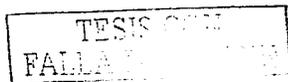
3 ETIOLOGÍA

Estudios epidemiológicos en poblaciones humanas indican que el adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal se encuentra precedido de alteraciones inflamatorias de la mucosa gástrica que se presentan en forma secuencial que son más severas y extensas conforme se incrementa el tiempo lo que ha planteado la hipótesis de que constituyen una secuencia que refleja cambios fenotípicos (esquema 1)^{1,9,13,11} El primer cambio que ocurre en la mucosa es la gastritis que por procesos de inflamación continua progresa hacia la cronicidad. Histológicamente la gastritis crónica asociada a la infección por *Helicobacter pylori* esta caracterizada por un infiltrado inflamatorio crónico, folículos linfoides y un grado variable de polimorfo nucleares que indican actividad^{12,11,14}. La presencia de infiltrado inflamatorio sugiere una respuesta inmunológica contra *H. Pylori* con activación de la inmunidad celular y producción de citocinas. Específicamente hay una producción incrementada por la mucosa de citocinas proinflamatorias: interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-8, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) e interferon gamma (IFN-gamma)^{15,16}. La inflamación no cambia el fenotipo epitelial gástrico sino que promueve una respuesta exagerada del proceso de regeneración de la mucosa^{12,13}. La atrofia del epitelio gástrico ha sido atribuida a productos de *H. Pylori* como las citotoxinas y el amoníaco. Por otra parte las proteasas y los metabolitos reactivos del oxígeno provenientes de los leucocitos polimorfonucleares y de otras células inflamatorias en el epitelio gástrico causan destrucción de epitelio. Se ha encontrado aumento del nivel de dialdehído malónico, que es producto de la lipoperoxidación de ácidos



grasos. La prevalencia y severidad de la atrofia aumenta con la edad, aunque no es un efecto de la edad, sino la duración de la infección por *H. Pylori*. La atrofia constituye un cambio crítico ya que puede permitir alteraciones del microambiente gástrico como aumento del pH y disminución de la producción de moco, que son factores de protección gástrica^{1,3}

La metaplasia intestinal es un hallazgo común en la gastritis de cualquier etiología y su prevalencia aumenta con la edad, proporcional a la duración de la gastritis. La metaplasia ha sido clasificada en completa e incompleta y diversos autores han propuesto clasificaciones de la misma basadas en el tipo de mucina secretada por las células caliciformes o por el grado de distorsión celular glandular^{1,2,3}. La metaplasia completa o tipo I se caracteriza por ser semejante al epitelio del intestino delgado, con células caliciformes que contienen sialomucinas, entremezcladas con células de absorción con borde en cepillo bien desarrollado. La metaplasia incompleta comprende los tipos II y III. La metaplasia tipo II tiene células caliciformes con sialomucinas entremezcladas con células gástricas epiteliales con mucinas neutras o sialomucinas. La metaplasia tipo III o tipo colónico se distingue por criptas tortuosas y ramificadas cubiertas de células columnares altas que contienen abundantes sulfomucinas y sialomucinas O-acetiladas^{1,3}.



4 FACTORES DE RIESGO DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Se ha demostrado que existen factores de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico de los más importantes es la infección por el bacilo Gram negativo *Helicobacter pylori* una de las más frecuentes en todo el mundo ha sido considerada como un primordial factor de riesgo para el cáncer gástrico^{3 19 20 21}, y aunque es difícil establecer directamente su manera de acción se podrían mencionar los siguientes probables mecanismos

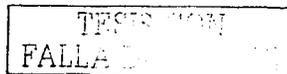
- Incremento en la tasa de proliferación celular de la mucosa gástrica demostrada con medición por incorporación de timidina marcada²²
- Alteración celular y del mecanismo de secreción de moco por acción de proteasas y lipasas bacterianas exponiendo a las células epiteliales a la acción de sustancias intraluminales^{23 17 23}
- Inhibición del efecto local de antioxidantes especialmente vitamina C Se ha reportado que en los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* la concentración de vitamina C es menor que la de sujetos sin infección²³ Es importante señalar que la vitamina C actúa también como bloqueador de las reacciones de nitrosación³
- Generación de radicales libres tanto de oxígeno como de nitrógeno por linfocitos, leucocitos polimorfonucleares y macrófagos presentes en el sitio de infección²⁴

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por otra parte, se han encontrado que los factores de exposición ambiental Como las nitrosaminas provenientes del consumo de alimentos ahumados, la ingestión alta de sodio, el bajo consumo de frutas y vegetales frescos y el tabaquismo, facilitan la progresión de lesiones inflamatorias gástricas hacia el cáncer^{3,4,10,25,27,28}. El tubo digestivo esta expuesto a muchos carcinógenos y se calcula que el 90% de los xenobióticos con los que el humano esta en contacto atraviesan el tubo digestivo²⁹. Aunque las células del epitelio gástrico no tienen una función de absorción, puede haber difusión pasiva de algunas sustancias debido a su estructura química, de manera particular las bases débiles, como son por ejemplo los compuestos nitrosos, las aminas y las hidroxilaminas que se encuentran entre los compuestos mutagénicos y/o cancerígenos derivados de los alimentos y medicamentos.

5 METABOLISMO DE CARCINOGENOS POR ENZIMAS DE FASE I : CITOCROMOS P450

La mayoría de los carcinógenos son metabolizados por sistemas enzimáticos presentes en células procariontes y eucariontes dando lugar a moléculas electrofílicas capaces de reaccionar con macromoléculas importantes como ácidos nucleicos y proteínas⁴⁰. Las reacciones metabólicas de mayor importancia son la oxidación, la reducción y la conjugación. Las dos primeras son catalizadas principalmente por una familia de proteínas conocidas como Citocromos P450 (CYPs), los cuales tienen un papel en la regulación celular ya que participan en el



metabolismo de compuestos fisiológicamente activos en la comunicación celular como por ejemplo los esteroides los eicosanoides y los ácidos grasos

En los animales vertebrados el hígado es el órgano que por excelencia expresa CYPs aunque formas específicas de CYP se expresan en diferentes tejidos extrahepáticos incluyendo el tejido cerebral el intestino delgado el riñón y el pulmón^{27, 28, 29, 30}. Para facilitar su nomenclatura se han clasificado en familias y subfamilias. Cada familia está formada por las enzimas cuya frecuencia génica es idéntica en un 40% y se identifica con un número arábigo mientras que en una subfamilia la identidad de la frecuencia es de 55% a 60% y se indica con una letra mayúscula las formas individuales se indican con un segundo número arábigo (por ejemplo CYP3A4 familia 3 subfamilia A forma individual 4). En los seres humanos se han encontrado las secuencias de 35 genes de CYP pero sólo se han identificado 29 enzimas de las cuales 16 participan en el metabolismo de xenobióticos y se ha encontrado que CYP1A1 CYP1A2 CYP2B6 CYP2E1 y CYP3A4 intervienen en la activación de carcinógenos^{31, 32}.

Los CYPs pueden tener una expresión constitutiva o inducible y su regulación es compleja por ejemplo la inducción de CYP1 requiere la activación del receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR) que se encuentra asociado a la proteína de choque térmico HSP90 y al translocador nuclear del receptor aromático (ARNT). La unión de ligando con AhR produce la translocación nuclear del del complejo formado por la liberación de HSP90 y la dimerización con ARNT. El heterodímero AhR-ARNT

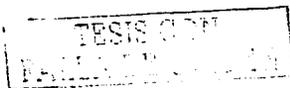


interactúa específicamente con el DNA en el elemento de respuesta a xenobióticos (XRE por sus siglas en inglés) y aumenta la transcripción de CYP1

La regulación de la familia CYP2 está mediada por receptores nucleares relacionados a la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas como el receptor constitutivo de androstano (CAR) para CYP2B y el receptor del ácido retinoico (RAR) para CYP2C. Este tipo de regulación también existe para CYP1 y CYP3³⁶

El CYP1A2 se ha identificado en pequeñas cantidades en tejido pulmonar, laringe, mucosa de intestino delgado, riñón, vejiga urinaria, próstata, placenta y linfocitos de humanos, aunque se ha considerado que su expresión más importante ocurre en el hígado. Las sustancias que metaboliza CYP1A2 incluyen medicamentos, aminas aromáticas, aminas heterocíclicas, nitrosaminas, micotoxinas, compuestos nitroaromáticos y estrógenos^{37,41}

El CYP2B6 pertenece a una subfamilia de los CYPs que se asocia a la respuesta inductora de fenobarbital, medicamento que causa una respuesta inductora a varias subfamilias de CYPs: CYP2B, CYP2A y CYP3A. En humanos se ha encontrado⁴² que existe de modo constitutivo una cantidad variable e inducible en el hígado, intestino delgado, pulmón, glándulas suprarrenales, riñón y cerebro. Esta enzima participa en el metabolismo de varios compuestos congéneres del fenobarbital (hidantoína, primidona, succinimidas), dexametasona, pesticidas, halogenados,



productos provenientes de plantas (diálilsulfato, cannabinoides, indoles) y carcinógenos⁴²

El CYP2E1 se expresa constitutivamente en el hígado y otros tejidos, lo cual implica funciones endógenas importantes. Esta enzima es la única forma de CYP que se induce por etanol. CYP2E1 metaboliza compuestos pequeños e hidrofóbicos que incluyen varios carcinógenos⁴³. Además, CYP2E1 tiene la capacidad de reducir oxígeno molecular a radicales reactivos del oxígeno que pueden iniciar peroxidación de membranas con producción de aldehídos que a su vez activan la producción de citocinas por linfocitos. La distribución celular de CYP2E1 es variada: se encuentra tanto en el retículo endoplasmático como en la membrana celular y en las vesículas lisosomales. Su expresión ocurre en la región perivenular del hígado, la corteza renal, la mucosa nasal, el pulmón, los testículos, los ovarios, el intestino delgado, el colon y los linfocitos⁴⁴.

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. ¿La expresión de CYPs ocurre de manera similar para las lesiones de la mucosa gástrica como gastritis crónica activa gastritis crónica inactiva, gastritis atrófica metaplasia intestinal tipo III, adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal y mucosa normal?
2. ¿El género la inflamación la ingesta de medicamentos, la presencia de *Helicobacter pylori* y el tabaquismo influyen en la expresión de estas enzimas?

TESIS CON
FALLA EN LA ORIGEN

HIPÓTESIS

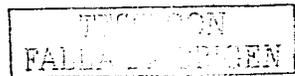
Hipótesis de investigación:

La expresión de CYPs en el epitelio gástrico es diferente en las distintas lesiones epiteliales de la mucosa gástrica (gastritis crónica activa, gastritis crónica inactiva, gastritis atrófica, metaplasia intestinal y adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal) de la expresión de la mucosa gástrica normal

H₁ mucosa normal ≠ gastritis crónica activa ≠ gastritis crónica inactiva ≠ gastritis atrófica ≠ metaplasia intestinal ≠ adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal.

Hipótesis nula: la expresión de CYPs es igual en las lesiones de la mucosa gástrica que la expresión de CYPs en la mucosa gástrica normal

H₀ mucosa normal = gastritis crónica activa = gastritis crónica inactiva = gastritis atrófica = metaplasia intestinal = adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal.



JUSTIFICACIÓN

La carcinogénesis gástrica es un proceso multifactorial y complejo¹⁰. En el adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal la evolución muestra un patrón consistente con un modelo de progresión dependiente del tiempo desde la atrofia epitelial gástrica a la metaplasia así como de la metaplasia a la displasia y de esta al adenocarcinoma^{11,12}. Esta progresión probablemente refleja la presencia de factores de modulación de un proceso precanceroso que puede ser regresivo en alguna etapa. Como en toda enfermedad progresiva se ha tratado de establecer un marcador temprano del proceso de carcinogénesis para poder vigilar y prevenir el desarrollo de neoplasia. Hasta el momento no se ha podido encontrar un marcador temprano en el cáncer gástrico ya que los marcadores biológicos disponibles por el momento solo demuestran las alteraciones genéticas cuando ya el cáncer está establecido por ejemplo mutaciones a nivel del gen p53 pérdida de la heterogeneidad de los genes APC o DCC o la sobreexpresión de genes específicos tales como c-erb-2 o c-met^{13,14}.

Una característica importante en el desarrollo del cáncer gástrico es la presencia de carcinógenos potenciales en la luz gástrica. Las enzimas más involucradas con el metabolismo de estos compuestos son los CYPs que están relacionados con los mecanismos de oxidación y reducción de sustancias carcinógenas^{15,16}. La presencia



de estas enzimas en los tejidos alterados comparados con los tejidos normales puede ser un marcador de susceptibilidad a toxinas y carcinogénicos, especialmente en tejido gastrointestinal. Por lo tanto conocer su expresión en etapas tempranas del proceso canceroso puede ser un factor que ayude a interpretar la progresión del mismo.

TESIS CON
FALLA EN LA CALIFICACIÓN

OBJETIVO PRINCIPAL

Identificar la presencia de CYP en la mucosa gástrica normal y en las diferentes etapas del proceso de carcinogénesis del adenocarcinoma de tipo intestinal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar y localizar la presencia de las siguientes formas individuales de CYP

- CYP1A2
- CYP2B6
- CYPE1
- CYP3A4

En la mucosa gástrica normal y en los tejidos con las siguientes lesiones:

- Gastritis crónica inactiva
- Gastritis crónica activa
- Gastritis atrófica
- Metaplasia intestinal
- Adenocarcinoma gástrico tipo intestinal



- Analizar la correlación de la presencia de formas individuales de CYP (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4) a la presencia de *Helicobacter pylori*
- Analizar la correlación de la presencia de formas individuales de CYP (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4) con la ingesta de medicamentos inductores, inhibidores o sustratos de los CYP investigados
- Analizar la correlación de la presencia de formas individuales de CYP (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4) al género de los individuos
- Analizar la correlación de la presencia de formas individuales de CYP (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4) con el tabaquismo
- Realizar un análisis de regresión logística por cada CYP para evaluar el efecto de las variables independientes sobre la expresión de CYP

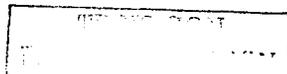


METODOLOGIA

Se eligieron 336 muestras de tejidos obtenidos por biopsia endoscópica o cirugía fijados en formalina e incluidos en parafina teñidas con Hematoxilina y Eosina y Giemsa revisados con microscopia de luz por dos patólogos con protocolo doble ciego para obtener concordancia inter-observacional de estas fueron eliminados 41 muestras las cuales los diagnosticos no eran concordantes así como tejidos insuficientes o contaminados con tejidos no gastricos se excluyeron de participar en el estudio. Los diagnosticos emitidos por el servicio de Patología del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE fueron los siguientes

▪ Mucosa gástrica normal	51 muestras
▪ Gastritis crónica superficial inactiva	50 muestras
▪ Gastritis crónica folicular activa	50 muestras
▪ Gastritis atrófica	46 muestras
▪ Metaplasia intestinal incompleta Tipo III	50 muestras
▪ Adenocarcinoma tipo intestinal	48 muestras

Estos diagnósticos se establecieron en base a criterios especificados en la Clasificación de Sydney para gastritis^{12,13,14} y en la Clasificación de Lauren para adenocarcinoma gástrico^{7,8}.



Además se recopilaron los datos demográficos (edad, género), historia de tabaquismo y uso de medicamentos de los pacientes de cada muestra incluida para realizar un análisis de factores que influyen en la expresión de CYPs

6. INMUNOHISTOQUÍMICA

Se eligió la técnica de Inmunohistoquímica para la visualización de los antígenos celulares (CYPs en este caso) por el método de Estreptavidina – Peroxidasa por su alta sensibilidad. La técnica de tres pasos Peroxidasa Anti: Peroxidasa (PAP) consiste en la aplicación de un anticuerpo primario dirigido a la sustancia de investigación, un anticuerpo de enlace y la formación de un complejo PAP. La tinción se completa con la incubación de un sustrato cromógeno (diaminobenzidina) soluble en alcohol y la contratinción con hematoxilina.

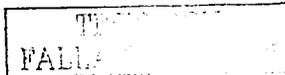
Para aumentar la sensibilidad se desarrolló un método que aprovecha la afinidad de la avidina por la biotina incrementando la sensibilidad de la detección hasta 20 veces más que los métodos tradicionales PAP^{42, 52}. Para evitar falsos positivos se utilizaron pasos de bloqueo de sitios inespecíficos⁵³⁻⁵⁵ como se detallará más adelante. Se emplearon controles negativos y positivos en cada laminilla para cuidar la validez de la técnica: el control positivo como prueba de sensibilidad (hígado de rata Sprague Dawley macho de 8 semanas de edad) y el control negativo como especificidad (PBS en lugar de anticuerpo primario en una muestra de tejido). La realización de inmunohistoquímica se realizó en el laboratorio de la Dra. Julieta Rubio Lightbourn.



en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM

La inmunorreactividad a CYP se realizó utilizando anticuerpos policlonales que reconocen CYP1A2 CYP2B6 CYP2E1 y CYP3A4 de Chemicon Internacional, Inc Temecula CA usando la técnica de extravidina-peroxidasa. Estos anticuerpos están recomendados para uso en Western blot e Inmunohistoquímica en tejidos congelados o tratados con formaldehído. Los anticuerpos fueron seleccionados por su especificidad a las enzimas estudiadas.

- Rabbit anti-human cytochrome P450 Enzyme CYP1A2 polyclonal antibody reacciona solamente con la fracción microsomal de CYP1A2 y no tiene reactividad cruzada con otros CYPs. Por Western Biot este anticuerpo reconoce únicamente una proteína de peso molecular de 54KDa.
- Rabbit anti-human cytochrome P450 Enzyme CYP 2B6 and rat CYP2B1/2 polyclonal antibody reacciona con CYP2B6 de la fracción microsomal humana y CYP2B1/2 en la fracción microsomal hepática de rata.
- Rabbit anti-human cytochrome P450 Enzyme CYP 2E1 polyclonal antibody reacciona con CYP2E1 de microsomas humanos y de rata. no tiene reactividad cruzada con otras enzimas de CYPs en estas especies.
- Rabbit anti-human cytochrome P450 Enzyme CYP3A4 polyclonal antibody reacciona con la fracción microsomal hepática. este anticuerpo puede mostrar



reactividad con CYP3A7 (fetal) debido a la homología de secuencia. No tiene reactividad cruzada a otros CYPs.

7. TÉCNICA:

De los bloques de parafina se cortaron muestras de 5 micras de espesor y se montaron en laminillas para inmunohistoquímica cubiertas con solución de poli-L-lisina al 0.01% (poly-L-lysine solution 0.1% in water Sigma Diagnostics INC).

Las laminillas recubiertas de poli-L-lisina con la muestra de biopsia se desparafinaron y se rehidrataron con un baño de amortiguador de fosfatos (PBS) 1X: 0.01 M pH 7.4 por 30 minutos a temperatura ambiente

Se hizo el procedimiento de recuperación antigénica^{20, 21} con amortiguador de citratos 1X: 10 mM. pH 5.4 en horno de microondas a 750 MHz por dos periodos de 5 minutos con un intervalo de descanso de 1 minuto entre las dos fases de calentamiento

Las muestras se colocaron en cámara húmeda y se procedió a neutralizar la peroxidasa endógena al añadirles la solución bloqueadora con biotina

- Solución para bloqueo de peroxidasa endógena



0.3% H₂O₂ + 10 µg/ml d-biotina Sigma (en agua)

Para 1 ml >100 µl de solución de biotina (1 mg/10ml)

100 µl de peróxido al 30%

100 µl de PBS 10X

700 µl de agua

Se cubrieron todos los cortes dejando incubar 15 minutos a temperatura ambiente. se enjuagó con PBS1X y se dejó en baño de PBS1X por 5 minutos.

Se realizó un procedimiento de bloqueo para sitios inespecíficos con leche descremada al 5% en amortiguador PBS1X dejando incubar 15 minutos a temperatura ambiente se enjuagó con PBS1X y se dejó en baño de PBS1X por 5 minutos

Se removió el exceso de líquido y se aplicó la solución de anticuerpo primario en PBS 1X a las siguientes diluciones

CYP 1A 2 1 500 CYP 2E 1 1 800

CYP 2B 6 1 800 CYP 3A 4 1 800

con testigo positivo (hígado de rata Sprague Dawley macho de 8 semanas de edad) y control negativo (PBS en lugar de anticuerpo primario en una muestra de tejido) en cada laminilla dejando incubar por 60 minutos a temperatura ambiente. se lavó con PBS1X y se colocó en baño de PBS1X por 5 minutos



Se sacudió el exceso de líquido y se aplicaron 100 µl del anticuerpo secundario biotilnado (DAKO LSAB+ kit Peroxidase Universal. DAKO CORPORATION. Carpintería CA LINK anticuerpo biotilnado anti-conejo. anti-conejo y anti-cabra. Inmunoglobulinas en PBS conteniendo proteína transportadora y solución 15 mM de azida de sodio) al corte y a los controles dejando incubar en cámara húmeda por 15 minutos a temperatura ambiente. Se enjuagó con PBS1X y se dejó en baño de PBS1X por 5 minutos.

La reacción de extravidina-peroxidasa se realizó aplicando 100 µl de la solución de extravidina-peroxidasa (DAKO LSAB+ kit Peroxidase Universal. Streptavidin Peroxidase estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano en PBS conteniendo proteína transportadora y agentes antimicrobianos) dejando incubar en cámara húmeda por 15 minutos a temperatura ambiente. se enjuagó y colocó en PBS1X por 5 minutos.

Para revelar se aplicó la solución de Diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+ Large volume substrate-chromogen solution. DAKO CORPORATION. Carpintería. CA) dejando actuar un máximo de 10 minutos. se detuvo la reacción al lavar con agua bidestilada. Se aplicó hematoxilina de Mayer (Hematoxylin. Mayer's DAKO CORPORATION. Carpintería CA) para la contraindicación. se enjuagaron las laminillas en agua tibia y posteriormente en agua a temperatura ambiente. Se montaron las laminillas con medio de inclusión rápida para microscopia. Entellan (Merck KGaA, Germany) y se colocó el cubreobjetos.



Las muestras se examinaron al microscopio de luz a 40X para establecer la presencia y/o ausencia de inmunotinción y su distribución. Como evaluación cualitativa se considero positiva la tinción cuando se observó la inmunotinción en por lo menos 5% de las células comparándose con el control positivo

TEST
FALLA

PARTICIPACIÓN DEL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

En los archivos del servicio de Anatomía Patológica del Centro Médico Nacional 20 de noviembre ISSSTE se realizó la búsqueda de biopsias y piezas quirúrgicas de estómago de los años 1998 1999 2000 y 2001 obteniendo un total de 336 muestras de las cuales fueron útiles 295 (Tabla 2) utilizando los criterios de exclusión antes mencionados

Se localizaron las laminillas correspondientes a cada caso, las cuales se encontraban teñidas con tinción de rutina (Hematoxilina y Eosina) y además, las biopsias gástricas con tinción de Giemsa para la identificación de *Helicobacter pylori*.

Con microscopía de luz se hizo el análisis morfológico de cada una de las lesiones para llevar a cabo la concordancia intertasador con el diagnóstico previamente emitido por el patólogo responsable del caso utilizando los criterios de la clasificación de Sydney para gastritis y la clasificación de Lauren para adenocarcinoma gástrico

Se localizaron los bloques (tejido incluido en parafina) correspondientes a cada caso, de los cuales se realizaron cortes de 5 micras montandolos en nuevas laminillas (5) con la técnica descrita con anterioridad



Con microscopía de luz con el objetivo 40X (seco fuerte) se hizo el análisis de los resultados de la inmunohistoquímica tomando en cuenta un control positivo (Hígado de rata) y un control negativo con amortiguador de fosfato de el tejido en revisión. La evaluación cualitativa se considero positiva cuando se observo la inmunotinción en por lo menos 5% de las células comparándolas con el control positivo

Por ultimo se llevo a cabo la toma de micro fotografías de cada uno de los casos las cuales serviran para la presentación de este trabajo



RESULTADOS

Se seleccionaron 336 muestras totales del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE. Se hizo una revisión con un patólogo revisor de los diagnósticos histopatológicos emitidos inicialmente y se seleccionaron 295 muestras con diagnóstico concordante, basados en la Clasificación de Sydney para gastritis y la Clasificación de Lauren para adenocarcinoma gástrico. La evaluación de la concordancia intertasador global se evaluó con el estadístico kappa cuyo resultado fue de 0.88. El estadístico kappa obtenido cada grupo de diagnóstico fue el siguiente:

- Muestras normales 0.98 (50/51)
- Gastritis crónica activa 0.90 (50/55)
- Gastritis crónica inactiva 0.82 (50/61)
- Metaplasia intestinal 1.00 (50/50)
- Gastritis atrófica 0.70 (46/65)
- Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal 0.89 (48/54)

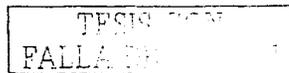


Es importante explicar que el diagnóstico en que se tuvo mayor diferencia diagnóstica fue la atrofia gástrica y esto es debido a varios factores como la orientación del corte, el edema de la membrana basal y el infiltrado inflamatorio que en ocasiones puede confundir el diagnóstico. En el caso del adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal se rechazaron 5 muestras en que la lesión estaba localizada en el cardias y 1 muestra en que la lesión se encontró en la unión de la

anastomosis esófago-gástrica en un paciente al que se le realizó una gastrectomía subtotal con ascenso gástrico por adenocarcinoma del cardias

El promedio de edad la distribución por género porcentaje de tabaquismo y muestras positivas a *H. pylori* mostraron diferentes valores por diagnóstico. No se encontró una diferencia significativa entre la distribución por género de los diferentes grupos ($p > 0.20$) estos datos se muestran en la tabla 1. Para el tabaquismo si se encontró diferencia significativa entre los grupos ($p = 0.001$). Para el grupo de gastritis crónica activa la diferencia es menor a la esperada ($p = 0.05$) mientras que para la gastritis atrófica y el adenocarcinoma gástrico es mayor ($p = 0.02$ y $p = 0.000$ respectivamente).

- Análisis para CYP1A2



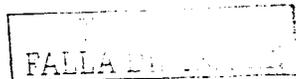
En la mucosa gástrica normal las células en que se encontró inmunotinción positiva fueron las células principales en la porción glandular de la mucosa gástrica. En la gastritis crónica activa e inactiva con o sin atrofia se observó tinción positiva en células principales miofibroblastos de la lámina propia células endoteliales y algunos leucocitos. En la metaplasia intestinal se tiñe todo el tejido metaplásico a excepción de las células caliciformes mientras que en los casos de adenocarcinoma gástrico con inmunotinción positiva esta se observa en las células neoplásicas (imagen 1). El porcentaje de muestras que expresan CYP1A2 en los diferentes diagnósticos se muestra en la gráfica 1 y en la tabla 3. Como se puede observar hay

un porcentaje más alto de muestras con expresión en la mucosa gástrica normal que en la mucosa gástrica de otras lesiones a excepción de la gastritis crónica activa

- Análisis de CYP2B6

Al igual que para CYP1A2 en la mucosa normal las células que tienen inmunotinción positiva son células principales de la porción glandular de la mucosa gástrica. Así mismo en las gastritis crónicas con o sin atrofia se presentó inmunotinción tanto en células principales como en algunos leucocitos, mas no en los miofibroblastos. En la metaplasia intestinal también hubo tinción positiva aunque de menor intensidad que en las células no metaplásicas, sin haber inmunotinción en las células calciformes (imagen 2). En las muestras de adenocarcinoma gástrico en que hay tinción positiva esta se encuentra en las células cancerosas. El porcentaje de expresión de CYP2B6 por diagnóstico se muestra en la gráfica 2 y con sus IC95% en la tabla 4.

- Análisis de CYP2E1



En las muestras analizadas, las células principales de la porción glandular de la mucosa gástrica normal son las únicas células que expresaron inmunotinción positiva. En las gastritis crónicas con o sin atrofia la tinción también se presenta en las células principales, miofibroblastos de la lámina propia y leucocitos del infiltrado inflamatorio. En la metaplasia intestinal hay tinción positiva en las células

metaplásicas a excepción de las células caliciformes y en el adenocarcinoma hay tinción en las células neoplásicas (imagen 3) El porcentaje de distribución de CYP2E1 por diagnóstico y los intervalos de confianza 95% se muestran en la gráfica 3 y en la tabla 5

- Analisis de CYP3A4

En los casos con inmunotinción positiva de la mucosa normal, las células que presentaron inmunotinción positiva son las células principales de la porción glandular de la mucosa gástrica. En las gastritis crónicas hay tinción positiva en las células principales, los microbiohistos y leucocitos del infiltrado inflamatorio. A excepción de las células caliciformes, en la metaplasia intestinal con inmunotinción positiva hay tinción en todas las células metaplásicas (imagen 4). En el adenocarcinoma gástrico hay tinción en las células neoplásicas. El porcentaje de inmunotinción positiva a CYP3A4 por diagnóstico se muestra en la gráfica 4 y en la tabla 6.

Como un resumen se puede mencionar que los factores asociados a la expresión inmunohistoquímica que muestran resultados significativos varían entre los diferentes CYPs: por ejemplo el género femenino es un factor importante para la expresión de CYP3A4, la inflamación aguda para CYP2E1, la presencia de *H. pylori* para CYP1A2, CYP2B6 y CYP3A4, la ingesta de medicamentos inductores de CYP3A4 se asocia de forma positiva a la expresión de CYP3A4 y el tabaquismo podría asociarse a la expresión de CYP1A2.



DISCUSIÓN

Un hallazgo importante de esta tesis es la detección de la expresión de CYPs en la mucosa gástrica normal. Los CYPs que se encontraron en mayor porcentaje de las muestras de mucosa gástrica normal analizadas fueron CYP1A2 (76%) y CYP2E1 (73%) mientras que CYP2B6 se expresó en una menor proporción (59%) así como CYP3A4 (49%). Existen muy pocos estudios previos donde se intentó buscar la presencia de CYPs en mucosa gástrica humana sin conseguirlo. En el trabajo realizado por De Waziers y colaboradores³⁴ en 1989 se analizaron sólo dos muestras de tejido gástrico humano de las que se obtuvieron microsomas de homogenizado de tejido fresco y se realizó análisis por inmunoblot para CYP3A4, CYP2E1, CYP2D6 y CYP2C8-10 y únicamente se encontró CYP3A4 en una cantidad muy escasa (4.3% del contenido hepático). McKinnon y colaboradores reportan en 1995 que también por técnica de inmunoblot no se logró detectar presencia de CYP3A4/CYP3A5 de microsomas de estómago o de colon aunque no se define el número de muestras analizadas para el estómago para el colon fueron 10 muestras de tejido con diagnóstico histopatológico de mucosa normal obtenido de donadores cadavéricos a los 30 minutos de declaración de muerte.³⁵

Un concepto que es importante en los procesos de biotransformación es que el metabolismo de xenoproticos para bioactivar compuestos que tienen efectos tóxicos en las células no son llevados a cabo por un sólo tipo de enzima, es decir que no hay metabolismo sustrato-exclusivo. Como ya se sabe, CYP1A2 participa en el

TR
FALLA DE CALIBRE

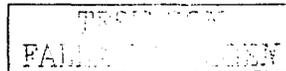
metabolismo de carcinógenos provenientes del tabaco como el 2-amino-9-H-piridol (2,3-b) indol (A₁C) ó el 2-amino-1-metil-6- fenilimidazol (4,5b) piridina (PHIP)⁴¹ y se ha demostrado que uno de los factores de riesgo para el cáncer gástrico es el tabaquismo^{42,43} Otros CYPs que participan en el metabolismo de aproximadamente 50 compuestos considerados carcinógenos derivados del tabaco como aminas aromáticas benceno o formaldehido son CYP2E1 y CYP2B. El efecto del tabaco en la expresión de CYPs ha sido estudiado exhaustivamente. En una investigación realizada por Villiard y colaboradores se encontró que el efecto del humo de tabaco en la expresión de CYP1A1, CYP2E1, CYP2B1/2 y CYP3A en ratas depende de la duración de la exposición, el contenido de proteína hepática total de CYPs disminuye significativamente tanto con la exposición inmediata (2 días) como por la sostenida (30 días) sin embargo el contenido de CYP1A y CYP3A aumenta por la exposición inmediata y tiende a disminuir a largo plazo. En contraste CYP2B1/2 muestra una disminución tanto por la exposición aguda como por la crónica. CYP2E1 tiende a disminuir ligeramente al inicio no de forma significativa, aumenta a la semana y regresa a sus valores iniciales. Al analizar el contenido de RNA mensajero de CYP2E1 no se encontró una correlación con los cambios lo que se interpretó como que la proteína muestra estabilización y/o que existe una regulación postraduccional de la expresión hepática de CYP2E1. En otras investigaciones se ha intentado relacionar CYP2E1 con adenocarcinoma gástrico, sin embargo en el trabajo de Nobuko-Nishimoto y colaboradores se reporta una ausencia de correlación entre los polimorfismos conocidos de CYP2E1 en personas con cáncer gástrico al tratar de investigar una relación entre genotipo-fenotipo de esta enzima en la población.

TRABAJOS
FALLA DE CUBIEN

brazileña-japonesa. En nuestros estudios, los resultados que obtuvimos no muestran relación entre la expresión de CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4 y el tabaquismo.

La expresión de CYPs es afectada por la inflamación, particularmente se observa que esta disminución es significativa en la inmunopositividad de CYP2B6 y CYP2E1 en la gastritis crónica activa. Estos cambios pueden estar modulados por la reacción inflamatoria de la mucosa gástrica a la presencia de *H. pylori*.

La metaplasia intestinal de tipo III es una lesión que se ha considerado como una adaptación al daño persistente de la mucosa gástrica, pero simultáneamente se reconoce también como un factor de predisposición al adenocarcinoma^{9,13}, aunque no se sabe con certeza cuáles son los elementos que contribuyen a este cambio de la mucosa gástrica. Se ha postulado que este es mediado por acción de factores de crecimiento, entre estos se ha encontrado que los factores Trefoil [específicamente el factor Trefoil del intestino (ITF)] pueden tener un papel en este cambio. Se ha encontrado que los factores Trefoil exhiben una expresión proteica tejido-específica en el tubo digestivo, así mismo, en otra investigación dirigida por Taupin se descubrió que los diferentes genes de los factores Trefoil tienen patrones tejido-específicos de metilación. La demetilación de los promotores y la expresión proteica de ITF están restringidas a las células caliciformes de la mucosa colónica (normales y neoplásicas), pero se presenta además en la metaplasia intestinal de la mucosa gástrica.



Un dato que llama la atención es la expresión de CYP2E1 en el 100% de las muestras de metaplasia intestinal analizadas. Como en la metaplasia intestinal hay una expresión aberrante de los factores de regulación fenotípica como HNF-1, el cual se ha demostrado que está relacionado con la regulación de la expresión de CYP2E1, sería factible que dicho factor estuviera involucrado en esta inducción, por lo que considero que es muy importante, en estudios futuros, poder comprobar estos mecanismos.

Contrario a lo que se esperaba al inicio del estudio, CYP3A4, que se expresa normalmente en la mucosa intestinal, mostró ser el CYP que se expresó en el menor porcentaje de las muestras de mucosa gástrica analizadas, esto llama la atención particularmente en la metaplasia intestinal. Las fluctuaciones de expresión no fueron significativamente diferentes entre las distintas lesiones, pero sí hubo una asociación de la expresión con el género femenino, con la presencia de *H. pylori* y con la ingesta de inductores.

El conocer los efectos de las citocinas y los factores de crecimiento celular en las enzimas de metabolismo de fase I es importante para entender que los cambios que experimentan los CYPs pueden tener efecto en la evolución y el tratamiento de las enfermedades, particularmente durante los procesos inflamatorios. Así mismo, el conocimiento de los mecanismos que pueden modular el metabolismo de un medicamento es importante para lograr un efecto terapéutico.



CONCLUSIONES

En nuestro estudio encontramos que existe una expresión de CYPs en la mucosa gástrica normal. En general esta expresión se ve afectada por la inflamación, que disminuye de forma significativa el porcentaje de las muestras investigadas con expresión positiva particularmente para CYP2B6 y CYP2E1.

Para CYP3A4 existen factores que se correlacionan a la expresión de forma significativa: el género y la ingesta de medicamentos inductores de CYP3A4. Es importante mencionar que en el 100% de las muestras analizadas de metaplasia intestinal encontramos expresión de CYP2E1.

Por otra parte los porcentajes de expresión de los especímenes de adenocarcinoma gástrico analizados son muy semejantes a los que se reportan por Murria y colaboradores a excepción de CYP2E1 pues este autor reporta no haber encontrado ninguna muestra con expresión mientras que nosotros sí encontramos expresión en esta enzima.

La presencia de CYPs en la mucosa gástrica no es sorprendente, ya que estas enzimas tienen funciones muy importantes en el metabolismo de sustancias endógenas como las prostaglandinas y prostaciclina, que se han considerado como agentes de citoprotección gástrica.

TRUJILLO
FALLA DE ENTRENAMIENTO

GRAFICAS Y TABLAS

Esquema. 1 Hipótesis del desarrollo de cáncer gástrico¹⁰

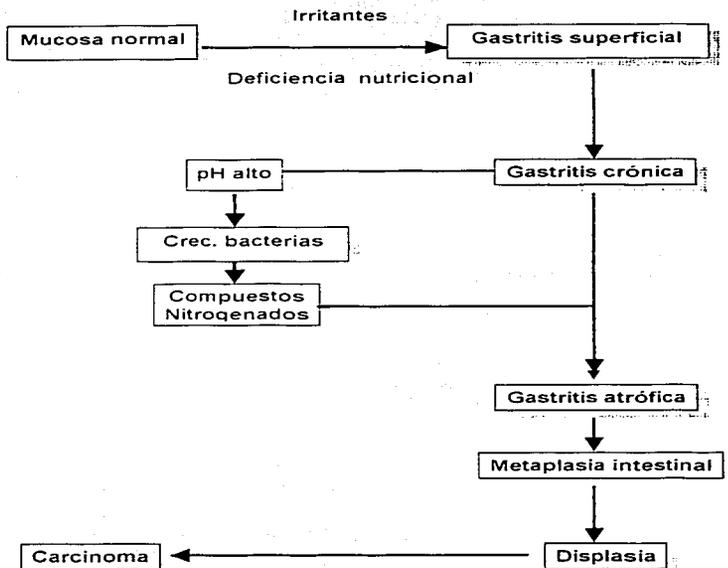


Tabla. 1 Características de los grupos

	Mucosa Gastrica Normal	Gastritis cronica activa	Gastritis cronica inactiva	Atrofia	Metaplasia intestinal	Cancer	p
Genero femenino	70.5% (36/51)	66% (33/50)	64% (32/50)	54% (25/46)	56% (28/50)	48% (23/48)	NS
Genero masculino	29.5% (15/51)	34% (17/50)	36% (18/50)	46% (21/46)	44% (22/50)	52% (25/48)	NS
Edad promedio (años)	40.6 (0.25 a 78)	49.3 (18 a 84)	51 (4 a 89)	60.5 (31 a 86)	64 (43 a 83)	55.6 (31 a 83)	NS
<i>helicobacter pylori</i>	0	78% (39/50)	48% (24/50)	21.7% (10/46)	34% (17/50)	ND	0.000
Tabaquismo	19.6% (10/51)	6% (3/50)	22% (11/50)	32.6% (15/46)	22% (11/50)	41.6% (20/48)	0.001

NS no significativo ND no disponible

Tabla. 2 Total de quirúrgicos revisados por año

	Normal	G.C.I.*	G.C.A.*	G.C. Atrofica	M.I.*	Adenocarcinoma
1998 - 9.090	0	0	0	0	0	8
1999 - 8.250	26	20	25	22	29	18
2000 - 9.858	14	18	18	14	17	10
2001 - 9.668	11	12	07	10	04	14
	51	50	50	46	50	48 = 295

G.C.I.* Gastritis Crónica Inactiva. G.C.A.* Gastritis Crónica Activa. M.I.* Metaplasia Intestinal tipo III



Gráfica. 1 Expresión inmunohistoquímica de CYP1A2 por lesión

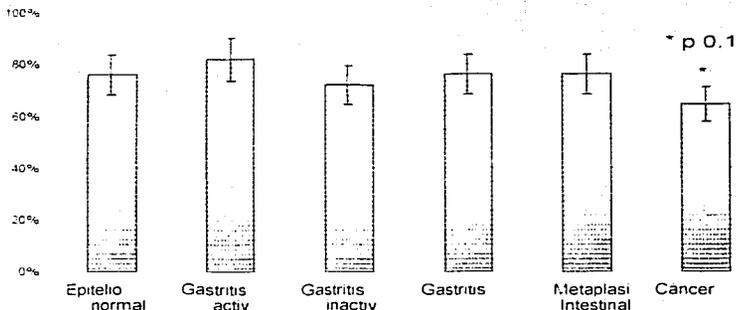


Tabla. 3 Porcentaje e intervalos de Confianza 95% de la expresión de CYP1A2

Diagnostico	Porcentaje de Expresión	Intervalo de Confianza 95%
Mucosa gastrica normal	76%	0.65 a 0.87
Gastritis crónica activa	82%	0.72 a 0.92
Gastritis crónica inactiva	72%	0.60 a 0.94
Gastritis atrófica	76%	0.64 a 0.88
Metaplasia intestinal	76%	0.65 a 0.87
Adenocarcinoma gastrico de tipo intestinal	65%	0.50 a 0.78



Gráfica. 2 Expresión inmunohistoquímica de CYP2B6 por diagnóstico

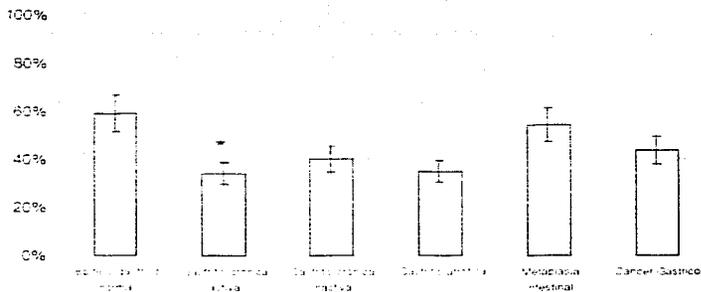


Tabla. 4 Porcentaje e Intervalos de Confianza 95% de la expresión de CYP 2B6

Diagnostico	Porcentaje de Expresión	Intervalo de Confianza 95%
Mucosa gástrica normal	59%	0.46 a 0.72
Gastritis crónica activa	34%	0.24 a 0.44
Gastritis crónica inactiva	40%	0.27 a 0.53
Gastritis atrófica	35%	0.22 a 0.48
Metaplasia intestinal	54%	0.41 a 0.67
Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal	44%	0.29 a 0.59

TE
FALLA DE CALIDAD

Gráfica. 3 Expresión inmunohistoquímica de CYP2E1 por lesión gástrica

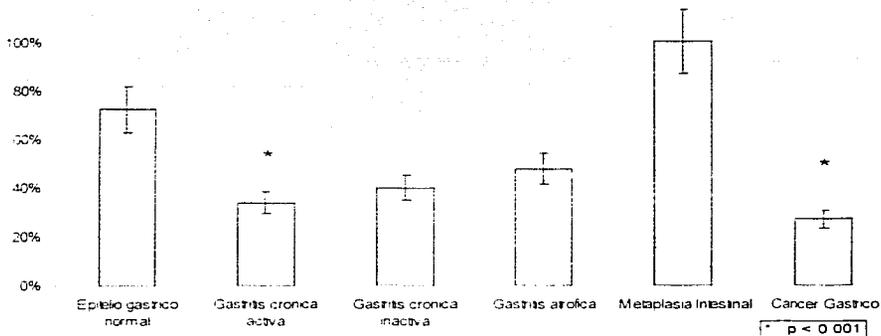


Tabla. 5 Porcentaje e Intervalos de Confianza 95% de la expresión de CYP 2E1

Diagnóstico	Porcentaje de Expresión	Intervalo de Confianza 95%
Mucosa gástrica normal	73%	0.61 a 0.85
Gastritis crónica activa	34%	0.21 a 0.47
Gastritis crónica inactiva	40%	0.27 a 0.53
Gastritis atrofica	48%	0.34 a 0.62
Metaplasia intestinal	100%	0.73 a 1
Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal	27%	0.14 a 0.39



Gráfica. 4 Expresión inmunohistoquímica de CYP3A4 por lesión gástrica

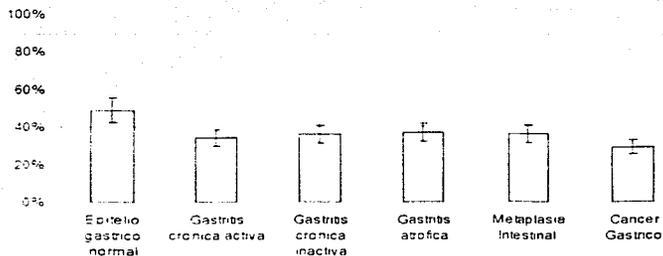


Tabla. 6 Porcentaje e Intervalos de Confianza 95% de la expresión de CYP3A4

Diagnóstico	Porcentaje de Expresión	Intervalo de Confianza 95%
Mucosa gástrica normal	49%	0.36 a 0.62
Gastritis crónica activa	34%	0.21 a 0.47
Gastritis crónica inactiva	36%	0.23 a 0.49
Gastritis atrofica	36%	0.23 a 0.51
Metaplasia intestinal	36%	0.23 a 0.49
Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal	29%	0.16 a 0.42



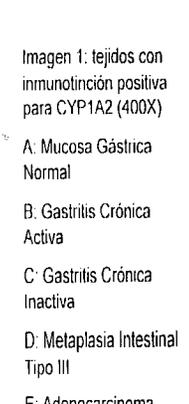
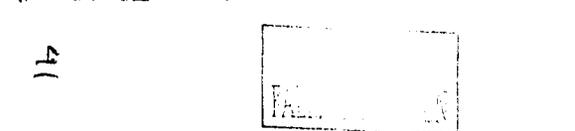


Imagen 1: tejidos con inmunotinción positiva para CYP1A2 (400X)

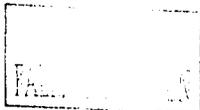
A: Mucosa Gástrica Normal

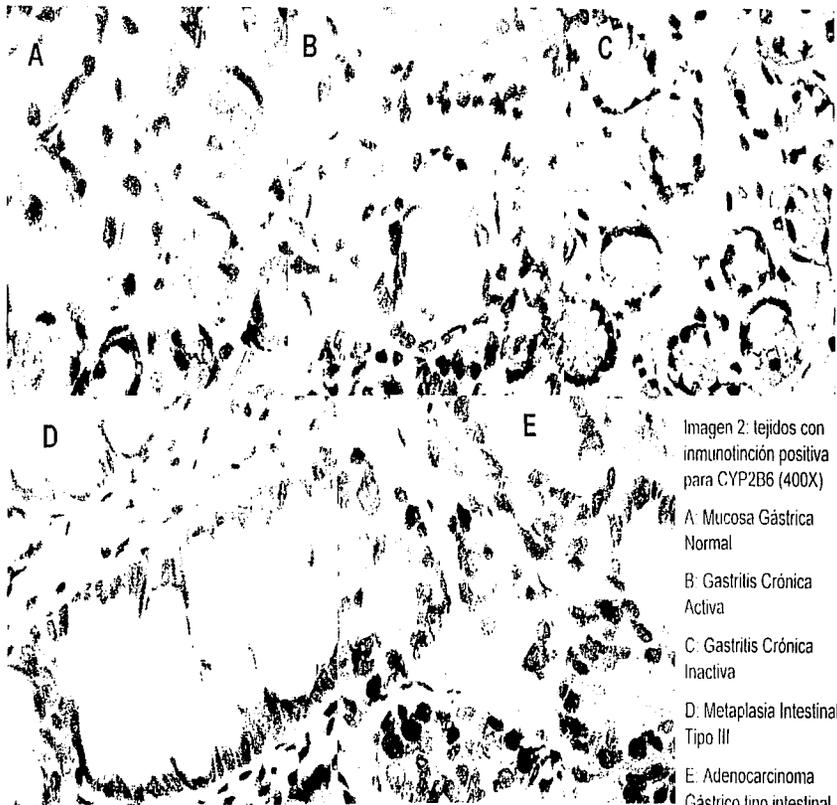
B: Gastritis Crónica Activa

C: Gastritis Crónica Inactiva

D: Metaplasia Intestinal Tipo III

E: Adenocarcinoma Gástrico tipo intestinal





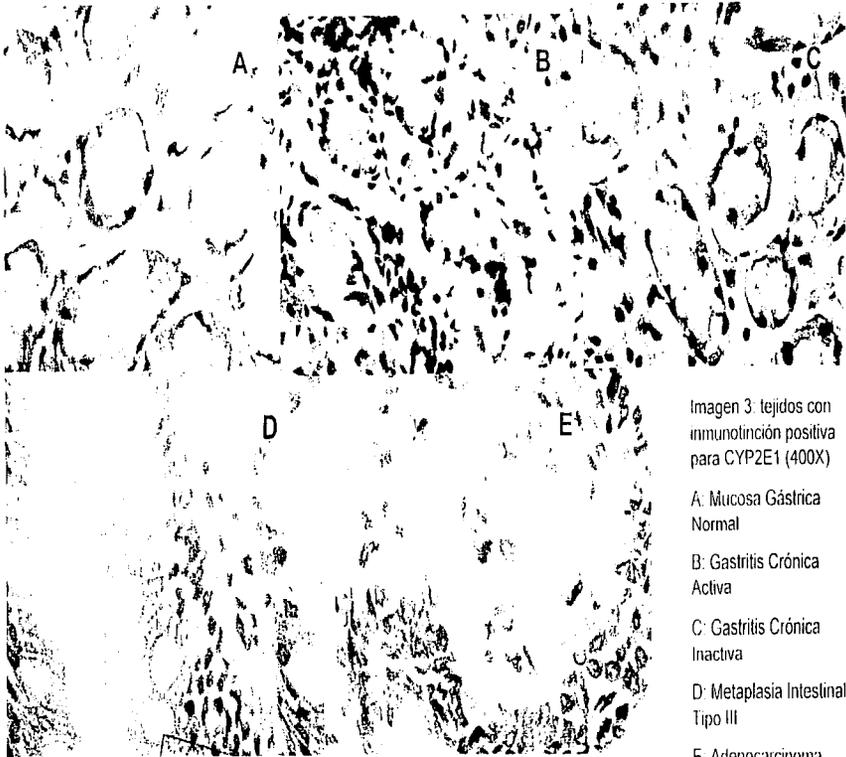


Imagen 3: tejidos con
inmunotinción positiva
para CYP2E1 (400X)

A: Mucosa Gástrica
Normal

B: Gastritis Crónica
Activa

C: Gastritis Crónica
Inactiva

D: Metaplasia Intestinal
Tipo III

E: Adenocarcinoma
Gástrico tipo intestinal

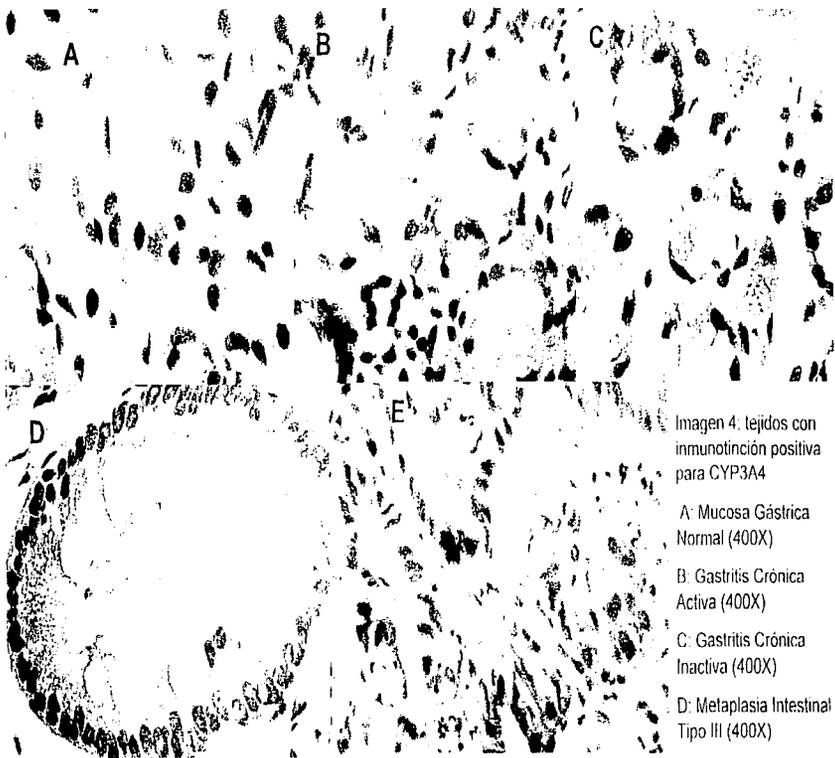


Imagen 4. tejidos con
inmunotinción positiva
para CYP3A4

- A: Mucosa Gástrica Normal (400X)
- B: Gastritis Crónica Activa (400X)
- C: Gastritis Crónica Inactiva (400X)
- D: Metaplasia Intestinal Tipo III (400X)
- E: Adenocarcinoma Gástrico tipo intestinal (250X)

77



BIBLIOGRAFIA

1. Muir CS y Harvey JC Cancer of the stomach Overview. del libro Gastric Cancer editado por T Sugimura y M Sasako Oxford University Press New York pp 3-21 1997
2. Parkin DW Pisani P Ferlay J Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990 Int J Cancer 80 827-841 1999
3. Christian TK Stadlender H Waterbor J Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer Carcinogenesis 20 (12):2195-2207 1999
4. Gao C Takezaki T Wu J et al Interaction between cytochrome P450 2E1 polymorphisms and environmental factors risk of esophageal and stomach cancers in Chinese Cancer Epidemiol Biomark Prev 11 29-34 2002
5. Principales Causas de Mortalidad General Estados Unidos Mexicanos. Estadísticas Vitales de la Secretaria de Salud 1999
6. Anuario estadístico de la Mortalidad Secretaria de Salud México 2000
7. Tahara E Pathology del libro Gastric Cancer editado por T Sugimura y M Sasako Oxford University Press New York pp 52-69 1997
8. Japanese Research Society for Gastric Cancer Japanese Classification of Gastric Carcinoma 1st English Edition Kanehara & Co. LTD., Tokyo, 1995 pp: 38-65
9. Stemmermann GN Intestinal metaplasia of the stomach. Cancer 74:556-564 1994



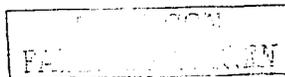
- 10 Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 48 3554-3560. 1988
- 11 Correa P. Haenzel W. Cuello C. et al. Gastric precancerous process in a high risk population. cohort follow-up. *Cancer Res* 50 4737-4740. 1990
- 12 Dixon M. Genta R. Yardley J y Correa P. Chapter 3. Classification and Grading of Gastritis. The Updated Sydney System del libro Gastritis editado por Granham D. Genta R y Dixon M. Lippincott. Williams & Wilkins, Philadelphia pp 35-49. 1999
- 13 Dixon M. Chapter 4. The Components of Gastritis del libro Gastritis editado por Granham D. Genta R y Dixon M. Lippincott. Williams & Wilkins. Philadelphia pp 51-66. 1999
- 14 Dixon M. Genta R. Yardley J y Correa P. Classification and Grading of Gastritis. The Updated Sydney System en Gastritis. *Am J Surg Pathol* 20(10) 1161-1181. 1996
- 15 Ernst P. Crowe S y Reyes V. How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? The inflammatory response. *Gastroenterology* 113 S35-S42. 1997
- 16 Bamford K. Fan X. Crowe S. et al. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T-helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 114 482-492. 1998
- 17 Correa P. Filipe MI y Torrado J. Chapter 16. Gastritis and Gastric Neoplasia del libro Gastritis editado por Granham D. Genta R y Dixon M. Lippincott. Williams & Wilkins. Philadelphia pp 205-216. 1999



- 18 Felipe MI Muñoz N, Matko I et al. Intestinal metaplasia types and risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia. *Int J Cancer* 57:324-329. 1994
- 19 IARC Schistosomes: liver flukes and *Helicobacter pylori* monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. Vol 61. Lyon France IARC 1994
- 20 Huang J, Sridhar S, Chen Y and Hunt R. Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 114:1159-79. 1998
21. Guarner J, Mohar A, Parsonnet J and Halperin D. The association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and preneoplastic gastric lesion in Chiapas, Mexico. *Cancer* 71:297-301. 1993
- 22 Lipkin M, Correa P, Miloi Y et al. Proliferative and antigenic modifications in human epithelial cells in chronic atrophic gastritis. *JNCI* 75:613-619. 1985
23. Lee A, Fox J and Hazell S. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect Imm* 61:1601-1610. 1993
- 24 Smoot D, Elliot T, Verspaget H et al. Influence of *Helicobacter pylori* on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. *Carcinogenesis* 21 (11):2091-2095. 2000
25. Watanabe S, Tsugane S y Yamaguchi N. Etiology del libro Gastric Cancer editado por T. Sugimura y M. Sasako. Oxford University Press, New York pp 33-51. 1997
- 26 Terry P, Nyren O and Yuen J. Protective effect of the fruits and vegetable on stomach cancer in a cohort of Swedish twins. *Int J Cancer* 76:36-37. 1998



27. Ye W, Ekstrom A, Hansson L et al. Tobacco, alcohol and the risk of gastric cancer by subsite and histologic type. *Int J Cancer* 83: 223-229, 1999.
28. Wu A, Wan P, y Bernstein L. A multiethnic population-based study of smoking, alcohol and body size and risk of adenocarcinomas of the stomach and esophagus (United States). *Cancer Causes Control* 12: 721-732, 2001.
29. McKinnon K, Burgess W, Hall P, et al. Characterization of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. *Gut* 35: 259-267, 1995.
30. Lang M, y Peikonen O. Chapter 3. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis del libro *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer* editado por Ryder W. IARC Scientific Publications No. 148 International Agency of Research in Cancer, Lyon, Francia, pp 13-22, 1999.
31. Massad L, De Wasiers Y, Ribrag V, et al. Comparison of mouse and human colon tumors with regard to phase I and phase II drug metabolizing enzyme systems. *Cancer Res* 52: 6567-6575, 1992.
32. Watkins PB, Wrighton SA, and Schuelz EG. Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P450 in the intestinal mucosa of rats and man. *J Clin Invest* 80: 1029-1036, 1987.
33. Hakkola J, Pasanen M, Peikonen O, et al. Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptors ligands in human placenta and cultures cells. *Carcinogenesis* 18 (2):391-397, 1997.



- 34 De Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, et al Cytochrome P450 Isoenzymes. Epoxide Hydrolase and Glutathione Transferases in Rat and Human Hepatic and Extrahepatic Tissues J Pharmacol Exp Ther 235 (1)387-394. 1990
- 35 Lewis DF Introduction del libro Guide to Cytochromes P450 Structure and Function Taylor & Francis New York pp 2-20 2001
- 36 Lewis DF Evolution of the P450 superfamily del libro Guide to Cytochromes P450 Structure and Function Taylor & Francis New York pp 22-50 2001
- 37 Whitlock JP Induction of cytochrome P4501A1 Annu Rev Pharmacol Toxicol 39 103-25 1999
- 38 Hines R Role of Tissue-Selective Transcription Factors in Regulating Xenobiotic Metabolizing Enzymes Syllabi del curso Alteration in Gene Expression as a Mechanism of toxicant action Society of Toxicology 41st. Annual Meeting Nashville TN pp 4 1 a 4 21 2002
- 39 Tronche F Ringelsen F Blumenfield M et al Analysis of the distribution of Binding Sites for a Tissue-specific Transcription Factor in the Vertebrate Genome J Mol Biol 266 231-245 1997
- 40 Hines RN y McCarver DG The ontogeny of human drug metabolizing enzymes Phase I oxidative enzymes J Pharmacol Exp Ther in press. 2002
- 41 Kawajiri K y Hayashi SI Chapter 4 The CYP1 Family del libro Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects editado por Ioannides C CRC Press Boca Raton Florida pp 77-98 1996

FALLA DE TIPOGRAFIA

- 42 Nims RW y Lubet Ra Chapter 6 the CYP2B Family del libro Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects editado por Ioannides C CRC Press Boca Raton Florida pp 135-160 1996
- 43 Ronnis MJJ Lindros KO y Ingelman-Sundberg M Chapter 9 the CYP2E Family del libro Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects editado por Ioannides C CRC Press Boca Raton Florida pp 211-239 1996
- 44 Maurel P Chapter 10 the CYP3A Family del libro Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects editado por Ioannides C CRC Press Boca Raton Florida pp 241-269 1996
- 45 Guengerich FP Cytochrome P-450 3A4 Regulation and Role in Drug Metabolism Annu Rev Pharmacol Toxicol 39 1-17 1999
- 46 Morgan ET Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection Drug Metab Rev 29(4):1129-1188 1997
- 47 Morgan ET Regulation of Cytochrome P450 by inflammatory mediators: why and how? Drug Metab Dispos 29(3): 207-212 2001
48. Sindhu R Sakai H Okamoto T Kikkawa Y Differential effect of interleukin-1 α on rat hepatic cytochrome P450 monooxygenases Toxicology 114 37-46, 1996
49. Siewert E, Bort R Kluge R Heinrich PC et al Hepatic Cytochrome P450 down-regulation during aseptic inflammation is interleukin 6 dependent Hepatology 32 49-55 2000
- 50 Traber PG McDonnell WM Wang W Florence R Expression and regulation of cytochrome P450I genes (CYP1A1 and CYP1A2) in the rat alimentary tract. Biochim Biophys Acta 1171 (2) 167-75. 1992



- 51 LeGoascogne C Sananes N. Eychenne B et al Androgen biosynthesis in the stomach expression of cytochrome P450 17-alpha-hydroxylase / 17 20 lyase messenger ribonucleic acid and protein and metabolism of pregnolone and progesterone by parietal cells of the rat gastric mucosa *Endocrinology* 136(4)1744-52 1995
- 52 Tatemichi M Nomura S Ogura T et al Mutagenic Activation of Environmental Carcinogens by Microsomes of Gastric Mucosa with Intestinal Metaplasia *Cancer Res* 59 3893-3898 1999
- 53 Yosoke T Kakiki M Horie T et al Expression of cytochrome P4503A4 in Foveolar Epithelium with Intestinal Metaplasia of the Human Stomach *Jpn J Cancer Res* 89 (10)1028-32 1998
- 54 Murray GI Taylor MC Burke MD Melvin WT Enhanced expression of cytochrome P450 in stomach cancer *Br J Cancer* 77(7) 1040-1044 1998
- 55 Genta R *Helicobacter pylori* inflammation mucosal damage and apoptosis: pathogenesis and definition of gastric atrophy *Gastroenterology* 113 S51-S55 1997
- 56 Wu M Shung C Wang H. et al Genetic alterations in gastric cancer relation to histological subtypes tumor stage and *Helicobacter pylori* infection *Gastroenterology* 112 1257-1265 1997
- 57 Côte SL Ribeiro-Da-Silva A y Cuello C *Current Protocols for Light Microscopy Immunocytochemistry del libro Immunohistochemistry II editado por Cuello AC IBRO Handbook Series John Wiley & Sons New Cork, pp 147-168. 1993*

TEST
FALLA DE ORIGEN

- 58 Hsu SM The use of the Avidin-Biotin Interaction in Immunocytochemistry del libro Immunohistochemistry II editado por Cuello AC IBRO Handbook Series John Wiley & Sons New Cork pp 1169-180 1993
- 59 Hsu S Raine L Fanger H Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques a comparison between ABC and Ulabeled Antibody (PAP) Procedures J Histochem Cytochem 1981 Apr 29(4) 577-80
- 60 Taylor CR Shi SR Chaiwun B Young L Imam SA Cote RJ Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections androgen receptor estrogen receptor progesterone receptor p53 protein proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques Hum Pathol 1994 Mar 25(3) 263-70

