



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TOPOGRAFIA DE LOS GENOTIPOS DE
vacA DE *Helicobacter pylori* EN SUJETOS
CON CÁNCER GÁSTRICO Y
CONTROLES

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
QUÍMICA FARMACEUTICO BIOLOGA
P R E S E N T A:
LEONOR JACOBO ALBAVERA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

MÉXICO, D. F.

Mayo 2005

M344196



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. Luciano Hernández Gómez

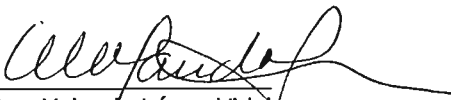
Vocal: Prof. Gonzalo Castillo Rojas

Secretario: Profa. Yolanda López Vidal

1er. Suplente: Profa. Ma. Benita Leonor Fernández Salgado

2do. Suplente: Prof. Antonio Ulises López Gutiérrez

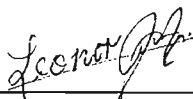
Sitio en donde se desarrolló el tema: Programa de Inmunología Molecular Microbiana, en el 4º piso del Edificio de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM.



Dra. Yolanda López Vidal
Asesor



Dr. Gonzalo Castillo Rojas
Supervisor Técnico



Leonor Jacobo Albavera
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Yolanda López Vidal por la asesoría y el apoyo brindado para la realización de esta tesis. Al Dr. Gonzalo Castillo Rojas por su asesoría técnica. A la QFB. Rosa Isabel Amieva Fernández por su apoyo en el cultivo microbiológico.

Agradezco al Dr. Sergio Ponce de León Rosales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", por el estudio clínico, clasificación de los sujetos estudiados y por la realización del análisis estadístico de los resultados.

El proyecto fue parcialmente financiado por DGAPA IN207302, UC MEXUS, Partida Presupuestal del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Agradezco a la UNAM, en especial a la Facultad de Química y a su personal académico, por todo el conocimiento impartido y todo el apoyo brindado.

Agradezco a la Fundación TELMEX por haberme otorgado una beca durante mis estudios de Licenciatura y durante el desarrollo de mi tesis.

DEDICATORIAS

A Dios, antes que nada por darme la oportunidad de vivir, por pertenecer a una familia maravillosa, por contar con amigos invaluable, por gozar de salud y por la posibilidad de alcanzar esta primera meta. Gracias Dios mío.

A mi madre, por darme la vida y por enseñarme a valorarla día con día. Gracias por tu ejemplo, por ser siempre una mujer generosa y solidaria, incansable y perseverante en todo momento. Gracias por tu apoyo incondicional, porque sin él simplemente no hubiera llegado hasta donde estoy el día de hoy, porque éste, al igual que todos mis éxitos y mis logros, también es tuyo. Gracias por todo mamá. Te amo.

A mi padre, por darme la vida y por procurar que siempre tuviera lo necesario a lo largo de ella. Gracias por enseñarme a luchar por lo que quiero y no rendirme en el primer intento. Gracias por las palabras de aliento en los momentos difíciles y por tu apoyo constante, porque también sin ti este sueño no se hubiera convertido en realidad. Gracias por todo papá. Te amo.

A mi hermano, gracias por todo tu amor, tu apoyo y por estar siempre dispuesto a escucharme y ayudarme. Gracias por tus abrazos y tus palabras de aliento que siempre me han reconfortado. Este logro también es tuyo hermanito. Gracias por todo. Te amo.

A mi abuelito Austreberto, gracias por tu ejemplo de constancia y perseverancia. Gracias por tu apoyo. Te quiero mucho abuelito.

A mi abuelita Leonor, gracias por todos tus consejos, por ser un pilar importante en mi vida, por tus palabras de aliento en los momentos difíciles y muchísimas gracias por todo tu amor. Te adoro abuelita.

A mi tía Mary Jacobo, gracias por todo tu apoyo a lo largo de mi vida y en especial durante mi carrera, por enseñarme con tu ejemplo a ser generosa, por estar siempre ahí, dispuesta a darme todo por tus seres queridos y por demostrarme que con fuerza de voluntad, se puede salir adelante. Gracias por todo, porque sin ti, este sueño no se habría hecho realidad. Te quiero mucho tía.

A mi tía Gloria Albavera, gracias por estar siempre pendiente de mi bienestar físico y emocional, gracias por tus consejos, por todo tu apoyo, porque también gracias a ti he logrado alcanzar esta meta. Te quiero mucho tía.

A mi tía Carmen Jacobo, gracias por todo tu apoyo a lo largo de mi vida y en especial durante mi carrera. Gracias por todo. Te quiero mucho tía.

A todos y cada uno de mis tíos y primos, gracias por formar parte de mi vida, por ser mi familia, por contribuir con su manera de ser, sus consejos, los momentos tristes y

alegres que hemos compartido, a la experiencia que he adquirido en la vida. Los quiero muchísimo.

A todos mis seres queridos, a mi abuelito Agustín, mi abuelita Guadalupe y mis tíos, que aunque físicamente ya no estén, siempre tendrán un lugar en mi corazón. Este trabajo también va por todos ustedes, donde quiera que estén. Los amo.

A Ana Karina (mi twinkito), ¡lo logramos! Sabes que este trabajo también es tuyo. Gracias amiga por todo tu apoyo, tanto en lo académico como en lo personal, pero sobre todo gracias por tu amistad incondicional, por ser mi angelito de la guarda en los momentos de oscuridad. ¡Te quiero muchísimo amiga!

A Jonathan, mi amigo incondicional, gracias por todo tu apoyo, por tu cariño, tu fe en mí y tu amistad. Gracias por estar siempre dispuesto a escucharme y a levantarme el ánimo en los momentos tristes. Te quiero mucho amigo.

A José Carlos, gracias amigo por tu paciencia y tu apoyo en momentos difíciles de mi vida, por tu cariño, por tu tiempo y tu amistad. Gracias por todo. Te quiero mucho amigo.

A Nurhy, ¡mi amiga de toda la vida!, gracias por todo tu apoyo, tu cariño, por tu amistad, por tantos momentos compartidos, por las lágrimas y las risas y por estar siempre ahí. Te quiero mucho amiga.

A Laura y Gaby, mis amigas de siempre. Gracias por su apoyo, su cariño, su tiempo y su amistad en todo momento. Las quiero mucho.

A José Manuel, gracias amigo por tu apoyo, que aunque no nos frecuentemos, siempre es importante saber que alguien se preocupa por ti. Gracias por tus consejos y tus palabras en los momentos difíciles. Te quiero amigo.

A Juan Carlos, gracias por transitar conmigo una etapa importante de mi vida: mi carrera. Gracias por tu apoyo. Que Dios te bendiga.

A mis compañeros del programa de Inmunología Molecular Microbiana, gracias por su presencia. En especial muchas gracias al Dr. Gonzalo Castillo Rojas por sus conocimientos, su apoyo y su tiempo.

Leonor, ¡isiéntete feliz y satisfecha porque lo hemos logrado! Aun cuando el camino en algunos momentos se tornó incierto y difícil, salimos adelante y llegamos a esta meta, la primera de muchas que aun nos faltan por alcanzar. Sigue luchando y creyendo que todo es posible, incrementando tu fe en Dios y en ti, convencida de que con esfuerzo, entrega total, constancia y pasión, todo se puede lograr.

INDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
RESUMEN	x
ABREVIATURAS	xi
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Helicobacter pylori</i> .	1
1.1.1 Descubrimiento y asociación con enfermedad en humanos.	1
1.1.2 Características microbiológicas.	2
1.1.3 Características genómicas.	4
1.2 Epidemiología de la infección por <i>H. pylori</i> .	5
1.2.1 Mecanismos de transmisión.	7
1.2.2 Asociación entre la infección por <i>H. pylori</i> y diversas enfermedades gastrointestinales.	9
1.3 Factores de virulencia de <i>H. pylori</i> .	10
1.4 Citotoxina vacuolizante (VacA).	22
1.5 Asociación entre la infección por <i>H. pylori</i> y cáncer gástrico.	31
2.- JUSTIFICACIÓN	38
3.- OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo general.	39
3.2 Objetivos particulares.	39

4.- METODOLOGÍA	40
4.1 Características del estudio.	40
4.2 Población de estudio.	40
4.3 Criterios de exclusión.	40
4.4 Muestreo sistemático de las biopsias gástricas.	41
4.5 Esquema general de trabajo.	42
4.6 Cultivo microbiológico.	43
4.7 Extracción de DNA de las biopsias gástricas y de las cepas de <i>H. pylori</i> .	43
4.7.1 Biopsias gástricas.	43
4.7.2 Cepas <i>H. pylori</i>	44
4.8 Detección de <i>H.pylori</i> en las biopsias gástricas por PCR.	44
4.9 Caracterización genotípica de <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> en biopsias gástricas y cepas de <i>H. pylori</i> por PCR.	45
4.10 Análisis estadístico de los resultados.	46
5.- RESULTADOS	48
5.1 Características de la población de estudio.	48
5.2 Positividad a <i>H. pylori</i> por cultivo en los grupos estudiados.	48
5.2.1 Sujetos dispépticos no ulcerosos (controles).	48
5.2.2 Sujetos con cáncer gástrico (casos).	49
5.2.2.1 Zonas predeterminadas.	49
5.2.2.2 Zonas del tumor.	50

5.2.3 Estadios del cáncer gástrico.	52
5.3 Positividad a <i>H. pylori</i> por PCR en los grupos estudiados.	54
5.3.1 Sujetos dispépticos no ulcerosos.	54
5.3.2 Sujetos con cáncer gástrico.	55
5.3.2.1 Zonas predeterminadas.	55
5.3.2.2 Zonas del tumor.	56
5.3.3 Estadios del cáncer gástrico.	57
5.4 Topografía de los genotipos de la secuencia señal de <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> en los grupos estudiados.	58
5.4.1 Sujetos dispépticos no ulcerosos.	58
5.4.2 Sujetos con cáncer gástrico.	59
5.4.2.1 Zonas predeterminadas.	59
5.4.2.2. Zonas del tumor.	61
5.4.3 Estadios del cáncer gástrico.	63
5.5 Topografía de los genotipos de la región media de <i>vacA</i> en los grupos estudiados.	64
5.5.1 Sujetos dispépticos no ulcerosos.	64
5.5.2 Sujetos con cáncer gástrico.	66
5.5.2.1 Zonas predeterminadas.	66
5.5.2.2 Zonas del tumor.	67
5.5.3 Estadios del cáncer gástrico.	69
6.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	70

7.- CONCLUSIONES	80
8.- BIBLIOGRAFÍA	81

RESUMEN

H. pylori está clasificado como agente carcinógeno tipo I por ser causa definida de cáncer en humanos. La citotoxina vacuolizante (VacA) es un factor de virulencia importante, es una proteína formadora de poros que causa vacuolización masiva en las células del epitelio gástrico. El gen *vacA* que la codifica, está dividido en varias familias de alelos que difieren en la secuencia señal (s1: a, b, c y s2) y región media (m1: a, b, c y m2: a, b, c). La secuencia señal es responsable del grado de inflamación en la mucosa gástrica; la región media es responsable del daño en el tejido epitelial. El genotipo s1/m1 de *vacA* es la combinación más citotóxica y se asocia al desarrollo de úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico. El objetivo del presente trabajo fue determinar la topografía de *H. pylori* y sus genotipos de *vacA* en biopsias gástricas y cepas de *H. pylori* de sujetos con cáncer gástrico (casos), con diferentes estadios y dispépticos no ulcerosos (controles). Se estudiaron 30 sujetos a los cuales se les realizó un muestreo sistemático de 12 biopsias en 4 diferentes zonas predeterminadas del estómago (fondo, cuerpo, incisura angular y antro). En los casos se obtuvieron además biopsias del centro del tumor, periferia, +2cm y +5cm. Se realizó la detección del gen *16S rRNA* y la caracterización genotípica de *vacA* por PCR en biopsias y cepas. Una alta positividad a *H. pylori* fue encontrada en los sujetos con cáncer gástrico, principalmente en la zona tumoral. La mayor diversidad de genotipos en casos y controles fue en el cuerpo. El genotipo s1b predominó en las zonas predeterminadas de ambos grupos; además la topografía de los genotipos fue significativamente distinta en los sujetos dispépticos no ulcerosos y en los sujetos con cáncer gástrico, la distribución fue significativamente distinta en los sujetos con estadios tempranos y avanzados de cáncer gástrico. Los genotipos de la región m de *vacA* sólo presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los sujetos dispépticos no ulcerosos y el genotipo m1 predominó en la mayoría de las zonas predeterminadas de ambos grupos. En conclusión el presente trabajo mostró una alta prevalencia de *H. pylori* en los sujetos con cáncer gástrico con una topografía similar en las zonas predeterminadas y en las del tumor, por lo que no se encontró asociación entre los genotipos de *vacA* y la entidad clínica.

ABREVIATURAS

CagA	Proteína asociada a la citotoxina
<i>cagA</i>	Gen asociado a la citotoxina
CO ₂	Bióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
G+C	Contenido Guanina-Citosina
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IL-8	Interleucina 8
kDa	Kilodaltones
LPS	Lipopolisacárido
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
m	Región media de <i>vacA</i>
µm	Micrómetro
mM	Milimolar
nm	Nanomoles
min	Minutos
O ₂	Oxígeno.
PME's	Proteínas de membrana externa
PAI- <i>cag</i>	Isla de patogenicidad <i>cag</i>
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
pm	Picomoles
s	Secuencia señal de <i>vacA</i>
VacA	Citotoxina vacuolizante
<i>vacA</i>	Gen de la citotoxina vacuolizante.
U	Unidad
<i>16S rRNA</i>	Gen <i>16S RNA ribosomal</i>

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 *Helicobacter pylori*.

1.1.1 Descubrimiento y asociación con enfermedad en humanos.

Durante muchos años se creyó que el estómago humano no era colonizado por ninguna bacteria, debido a que se consideraba que el jugo gástrico tenía actividad bactericida [1]. Sin embargo, en 1979 Robin Warren, patólogo australiano, describió que a menudo observaba bacterias curvas en las biopsias gástricas; organismos similares fueron descritos previamente por patólogos europeos en el siglo XIX, aunque debido a que no habían sido cultivados fueron ignorados [2]. Barry Marshall, un estudiante de medicina interna, se interesó en las observaciones de Warren y ambos lograron cultivar a las bacterias a partir de biopsias gástricas humanas, con métodos de cultivo para especies del género *Campylobacter* debido a la similitud que existía entre los microorganismos de este género y los observados en las biopsias [2]. Después de varios intentos fallidos, lograron obtener colonias en los cultivos al término de cinco días de incubación; finalmente, el microorganismo fue caracterizado morfológicamente y llamado en un principio *Campylobacter pyloridis*, luego *Campylobacter pylori* y finalmente *Helicobacter pylori* [2].

Años más tarde (1984) la infección por *H. pylori* fue asociada con la presencia de inflamación en la mucosa gástrica, especialmente con la infiltración de células polimorfonucleares y no fue hasta 1994 que se concluyó que *H. pylori* era la principal

causa de úlcera péptica y se recomendó su erradicación en los individuos infectados que presentaban úlceras [2]. En ese mismo año la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), perteneciente a la Organización Mundial de la Salud, declaró que había suficiente evidencia epidemiológica e histológica para clasificar a *H. pylori* como carcinógeno en humanos [3].

La infección por *H. pylori* fue asociada también con lesiones patológicas comunes del tracto gastrointestinal superior: esófago de Barrett, gastritis crónica, úlcera gástrica, úlcera duodenal, adenocarcinoma gástrico y linfoma MALT de células B [4].

1.1.2 Características microbiológicas.

H. pylori es un bacilo gramnegativo pequeño (0.5-1.0 μm de ancho y 2.5-4.0 μm de largo) en forma de espiral, microaerófilo, catalasa, ureasa y oxidasa positivo [4]. Después de un cultivo prolongado en medio sólido o líquido predominan las formas cocoides, las cuales aún son metabólicamente activas [2].

H. pylori posee múltiples flagelos en uno de sus polos, lo que le da la facultad de ser altamente móvil. Es un microorganismo de crecimiento lento, deben transcurrir de 5 a 7 días en condiciones de microaerofilia (5% O_2 , 10% CO_2) para apreciar el crecimiento de colonias en medios sólidos [6]; requiere de medios de composición compleja, ya sea sólidos o líquidos, con algún suplemento tal como: sangre de caballo, suero fetal bovino, carbón vegetal, harina de maíz o emulsión de yema de huevo [2, 6].

H. pylori produce gran número de enzimas que le facilitan la colonización de la mucosa gástrica humana, tales como: catalasa, fosfolipasa, tioredoxin-reductasa y ureasa; esta última metaboliza la urea y crea un microambiente neutro alrededor del microorganismo para que sobreviva al pH ácido del estómago, y por su movilidad alcanza la capa de moco y el epitelio superficial del estómago y así da inicio a la colonización [5].

Algunas propiedades bioquímicas de *H. pylori* se enlistan en la tabla 1 [4].

Tabla 1. Características bioquímicas de *Helicobacter pylori*.

Característica	<i>H. pylori</i>
Ureasa	+
Catalasa	+
Oxidasa	+
Producción de H ₂ S	-
Reducción de nitratos	-
Crecimiento a:	
42° C	-
37° C	+
25° C	-

+ =positivo; - =negativo

En relación a su metabolismo y a la secuenciación de su genoma completo, se conoce que de manera consistente con su nicho restringido, *H. pylori* posee un

repertorio metabólico limitado, capacidad biosintética reducida y escasas vías regulatorias [8].

Existe evidencia de que *H. pylori* puede metabolizar la glucosa tanto por rutas oxidativas como por fermentativas, aunque sea considerado un microaerófilo obligado. La glucosa parece ser el único carbohidrato utilizado como fuente de energía por esta bacteria [7].

1.1.3 Características genómicas.

El genoma de *H. pylori* 26695 tiene un cromosoma circular de 1,667,867 pares de bases (pb), con un contenido promedio de G+C de 39%. En su genoma se encontraron 5 regiones con distinta composición de G+C, dos de ellas contienen una o más copias de la secuencia de inserción IS605, mismas que están flanqueadas por la secuencia 5S rRNA en un extremo y una repetición de 521 pb en el otro; estas dos regiones son importantes porque contienen genes involucrados en el procesamiento del DNA. Otra región importante es la isla de patogenicidad *cag* (PAI-*cag*), la cual está flanqueada por repeticiones de 31 pb y parece ser un producto de transferencia lateral [8].

En el genoma de la cepa de *H. pylori* 26695 se identificaron 1,590 secuencias de codificación predicha, con un tamaño promedio de 945 pb; 1,091 de éstas mostraron similitud con genes contenidos en bases de datos que incluyen todos los genes descritos para otros microorganismos. Algunos de los 1,091 genes codifican para proteínas de

función biológica conocida, pero otros aun no tienen funciones asignadas. También se identificaron 95 familias de genes parálogos que comprenden 266 genes; 67 de estos genes tienen una función asignada y la mayoría pertenece a categorías funcionales del desarrollo de la célula, proteínas de unión, de transporte e involucradas en la replicación [8].

En cuanto a la virulencia de *H. pylori*, el gen *cagA* que codifica para la proteína asociada a la citotoxina, está localizado al final de una isla de patogenicidad, la cual contiene genes que son responsables de la inducción de la producción de IL-8 por las células epiteliales gástricas. El gen *vacA* (HP887) presente en la cepa de *H. pylori* 26695 codifica para la citotoxina que induce la formación de vacuolas acídicas en las células epiteliales del hospedero y su presencia está asociada epidemiológicamente con daño al tejido y enfermedad [8].

Un análisis comparativo de la secuencia genómica de dos aislamientos clínicos independientes de *H. pylori* mostró que éstos son altamente conservados, con únicamente entre 6-7% de genes específicos para cada cepa [9].

1.2 Epidemiología de la infección por *H. pylori*.

H. pylori infecta a más del 50% de la población a nivel mundial [10, 11]. La prevalencia de la infección por *H. pylori* varía de acuerdo al área geográfica, edad, raza y nivel socioeconómico [12].

Las tasas de infección parecen ser más altas en países en vías de desarrollo que en países desarrollados [12]. Algunos países en vías de desarrollo presentan tasas de infección de aproximadamente 90%, mientras que en países industrializados de Europa occidental, Norteamérica y Oceanía las tasas de infección son menores a 30% [13].

En la mayoría de los casos se ha planteado que la infección por *H. pylori* se adquiere naturalmente en la infancia [2, 4, 5, 12]. En países en vías de desarrollo, la prevalencia de la infección varía entre un 70 a 90%, mientras que en los países desarrollados está entre 25 y 50% [2]. Las diferencias en prevalencia se atribuyen a la tasa de adquisición de *H. pylori* en la infancia: en niños menores a 10 años que residen en países en vías de desarrollo la infección por *H. pylori* fue de aproximadamente 13 a 60%, comparada con 0 a 5% en niños que residen en países desarrollados. El incremento en la prevalencia por arriba de esta edad se ha observado que es de 0.5 a 2% por año [16]. En México, la seroprevalencia a un año de edad es 20% y el incremento estimado en la seropositividad por año es de 5% para niños entre 1 y 10 años de edad [15].

La mayoría de los estudios sugieren que el género no parece tener relación con la infección por *H. pylori* [4, 11, 17]; sin embargo, se reportan tasas de infección ligeramente mayores en población masculina que en femenina [2, 10].

Por otro lado, las tasas de infección altas observadas en grupos étnicos tales como afroamericanos, hispanos y americanos nativos, infectados a edad temprana, son

debido a la transmisión intrafamiliar, bajo nivel socioeconómico, cuidado de salud deficiente y hacinamiento [15]. Los afroamericanos e hispanos que residen en Estados Unidos tienen tasas de infección por *H. pylori* más altas que otros grupos raciales o étnicos, sugiriendo así la existencia de cierta predisposición genética a la infección [10].

1.2.1 Mecanismos de transmisión

El modo de transmisión más probable para la infección por *H. pylori* en base a diversos estudios epidemiológicos, se ha postulado que sea de persona a persona [11, 12, 14, 16]; esto es apoyado por la ausencia de un reservorio no humano para dicho microorganismo [2, 14, 15, 16] y también por la alta prevalencia e incidencia de la infección encontradas entre personas que mantienen un contacto cercano; por ejemplo, en las instituciones de orfanatos o para personas con retraso mental [4, 12, 14] y en el núcleo intrafamiliar [12, 14].

Diversas fuentes externas de infección por *H. pylori* han sido sugeridas, tales como agua, ovejas, gatos domésticos, moscas domésticas y vegetales crudos tratados con aguas residuales [5, 11, 12, 14, 15].

En cuanto a las rutas de transmisión, se describen principalmente tres: gastro-oral, oral-oral y fecal-oral [14, 16]. La ruta de transmisión gastro-oral, vía secreciones estomacales o vómito, es sugerida como una ruta importante especialmente durante la infección aguda por *H. pylori* en niños [14, 16]. Esta ruta es apoyada por la detección

de DNA de *H. pylori* en vómito [10, 12]; sin embargo, la viabilidad de la bacteria se ha cuestionado debido a que se argumenta que en el vómito *H. pylori* no puede sobrevivir por las condiciones ácidas del medio y a la ausencia de urea, por lo cual la factibilidad de esta ruta de transmisión sigue siendo controversial [14].

En cuanto a la ruta oral-oral, es sustentada por el aislamiento de *H. pylori* a partir de placa dental [4], de saliva [10] y su detección por PCR en placa dental y en saliva [4, 5, 12,]. Sin embargo, el aislamiento de *H. pylori* a partir de la cavidad oral fue en muchas ocasiones infructuoso y su detección por PCR fue de gran variación en los estudios realizados [16]. Algunos datos epidemiológicos apoyan la idea de que ciertos hábitos culturales aumentan la transmisión oral de *H. pylori*, por ejemplo la premasticación de la comida por las madres africanas antes de alimentar a sus hijos mostró ser un factor de riesgo para la infección por *H. pylori* [2, 11, 16].

La ruta fecal-oral es sugerida por la detección de DNA de *H. pylori* en heces humanas [10, 12, 14]; no obstante, se debe considerar que el hallazgo del DNA no necesariamente implica que las bacterias presentes en las heces sean viables y esto se ha concluido en base a que fue difícil lograr un cultivo de *H. pylori* a partir de heces [14, 16]. Además se debe considerar que en los intentos realizados para detectar DNA de *H. pylori* en heces se obtuvieron resultados variables [16]. En relación a esta ruta se han sugerido diversos vectores de transmisión, como agua potable residual, con base en la detección de *H. pylori* por PCR a partir de la misma [12, 14, 15] y las moscas domésticas se plantearon como vectores importantes; sin embargo, hace falta evidencia

de que *H. pylori* pueda ser transmitido a humanos por medio de moscas expuestas y en contacto con heces infectadas con *H. pylori* [12].

Por último, se ha postulado también la transmisión iatrogénica de la infección por *H. pylori*, por medio de equipo endoscópico sin limpieza y desinfección adecuada; sin embargo, se reportó que dicha vía de transmisión es la menos común [2, 10, 12, 14].

1.2.2 Asociación de la infección por *H. pylori* con diversas enfermedades

Después de la infección aguda por *H. pylori*, dicho microorganismo persiste por años o décadas en la mayoría de las personas. En general todos los sujetos infectados por *H. pylori* desarrollan inflamación crónica y generalmente es asintomática [2, 4].

En diversos estudios se ha mostrado evidencia de que la infección de la mucosa gástrica inducida por *H. pylori* puede conducir a una gastritis y eventualmente puede ser responsable del desarrollo de úlceras gástricas y duodenales o de cáncer gástrico [18]. Sin embargo, la fuerza de la asociación entre la infección y las entidades clínicas anteriormente mencionadas varía de acuerdo al marco de establecimiento, es decir, las asociaciones entre la infección y gastritis crónica y úlceras pépticas son comúnmente reportadas en países desarrollados y el adenocarcinoma gástrico es comúnmente encontrado en países en vías de desarrollo [11]. Las razones para esta diferencia no son claras; sin embargo se plantea que estas asociaciones pueden estar relacionadas con la variabilidad existente en los reportes. Una teoría alternativa es que la presentación de la

enfermedad está relacionada con la edad a la cual un individuo es infectado por *H. pylori* ya que se ha postulado que las infecciones en la infancia temprana inducen inflamación crónica de bajo grado, la cual a través del tiempo da lugar al desarrollo de cambios premalignos y eventualmente adenocarcinoma gástrico. En contraste, cuando la infección es adquirida más tarde, es más probable que induzca una respuesta inflamatoria enérgica y que se desarrolle una úlcera péptica [11].

Con relación a la dispepsia no ulcerosa, no existe hasta la fecha asociación reconocida entre la infección por *H. pylori* y dicha entidad clínica [2, 18]. Por otro lado, sí se logró asociar significativamente la infección por *H. pylori* con el desarrollo de linfoma de tipo MALT [4, 10, 18].

La infección por *H. pylori* además de promover el riesgo de desarrollar enfermedad ulcero péptica y adenocarcinoma gástrico no cardias, se ha reportado que también tiene una función protectora en el reflujo gastro-esofágico grave y sus secuelas: esófago de Barrett y adenocarcinoma del esófago [10, 19, 20].

1.3 Factores de virulencia de *H. pylori*

La infección crónica del estómago por *H. pylori* puede resultar en un amplio espectro de entidades clínicas. Las consecuencias de la infección en cualquier individuo dependen de su constitución genética, de aspectos ambientales y de los factores de virulencia del microorganismo [21]. Con relación a esto último, diversos factores de

virulencia se han propuesto para *H. pylori*, tales como: adhesinas, flagelos, ureasa, lipopolisacárido (LPS), isla de patogenicidad *cag* (PAI *cag*), proteína asociada a la citotoxina (CagA) y la citotoxina vacuolizante (VacA) [15]. A continuación se incluyen las características principales de cada uno de estos factores de virulencia:

Las adhesinas son proteínas bacterianas, glicoconjugados o lípidos que están involucradas en las etapas iniciales de colonización, mediando la interacción entre la bacteria y los receptores en la superficie de las células epiteliales del huésped, tales como lípidos, proteínas, glicolípidos o glicoproteínas [15, 22]. En la Tabla 2, se incluyen algunas de las adhesinas de *H. pylori* y su receptor celular correspondiente en el hospedero.

Debido a que tanto el epitelio gástrico como la capa mucosa están en constante recambio y a que el peristaltismo asegura un constante movimiento de la comida y detritus celulares, *H. pylori* desarrolló mecanismos de adherencia y colonización que lo fijan específicamente a la mucosa gástrica. La adherencia de la bacteria a los receptores celulares del hospedero provoca cambios celulares que incluyen cascadas de transducción de señales, conduciendo a la infiltración de células inflamatorias (neutrófilos y monocitos) y a su persistencia [22].

Tabla 2. Adhesinas de *H. pylori* y sus receptores celulares [22].

Nombre	Adhesina de <i>H. pylori</i>	Receptor celular en el hospedero
Lipoproteína A asociada a la adherencia, Lipoproteína B asociada a la adherencia	AlpA, AlpB	Desconocido
Adhesina de unión a un antígeno de grupo sanguíneo	BabA	Lewis b
Proteína Z de membrana externa	HopZ	Desconocido
Proteína adhesina A, Proteína activadora de neutrófilos	HpaA, Nap	N-acetilneuraminilactosa (ácido siálico)
Proteína de choque térmico 60, proteína de choque térmico 70	Hsp60, Hsp70	Sulfato de lactosilceramida y sulfato de galectosilceramida
Lipopolisacárido	LPS	Laminina
Antígeno O del lipopolisacárido, Proteína activadora de neutrófilos	Antígeno O del LPS (Lewis X); Nap	Lewis X
Proteína Activadora de Neutrófilos	Nap	Mucina gástrica
-	Desconocida	MHC clase II
-	Desconocida	Integrinas β 1

De todas las adhesinas mencionadas en la Tabla 2, la adhesina de unión a un antígeno de grupo sanguíneo (BabA) es la que ha sido estudiada con más detalle. BabA es una adhesina de *H. pylori* que interactúa con el antígeno de grupo sanguíneo Lewis^b

fucosilado en las células epiteliales gástricas [21, 23, 24]. Esta adhesina es codificada por el gen *babA2*, un miembro de la familia altamente conservada de 32 proteínas de membrana externa (PME). Las cepas de *H. pylori* que poseen el gen *babA2* se adhieren eficientemente a las células epiteliales gástricas y promueven un fenotipo más agresivo, productor de lesiones inflamatorias graves tales como gastritis atrófica [23, 25]. De hecho, diversos estudios reportaron que las cepas de *H. pylori babA2* positivas están asociadas a un mayor riesgo para desarrollar úlceras pépticas y adenocarcinoma gástrico, mientras que las cepas *babA2* negativas son más a menudo asociadas con dispepsias no ulcerosas [21].

Otros dos miembros de las PME, AlpA y AlpB, son necesarios para la unión de *H. pylori* con el tejido gástrico humano; el perfil de unión es diferente al de BabA, es decir, el mecanismo de adherencia de AlpA y AlpB es independiente del antígeno Lewis^b y se desconocen los receptores celulares en el hospedero para dichas adhesinas [22, 24].

La movilidad es un factor esencial para la colonización por *H. pylori*; esto fue postulado por la incapacidad de las variantes aflageladas y no móviles de esta bacteria para infectar lechones gnotobióticos [2, 15]. Basándose en el genoma de *H. pylori*, se especula que al menos 40 proteínas están involucradas en la regulación, secreción y ensamblaje de la estructura flagelar [8].

H. pylori posee normalmente de dos a seis flagelos de aproximadamente 3 μ m de longitud en uno de sus polos [2, 26]. Cada flagelo está compuesto por un cuerpo basal,

un gancho y un filamento; además, presenta una cubierta constituida por una estructura membranal contigua a la membrana externa, con composición similar en lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas, cuya función se especula es proteger a los filamentos de la digestión mecánica y enzimática [7, 24, 26].

El filamento flagelar está compuesto por dos subtipos de flagelinas, la más abundante es la proteína FlaA, de la cual está formada la mayor parte del filamento y una segunda proteína FlaB, la cual parece estar localizada exclusivamente de manera proximal al gancho dentro del filamento ensamblado [25]. Ambas flagelinas tienen masa molecular similar y comparten considerable homología en su secuencia de aminoácidos; sin embargo, sus respectivos genes no se encuentran relacionados dentro del cromosoma [26]. A partir de estudios con mutantes isogénicas de *flaA* o *flaB*, se sabe que ambos genes son necesarios para que la bacteria presente movilidad completa y para el establecimiento de la infección persistente en modelo de lechón gnotobiótico [26].

Por otro lado, el pH bajo del lumen gástrico y el constante recambio de la capa mucosa representan una continua amenaza para la persistencia de la bacteria; se ha postulado que *H. pylori* tiene la habilidad de moverse hacia la superficie celular epitelial para evitar ser eliminada junto con el flujo de moco hacia el duodeno o exterminada por el ácido gástrico. Existe evidencia experimental que muestra que *H. pylori* presenta actividad quimiotáctica hacia varios compuestos: aminoácidos como glutamina, histidina, lisina y alanina; mucina, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio y urea [24, 26].

El movimiento de *H. pylori* hacia la urea y el bicarbonato se ha visto que se incrementa marcadamente en un medio viscoso y que es dependiente de la presencia de una enzima ureasa funcional. La rotación del motor flagelar de *H. pylori* se lleva a cabo por la conversión de energía electroquímica en energía mecánica; depende de una fuerza motriz protónica y la hidrólisis de la urea intracelular realizada por la ureasa se ha sugerido que puede proporcionar esta fuerza motriz y que el movimiento quimiotáctico hacia la urea puede proveer el sustrato para dicha hidrólisis. [24, 26].

H. pylori produce altos niveles de ureasa; ésta representa más del 6% de la proteína total de la bacteria [7]. La ureasa tiene una función central en el metabolismo de *H. pylori* y en su virulencia, ya que es necesaria para la colonización de la mucosa gástrica, debido a que le permite al microorganismo sobrevivir en un ambiente altamente ácido y es un potente inmunógeno que provoca una respuesta inmune importante [15, 23, 27].

La ureasa es una enzima citoplásmica que cataliza la hidrólisis de la urea en la cual se produce amoníaco y dióxido de carbono [21, 24]. Es una enzima altamente eficiente; su k_m es 0.3-0.4 mM, lo cual le permite realizar una conversión significativa de urea a amonio a muy bajas concentraciones de urea [2, 18]. La ureasa nativa de *H. pylori* tiene una masa molecular de aproximadamente 540 kDa; es una molécula hexamérica que contiene Ni^{2+} y está constituida por dos subunidades: UreA (30 kDa) y UreB (62kDa) [2, 27]. La biosíntesis de la ureasa es controlada por un grupo de siete genes contiguos (*ureABIEFGH*), incluyendo los genes que codifican para la ureasa (*ureA*

y *ureB*) y cinco genes accesorios que son responsables de la recepción e inserción de los iones Ni^{2+} en el sitio activo de la apoenzima [15, 23, 27].

La hidrólisis de la urea catalizada por la ureasa puede ser tóxica a pH neutro. La activación de la enzima se lleva a cabo para proteger a la bacteria contra el ambiente extremadamente ácido del estómago. El incremento en la actividad de la ureasa es dependiente de pH; por lo tanto, *H. pylori* ha desarrollado un mecanismo único de control del acceso al sustrato de la ureasa intracelular. Los canales de urea (UreI) presentes en la membrana interna son abiertos a niveles de pH menores a 6.5, permitiendo la liberación de urea y su consecuente utilización por la ureasa; el amoníaco producido se difunde y amortigua el pH del periplasma. De esta manera *H. pylori* logra tener un nivel preciso de control sobre el pH de su ambiente [23, 25].

La función principal de la ureasa se ha planteado que es la neutralización del microambiente gástrico mediante la producción de amonio. Con relación a esto diversos estudios se han realizado; en uno de ellos se observó que una cepa mutante ureasa negativa (*ureB*⁻) construida por ingeniería genética no pudo colonizar el estómago de un ratón desnudo (*nude*) y en otro estudio se encontró que cepas de *H. pylori* mutantes ureasa negativas isogénicas fueron incapaces de colonizar lechones gnotobióticos [2, 15, 24]. En un estudio posterior se observó que la co-inoculación de una cepa de *H. pylori* ureasa negativa (*ureG*⁻) con una cepa ureasa positiva, dio como resultado colonización solo de la cepa ureasa positiva en el estómago de lechones gnotobióticos,

sugiriendo así que la neutralización del microambiente no es la única función de la ureasa [15].

Por otro lado, se observó que cepas de *H. pylori* mutante del gen *ureB* no mostraron movilidad en agar, mientras que las cepas de *H. pylori* parentales sí fueron móviles; además, la movilidad quimiotáctica de *H. pylori* ureasa negativa fue mucho menor que la presentada por la bacteria ureasa positiva; por lo tanto, se especuló que la ureasa citoplásmica fue necesaria para la movilidad quimiotáctica de *H. pylori* en un ambiente altamente viscoso y que dicha función adicional en la movilidad se lleva a cabo posiblemente a través de la generación de un potencial de membrana protónico que facilita la rotación del motor flagelar. Su forma en espiral y la quimiotaxis hacia la urea, así como su complejo control de motilidad, deben permitirle a esta bacteria adaptarse al nicho ecológico provisto por la mucosa gástrica [24, 27].

Finalmente, la ureasa contribuye a la toxicidad celular mediante la producción de amonio, el cual activa a los leucocitos polimorfonucleares y a los monocitos para la liberación de citocinas como interleucina 8 (IL-8). Este proceso produce una respuesta inflamatoria localizada, conduciendo a daño del tejido epitelial gástrico. En la presencia de cloruro de amonio la citotoxina vacuolizante (VacA) es altamente activa e induce la generación de un mayor número de vacuolas que la citotoxina sola; por lo tanto esto sugiere que existe una cooperación significativa entre la ureasa y VacA para causar daño celular [15].

El lipopolisacárido (LPS) de *H. pylori* está involucrado en la patogénesis de la infección [28] y aunque tiene propiedades similares a los LPS's de otras bacterias gramnegativas, posee propiedades biológicas únicas. El LPS de *H. pylori* está compuesto por un lípido A, un centro constituido por oligosacáridos y por cadenas O en las cuales se observa que se encuentran expresados los antígenos de grupo sanguíneo Lewis "X" (LeX) y/o Lewis "Y" [15, 28, 29].

Una de las características sobresalientes del LPS de *H. pylori* es su baja actividad proinflamatoria; esto se ha asociado al patrón de fosforilación en su lípido A y se especula que esa baja actividad biológica prolonga la infección por *H. pylori* y contribuye a la inflamación crónica en la mucosa gástrica [2, 28, 29].

En estudios recientes se ha demostrado que la estructura del LPS de la cepa NTCC 11637 de *H. pylori* es similar al antígeno de Lewis "X" encontrado en los eritrocitos del grupo sanguíneo "O" y en las células epiteliales gástricas, mientras que la cepa MO19 presenta un LPS con antígeno de Lewis "Y" y la cepa P466 expresa tanto LeX como LeY [15]. El nivel de expresión de los antígenos de Lewis varía entre las cepas de *H. pylori* y esta variación es estimulada por los antígenos de Lewis expresados en la superficie de las células epiteliales. Este mimetismo antigénico da como resultado una inmunotolerancia contra los antígenos del patógeno, lo cual favorecería la permanencia de *H. pylori* por un largo período de tiempo dentro del nicho gástrico o podría también favorecer la inducción de una respuesta autoinmune contra los antígenos de Lewis expresados en las células epiteliales gástricas, conduciendo a un daño directo o

indirecto; esto fue frecuentemente observado en sujetos con gastritis crónica activa [10, 15, 28, 29].

La isla de patogenicidad *cag* (PAI *cag*) de *H. pylori* fue originalmente nombrada *cag* (gen asociado a la citotoxina) debido a que se pensaba que estaba asociada con la expresión de la citotoxina vacuolizante (VacA). Sin embargo, más tarde se demostró que ambos factores, VacA y la PAI *cag*, son independientes, aunque a menudo las cepas *cag* negativas no expresan VacA [33].

La PAI *cag* es un locus de 40 kb que contiene 31 genes y que está insertado en el gen cromosomal de la glutamato racemasa. La PAI *cag* se ha sugerido que fue adquirida de otro microorganismo por transferencia horizontal debido a la presencia de una secuencia de inserción IS605 y a su bajo contenido de G+C (35%) comparado con el del resto del genoma de *H. pylori* (39%) [10, 15, 33].

Seis de los genes de la PAI *cag* son homólogos a los genes presentes en operones de otros microorganismos como *Bordetella pertussis*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli* entre otros; estos operones codifican para un sistema de secreción tipo IV, una jeringa molecular por medio de la cual las bacterias transfieren una variedad de complejos multimoleculares a través de la membrana bacteriana al espacio extracelular o al interior de otras células [10, 15, 30, 31, 32].

La PAI *cag* de *H. pylori* contiene genes que inducen la secreción de IL-8 por las células epiteliales gástricas, mediante la activación de los complejos del factor nuclear kappa Beta (NF- κ B); la PAI *cag* induce también la remodelación de la superficie celular, un rearrreglo en el citoesqueleto y en consecuencia la formación de un pedestal, debido a la fosforilación de la proteína asociada a la citotoxina. Además, se activa el factor de transcripción AP-1 y la cascada de ERK-MAP cinasas, conduciendo a la expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun*, resultando así en la fosforilación de ELK-1 y en un incremento en la transcripción de *c-fos*. Las cepas de *H. pylori* mutadas en el gen *cag* no son capaces de inducir ninguna de estas actividades [10, 15, 30, 33].

Otro factor de virulencia importante es la proteína asociada a la citotoxina (CagA); esta proteína tiene una masa de aproximadamente 128-145 kDa y es codificada por el gen *cagA*, el cual es encontrado en un 60-70% de las cepas presentes en sujetos que viven en países desarrollados [15, 21, 31,].

El gen *cagA* está localizado en el extremo 3' de la PAI *cag*. Las cepas de *H. pylori* fueron divididas en *cagA* positivas y *cagA* negativas, usando a *cagA* como marcador de la PAI *cag*. Las cepas de *H. pylori cagA* positivas fueron asociadas con altos grados de inflamación gástrica y son más virulentas que las cepas *cagA* negativas [32]. Diversos estudios epidemiológicos mostraron que las cepas de *H. pylori cagA* positivas tienen una función importante en el desarrollo de gastritis atrófica, úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico [28, 32, 33].

La proteína CagA tanto fosforilada como no fosforilada altera las actividades de un gran número de factores celulares que están asociados con diferentes rutas de señalización celular. Por ejemplo, en la fosforilación, CagA inactiva a la cSrc-quinasa lo cual resulta en la defosforilación de otro sustrato de c-Src, la cortactina, la cual ya defosforilada se relocaliza en la célula y causa un rearrreglo en la actina asociado al fenotipo colibrí. Este fenotipo además de estar asociado con un rearrreglo en el citoesqueleto, involucra elongación celular y una motilidad celular incrementada. Adicionalmente, CagA interactúa con proteínas que contienen dominios de homología 2 (SH2), como la tirosina fosfatasa SHP2, la cual se considera responsable de la defosforilación de varias proteínas celulares. CagA también interactúa con el factor de crecimiento y dispersión de los hepatocitos (HGF/SF), el cual está involucrado en el crecimiento invasivo de las células tumorales [34]. Por otro lado, la translocación de CagA no fosforilada conduce a una disrupción en los complejos de uniones apicales en las células epiteliales polarizadas y en una pérdida de polaridad celular, alteraciones que previamente fue demostrado que tienen una participación en la carcinogénesis [35].

Un factor de virulencia muy importante en *H. pylori* es la citotoxina vacuolizante (VacA), una proteína de alto peso molecular formadora de poros que causa una vacuolización masiva en las células del epitelio gástrico. Debido a que el gen que codifica para esta citotoxina es en gran parte motivo de este estudio, este factor de virulencia será abordado de manera más profunda en la siguiente sección de este capítulo.

1.4 Citotoxina vacuolizante.

La citotoxina vacuolizante (VacA) fue descrita por primera vez por Leunk en 1988 [28, 36]. VacA es codificada por el gen *vacA* y aunque todas las cepas de *H. pylori* poseen dicho gen, la proteína es producida solo por aproximadamente el 50% de las cepas de *H. pylori* [7, 25, 28, 30, 37].

El gen *vacA* está presente en una sola copia en el cromosoma de *H. pylori*, tiene aproximadamente entre 3,864 y 3,993 nucleótidos y presenta 5 marcos abiertos de lectura (ORF); solo uno de ellos es capaz de codificar para la citotoxina [15, 36]. No existen homólogos de este gen en otras especies del género *Helicobacter* o en otras bacterias, lo cual sugiere su importancia en la relación específica de *H. pylori* con el estómago humano [20].

Atherton y cols. caracterizaron el gen *vacA* de 59 diferentes cepas de *H. pylori* y definieron la presencia de una estructura de mosaico [37]. El gen *vacA* es polimórfico y está dividido en dos familias de alelos, secuencia señal y región media; la secuencia señal se dividió en s1a, s1b, s2 y región media en m1 y m2 (Figura 1a) [15, 20, 36, 37].

Las cepas de *H. pylori* poseen distintos genotipos en base a la combinación de los alelos de secuencia señal (s) y región media (m) [15, 36, 37]. La región s de *vacA* codifica para el péptido señal y la región N-terminal de la citotoxina no procesada; la región m codifica parte del dominio de la citotoxina que se une a la célula epitelial

gástrica [20]. El tipo s1 de *vacA* es altamente activo, mientras que el tipo s2 codifica una extensión corta en la región N-terminal que bloquea la formación de vacuolas y atenúa la formación de poros en las membranas eucarióticas (Figura 1b) [20, 40]. El tipo m2 causa vacuolización en un intervalo de líneas celulares restringido, sugiriendo una interacción mediada por un receptor [36, 41].

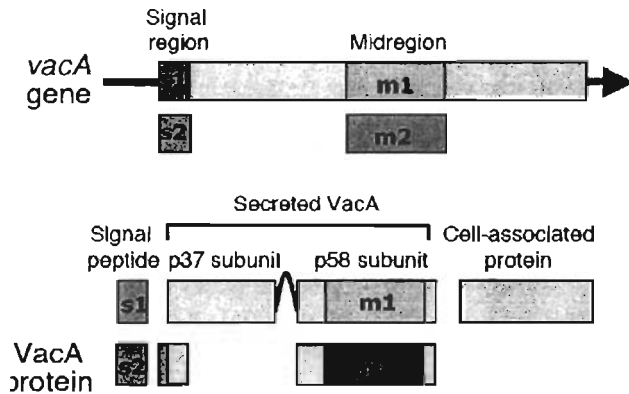


Figura 1. Gen *vacA* y proteína VacA. (a) Polimorfismo del gen *vacA*, (b) Esquema de la proteína VacA [20].

El gen *vacA* codifica para una protoxina de aproximadamente 140 kDa [15, 36, 38] formada por una secuencia señal N-terminal de 33 aminoácidos, la cual dirige la secreción del citoplasma al periplasma; una citotoxina de 87 a 95 kDa y un dominio C-terminal de 50 kDa que funciona como autotransportador para dirigir su exportación a través de la membrana externa [15, 31, 36, 38]. Tanto la secuencia señal N-terminal como el fragmento C-terminal son cortados proteolíticamente durante el proceso de secreción de la proteína y es exportada como toxina madura de 87 a 95 kDa (Figura 1b) [39].

La proteína VacA secretada está estructurada por dos distintas partes: a) una región amino-terminal de 37 kDa (subunidad p37) rica en hojas β -plegadas, que comienza con un segmento hidrofóbico con propensión a insertarse en las membranas y termina con un segmento sensible a proteasas (Figura 1b) [31, 36, 38, 39]. B) una subunidad de 58 kDa (p58) constituida por dos dominios, separados por un segmento flexible de longitud variable: el primer dominio es altamente conservado mientras que el segundo es considerado genéticamente diverso (Figura 1b) [31, 36, 38, 39].

Existen diversos estudios que muestran evidencia de que la unión de VacA a las células es mediada por secuencias de aminoácidos localizadas en la porción carboxi-terminal de la proteína madura, las cuales corresponden al dominio de la subunidad p58, aunque también fue demostrado que es necesaria la interacción entre ambas subunidades para la internalización y activación de la citotoxina [15, 36].

Por otro lado, se postuló que VacA se une a las células de manera inespecífica o mediante receptores específicos como un receptor proteico parecido al de la tirosina fosfatasa (RPTP- β) [20, 36, 38]; este receptor se encuentra ampliamente expresado en células de tejido nervioso y también fue demostrada su expresión en tejido gástrico [38]. La unión de VacA a RPTP- β se ha observado que aumenta significativamente la fosforilación en tirosina de los receptores acoplados a proteínas G [20, 38]. Además de la interacción de VacA con este receptor en específico, se ha mostrado que VacA se une a microdominios especializados de la membrana celular, los cuales son ricos en colesterol, esfingolípidos y proteínas ancladas a glicosil fosfatidil inositol (GPI-Aps). Sin

embargo, por diversos estudios fue demostrado que las GPI-APs son requeridas para la formación de canales activos de VacA en la membrana plasmática, pero no para la unión de la citotoxina a los microdominios especializados de la membrana celular [38].

La citotoxina vacuolizante madura está compuesta por 6 ó 7 monómeros organizados en forma de flor y con un centro de 30 nm de diámetro (Figura 2a) [15, 36, 39]. Cuando VacA es expuesta a un pH ácido o alcalino, los oligómeros de VacA se disocian y forman componentes monoméricos de alrededor de 90 kDa, cada uno de aproximadamente 6 a 14 nm [36, 38, 39]. Este desensamblaje dependiente de pH es asociado con un incremento marcado en la actividad citotóxica de VacA [15, 36, 39]; actualmente se sugiere que los oligómeros de VacA solubles en agua poseen actividad citotóxica relativamente pequeña comparada con la de los monómeros [36].

La citotoxina vacuolizante presenta varios efectos específicos que contribuyen a la persistencia de *H. pylori* en el nicho gástrico, tales como: formación de poros, formación de canales iónicos, vacuolización, incremento en la permeabilidad transcelular, apoptosis, inmunosupresión, y efectos sobre el citoesqueleto (Figura 3) [20].

La citotoxina vacuolizante lleva a cabo la formación de poros en la membrana de las células epiteliales, permitiendo la salida de aniones y de urea (Figura 3); esto es importante si se considera que la hidrólisis de la urea catalizada por la ureasa de *H. pylori* protege al microorganismo contra la acidez gástrica [20].

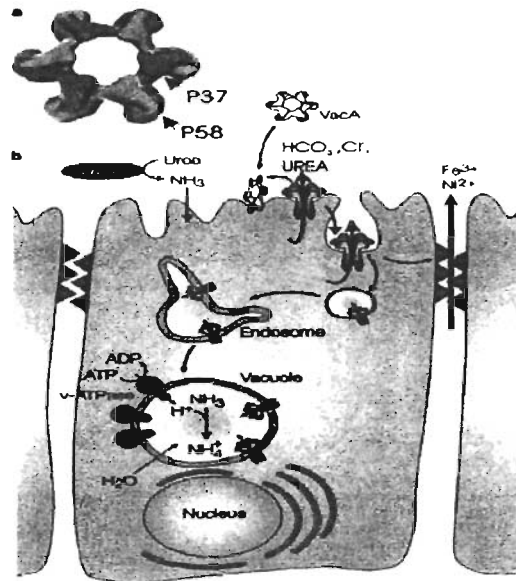


Figura 2. Citotoxina vacuolizante: estructura y actividad biológica. (a) Estructura oligomérica de VacA. (b) Modelo actual de las actividades celulares de VacA [31].

Por otro lado, VacA se une a la porción apical de las células epiteliales y se inserta en la membrana plasmática vía interacciones hidrofóbicas entre proteínas y lípidos [36, 39]. Esta inserción conduce a la formación de canales selectivos de aniones de baja conductancia, que son capaces de liberar bicarbonato, cloro y urea a partir del citosol celular. De esta manera, el bicarbonato y la urea entran a los ciclos del carbono y del nitrógeno de *H. pylori* (Figura 2b) [31, 39]. El canal creado por VacA es internalizado y cambia la permeabilidad a aniones de los compartimientos endosomales tardíos, con un aumento de la actividad de la ATPasa vacuolar (v-ATPasa) [31, 36, 38, 39]. En la presencia de bases débiles, en particular el amoníaco generado por la actividad de la ureasa de *H. pylori*, los iones acidotrópicos activos osmóticamente

(NH₄⁺) se acumulan en los endosomas (Figura 2b); esto conduce a la entrada de agua y al aumento de tamaño de las vesículas, un evento esencial en la formación de vacuolas [31, 36, 38, 39].

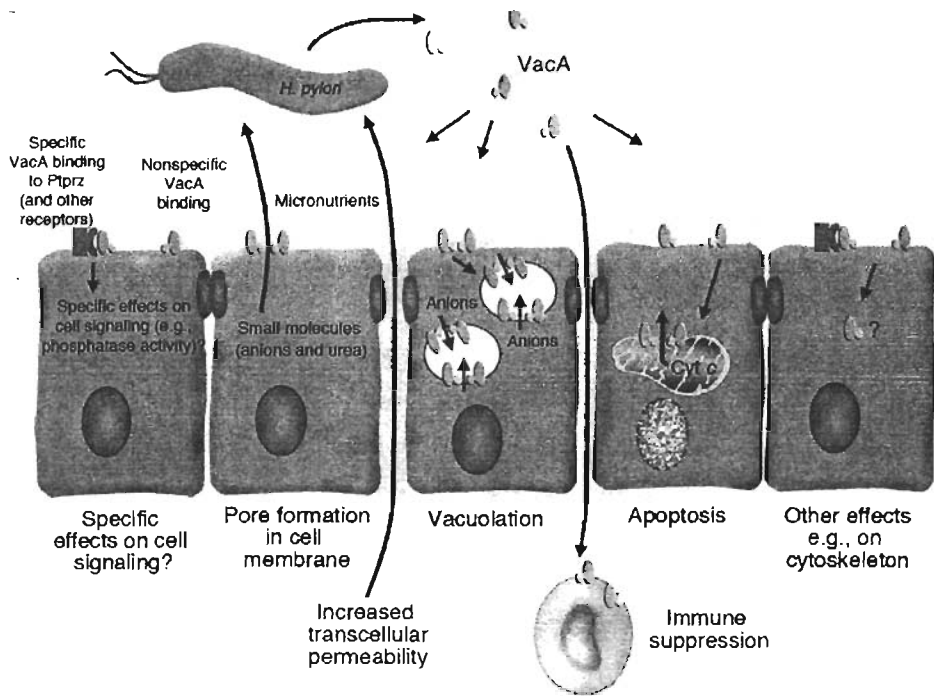


Figura 3. Actividades biológicas de la citotoxina vacuolizante [20].

En la generación de vacuolas inducidas por VacA se involucran dos pequeñas proteínas de unión a GTP: el regulador del tráfico membranal rab7 y la proteína asociada al citoesqueleto de actina Rac1 [15, 36, 38]. La vacuolización se ha observado que es inhibida en presencia de mutantes dominante negativas a rab7 o Rac1 y es potenciada por mutantes dominantes positivas. Estas observaciones sugieren que el

desarrollo de las vacuolas es regulado por eventos de fusión de membrana y por el citoesqueleto, apoyando así la formación de los compartimientos endosomales tardíos [36].

Con respecto al incremento en la permeabilidad transcelular, VacA induce el debilitamiento de las uniones estrechas epiteliales y permite que los nutrientes atraviesen la barrera mucosa y salgan al lumen gástrico donde se encuentra *H. pylori* para favorecer así su supervivencia (Figura 3) [15, 20]. VacA también es capaz de modificar la resistencia eléctrica transepitelial, con un incremento concomitante en el flujo de iones Fe^{3+} y Ni^{2+} y pequeños metabolitos de la mucosa hacia donde se encuentra *H. pylori* (Figura 2b) [31, 36, 38, 39].

En relación a la apoptosis, varios grupos reportaron la evidencia concluyente de que VacA fue capaz de inducir apoptosis en las células epiteliales en la ausencia de otros factores de virulencia de *H. pylori* [38]. Cover y cols en el 2003 demostraron claramente que la cepa de *H. pylori* silvestre (o su sobrenadante de cultivo) indujo apoptosis, mientras que las cepas mutantes isogénicas de VacA no activaron la apoptosis [38, 42]. VacA se ha postulado que induce apoptosis en parte por la formación de poros en las membranas mitocondriales, permitiendo la salida del citocromo C (Figura 3) y mediante la cascada de señalización de muerte celular dependiente de caspasa-3 [15, 20, 38, 42, 43]. Willhite y cols, en el 2003 encontraron que la vacuolización y la inducción de la liberación de citocromo C son resultados

independientes de la intoxicación por VacA y que ambos dependen de la internalización de VacA y de la formación de canales selectivos de aniones en la membrana [38].

Por otro lado, VacA inhibe el procesamiento de los péptidos antigénicos en las células B y su presentación a las células T CD⁴⁺. En un estudio, las células B tratadas con VacA mostraron una inhibición selectiva del procesamiento de antígeno y la presentación en la superficie por la ruta dependiente de la cadena invariante (Ii); esta ruta está asociada con la carga del péptido y la presentación a células T del antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II [38].

Hasta hace poco se desconocía tanto el efector bacteriano como la célula blanco para la inmunosupresión por *H. pylori*. Ahora las células T fueron identificadas como el blanco principal para la inmunosupresión inducida por VacA [44, 45, 46].

VacA inhibe la activación de las células T y su proliferación interfiriendo en la ruta de señalización del receptor de la célula T (TCR) [38]. En la estimulación de las células T vía TCR y CD28, son activadas dos rutas principales: la ruta dependiente de Ca²⁺ y la ruta de las MAP cinasas [proteínas activadoras de mitógenos]. La actividad de formación de canales anion-selectivos de VacA se especula que despolariza la membrana plasmática y previene la apertura del canal de Ca²⁺ activado por liberación de Ca²⁺ intracelular (CRAC) [38]. Alternativamente, VacA bloquea también la activación directamente por la calcineurina [38]. La inhibición de la calcineurina, un blanco importante de drogas inmunosupresoras, previene la defosforilación y translocación del

factor nuclear de células T activadas (NFAT) al núcleo [38]. Como resultado, no se inicia la transcripción de los genes de la interleucina 2 (IL-2) y la IL-2R α [44]; esta falta de señalización arresta el ciclo celular vía expresión de ciclinas y fosforilación de la proteína Rb. A bajas dosis, VacA inhibe la activación de células T al inducir una cascada de eventos de fosforilación que involucran un receptor aún no identificado (Vav) y una proteín-cinasa activada por mitógenos (MKK 3/6), cuyo resultado es el incremento de la forma activa p38. Vav induce el rearreglo de actina a través de la GTPasa Rac, lo cual conduce a la inhibición de la proliferación de las células T [45].

Además de la inmunosupresión se describió que VacA tiene efectos proinflamatorios, mediante la estimulación de la expresión de la enzima proinflamatoria ciclooxigenasa (COX)-2, no solo en las células T sino también en granulocitos y macrófagos [45]. También VacA se ha reportado que activa las células cebadas para producir citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6) [38].

VacA es capaz de causar daño celular directo *in vitro*, mediante cambios en el citoesqueleto (Figura 3) [20]. VacA interrumpe el ensamblaje de la fibra de actina, la organización de los microtúbulos, reduce la fosforilación de tirosina de la cinasa de adhesión focal (FAK) y su expresión en las adhesiones focales [47].

Por último, el gen *vacA* es polimórfico y puede presentar diversos alelos de región media y secuencia señal; en un estudio reciente se reportó que estos tipos alélicos

tienen una distribución geográfica particular [48]. En los pacientes del este de Asia predominaron las cepas *H. pylori* s1c, que son raras en otras partes del mundo; en Europa predominaron las cepas s1a y s1b y en América la mayoría de las cepas de *H. pylori* fueron s1b [48]. Con relación a la región media de *vacA*, en un estudio realizado en Alemania no se detectaron los alelos correspondientes a m1 y m2 y se determinó el nuevo tipo alélico m3. En Bélgica se mostró una nueva región media llamada m1a y en China las cepas de *H. pylori* fueron de tipo m1-m2 [15]. Actualmente la región señal de *vacA* es subtipificada en s1a, s1b y s1c y la región media en m1a, m1b, m1c y en m2a y m2b [15].

Los cultivos primarios compuestos por diversas cepas de *H. pylori* poseen distintas combinaciones de los alelos de región media y secuencia señal; de hecho hasta hace 6 años se reportaron todos los alelos excepto s2/m1 y en un estudio del Programa de Inmunología Molecular Microbiana en México se reportó una cepa de *H. pylori* con esta combinación de alelos [49]. De todas las combinaciones posibles de alelos, s1/m1 es la más citotóxica y es asociada al desarrollo de úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico [36].

1.5 Asociación entre la infección por *H. pylori* y el cáncer gástrico.

El cáncer gástrico es la segunda causa de muerte a nivel mundial y la décimo cuarta causa de muerte en general [25, 50]. En México, la tasa de mortalidad por cáncer gástrico es de 5.3/100 000 hombres y de 4.6/100 000 mujeres [51].

El cáncer gástrico presenta tasas de incidencia que varían de una región geográfica a otra [52, 53]; las tasas de incidencia en Japón, China, Colombia y Costa Rica son más altas que en Estados Unidos [50, 52, 53]. Con relación a esto, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) en el 2002 reportó distintas tasas de incidencia estandarizadas por edad tanto en hombres como en mujeres de acuerdo a la región geográfica (Figuras 4 y 5, respectivamente) [54].

En cuanto a la etiología del cáncer gástrico, se han definido los principales factores de riesgo para su desarrollo en base a diversos estudios epidemiológicos [55]. El mecanismo preciso para inducir el desarrollo de cáncer es desconocido; sin embargo, se postulan diversos candidatos para la inducción del cáncer tales como la infección por *H. pylori*, componentes de la respuesta inmune del hospedero y cofactores de la dieta como ingesta alta en sal y ascorbato disminuido [25, 55].

Con respecto a la infección por *H. pylori*, actualmente se considera como un factor de riesgo muy importante para el desarrollo de cáncer gástrico [25, 55]; este factor adquirió mayor impacto desde que en 1994 la IARC clasificó a *H. pylori* como carcinógeno en humanos [25, 50, 56].

Stomach, Males
Age-Standardized incidence rate per 100,000

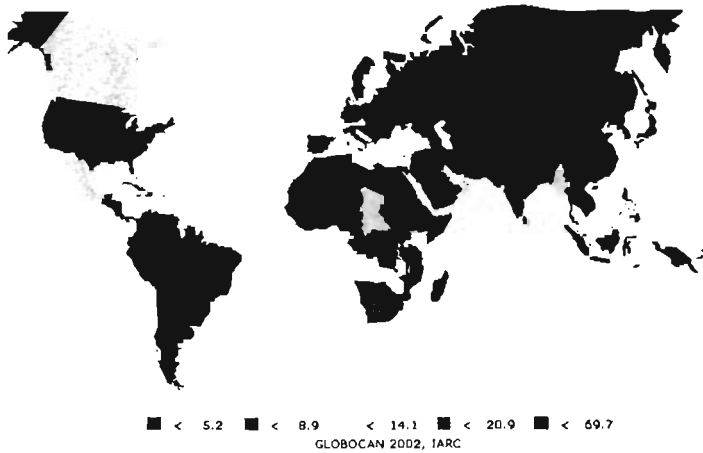


Figura 4. Tasas de incidencia de cáncer gástrico por cada 100 000 hombres estandarizadas por edad. [54]

Stomach, Females
Age-Standardized incidence rate per 100,000

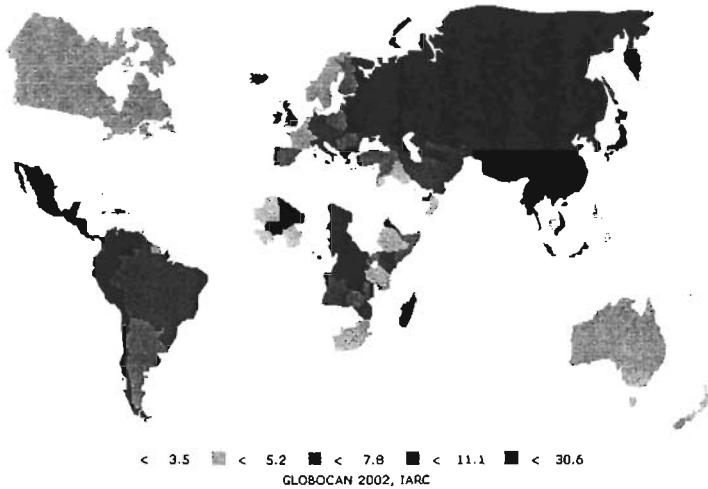


Figura 5. Tasas de incidencia de cáncer gástrico por cada 100 000 mujeres estandarizadas por edad [54]

Las razones específicas por las cuales se clasificó la infección por *H. pylori* como un carcinógeno humano fueron aportadas por tres estudios retrospectivos independientes [55]. En resumen, en los 1960s se reclutaron poblaciones de Hawaii, California y Gran Bretaña para la realización de estudios de cohorte. Las muestras de suero fueron preservadas mediante congelación y después de casi 20 años, algunos de los sujetos desarrollaron cáncer gástrico. A sus sueros (casos) se les detectó anticuerpos contra *H. pylori* y los resultados se compararon con los de los sujetos que no desarrollaron cáncer gástrico (controles). La magnitud en la respuesta inmune mediada por anticuerpos fue superior por lo que el riesgo relativo de los sujetos infectados fue significativamente mayor que el riesgo en los sujetos no infectados [55].

Por otro lado, en un reporte de metanálisis de 42 estudios realizado por Eslick y cols., mostró una razón de momios significativa entre *H. pylori* y el cáncer gástrico (OR= 2.04; CI 1.69-2.45). Subsecuentemente se demostró que *H. pylori* induce cambios en la mucosa gástrica y que éstos predisponen el desarrollo de adenocarcinoma en humanos [52].

Actualmente se sugiere que el número de casos nuevos de cáncer gástrico atribuido a *H. pylori* es de 337,800 y que éste representa el 42% aproximadamente del número total de cánceres a nivel mundial [57].

La respuesta progresiva de daño al tejido gástrico por efecto de la inflamación causada por *H. pylori* da como resultado una progresión a atrofia gástrica con cambios histológicos compatibles con metaplasia intestinal [58]. Los sujetos que desarrollan gastritis predominantemente antral, tienen un mayor riesgo de desarrollar úlceras duodenales, en cambio los sujetos que desarrollan gastritis predominante en cuerpo y gastritis atrófica multifocal tienen un mayor riesgo de desarrollar úlceras gástricas que progresan a metaplasia intestinal, displasia y adenocarcinoma gástrico [25].

El cáncer gástrico no-cardias se divide en adenocarcinoma tipo intestinal y cáncer gástrico tipo difuso, según la clasificación de Lauren [25, 50, 52].

El adenocarcinoma tipo intestinal forma estructuras glandulares y principalmente involucra el estómago distal. El desarrollo del adenocarcinoma tipo intestinal parece progresar a través de una transición que parte de una mucosa normal, por la presencia de *H. pylori* se induce la gastritis atrófica, que evoluciona a atrofia, surge la displasia y finalmente da lugar a metaplasia intestinal que puede progresar a adenocarcinoma [25, 50]. Este tipo de adenocarcinoma tiene predilección por personas mayores, de bajo nivel socioeconómico y tiene una relación de hombres y mujeres 2:1 [25, 50, 52].

El cáncer gástrico tipo difuso presenta células neoplásicas individuales infiltrando la mucosa gástrica, sin formar estructuras glandulares. Este tipo de cáncer no tiene asociación con atrofia o metaplasia intestinal ni presenta progresión por eventos como

el adenocarcinoma tipo intestinal. Se presenta a una edad más joven, afecta a hombres y mujeres por igual y existe un fuerte componente genético asociado a dicho cáncer [25, 50, 52].

Una de las clasificaciones más empleadas para el adenocarcinoma gástrico es la clasificación TGM, la cual se basa en el desarrollo del tumor primario (T), en la afección ganglionar (G) y en la metástasis a distancia (M). La determinación de la etapa o estadio en el cual se encuentra el adenocarcinoma gástrico se basa en la clasificación TGM y da lugar a los estadios I, II, III y IV [59].

Con relación a la asociación entre la infección por *H. pylori* y el cáncer gástrico, existen diversos estudios, la mayoría de los cuales están enfocados a la determinación de factores de virulencia que probablemente estén involucrados en el desarrollo del cáncer. Dentro de estos factores de virulencia destacan los genes *cagA* y *vacA* [25, 56, 60].

Con respecto al gen *vacA*, se ha intentado establecer la asociación entre sus diversos genotipos y el desarrollo de adenocarcinoma gástrico. Se conoce que de todas las combinaciones posibles de alelos, s1/m1 es la más citotóxica y ésta fue asociada al desarrollo de úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico [36].

Recientemente se han realizado varios estudios para determinar los genotipos de región media y secuencia señal de *vacA* de *H. pylori* en sujetos con cáncer gástrico y otras entidades clínicas [60, 61, 62 ,63]; sin embargo, es importante mencionar que en dichos estudios solo se incluyeron sujetos pertenecientes a poblaciones orientales. Además en los estudios citados se han analizado diferentes zonas del estómago y solo en dos de éstos se estudiaron biopsias a 2 cm del tumor, encontrando que el genotipo s1a fue el que predominó en los sujetos con cáncer gástrico [62, 63]; sin embargo, se debe considerar que s1a es el genotipo prevalente en Asia [48], por lo que se debilita su asociación al cáncer gástrico.

Considerando lo mencionado, es ineludible la importancia de determinar los genotipos de *vacA* en biopsias de diversas zonas gástricas y del tumor de sujetos mexicanos con cáncer gástrico y sujetos dispépticos no ulcerosos.

2.- JUSTIFICACIÓN

Diferentes genotipos de *vacA* de *H. pylori* se han identificado en sujetos con diversas entidades clínicas; algunos de los genotipos de *vacA* han sido asociados con el grado de daño e inflamación tisular.

La participación de *H. pylori* en el desarrollo del cáncer gástrico es controversial y se desconoce si existe alguna asociación entre los genotipos de *vacA* y su topografía en el estómago, así como con los diferentes estadios del cáncer.

3.- OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Determinar la prevalencia de *H. pylori* y la topografía de los genotipos de *vacA* en biopsias gástricas y cepas de *H. pylori* de sujetos con cáncer gástrico en diferentes estadios y sujetos dispépticos no ulcerosos.

3.2 Objetivos particulares.

- Determinar la positividad a *H. pylori* por cultivo y PCR en biopsias gástricas de sujetos con cáncer y compararla con la positividad obtenida en los sujetos dispépticos no ulcerosos.
- Establecer la asociación entre la topografía de *H. pylori* en biopsias gástricas de sujetos con cáncer gástrico y sus estadios.
- Determinar la topografía de los genotipos de *vacA* en biopsias gástricas de sujetos con cáncer y compararla con la topografía obtenida en los sujetos dispépticos no ulcerosos.
- Establecer la asociación entre la topografía de los genotipos de *vacA* en biopsias gástricas de sujetos con cáncer gástrico y sus estadios.

4.- METODOLOGÍA

4.1 Características del estudio

Los sujetos fueron reclutados en un estudio prospectivo, experimental, doble ciego, longitudinal y transversal de agosto de 2001 a mayo del 2004. El estudio se realizó dentro del Programa de Inmunología Molecular Microbiana en la Facultad de Medicina de la UNAM en colaboración con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ).

4.2 Población de estudio

La población de estudio estuvo comprendida por sujetos que ingresaron al servicio de endoscopia del INCMNSZ, en quienes se identificó una lesión compatible con cáncer gástrico (casos incidentes). Se consideró como grupo control a los sujetos con síndromes dispépticos no ulcerosos y sometidos a endoscopia para definir su diagnóstico. A todos los sujetos participantes de este estudio se les invitó y aceptaron de forma voluntaria. Además el protocolo fue aprobado por el Comité de ética del INCMNSZ.

4.3 Criterios de exclusión

Se excluyeron de este estudio a los sujetos que no autorizaron su participación, a sujetos sintomáticos o con diagnóstico de cáncer gástrico y que no se les realizó toma endoscópica de biopsia gástrica, sujetos que por cualquier razón no se les tomó biopsias

o no se completó el muestreo; sujetos que recibieron tratamiento contra *H. pylori* o que no eran vírgenes a tratamientos oncológicos. También se excluyeron aquellos sujetos con datos clínicos sugestivos de trastorno hemorragíparo, gastritis congestiva por hipertensión portal o ingesta de ácido acetilsalicílico en las últimas 72 horas antes de la toma de biopsias.

4.4 Muestreo sistemático de las biopsias gástricas

A todos los sujetos se les realizó un muestreo sistemático: se tomaron tres biopsias de cada una de los cuatro sitios anatómicos del estómago definidos como zonas predeterminadas (fondo, cuerpo, incisura angular y antro) de acuerdo con la clasificación de Sydney modificada [64], como se muestra en la Figura 6.

En aquellos pacientes donde se observó macroscópicamente una lesión compatible con cáncer gástrico (según la clasificación de Padova [65]), se les realizó la toma de biopsias del centro del tumor, de la periferia, de + 2cm y de + 5cm.

Zonas predeterminadas

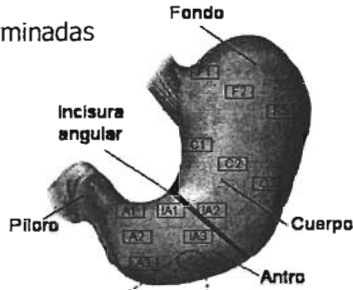
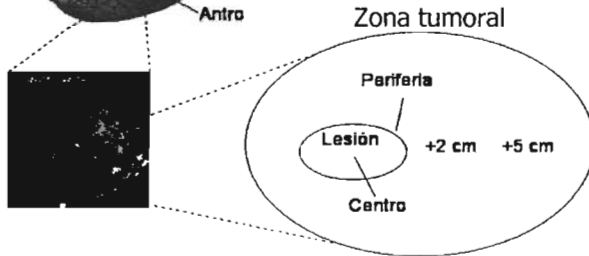
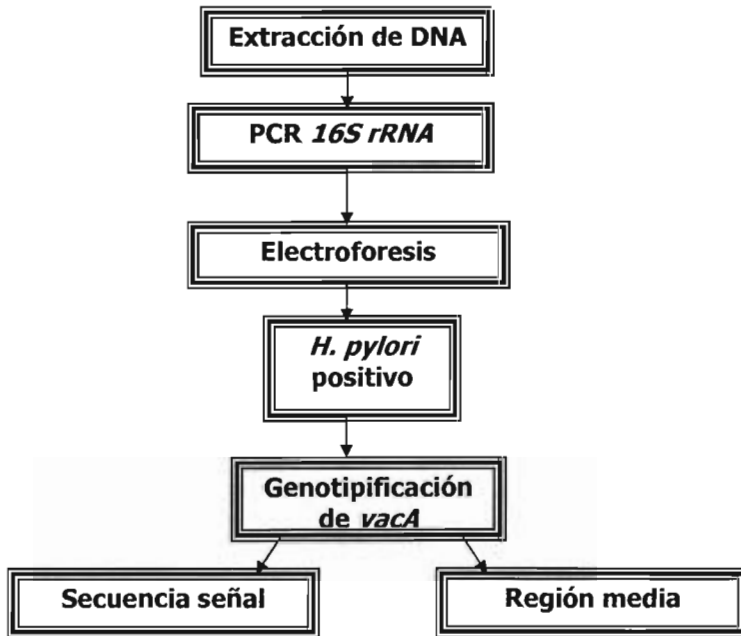


Figura 6. Muestreo sistemático del estómago.



4.5 Esquema general de trabajo



4.6 Cultivo microbiológico

El cultivo de *H. pylori* a partir de las biopsias gástricas fue realizado por el personal del Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina de la UNAM. Las cepas de *H. pylori* se almacenaron en caldo Brucella suplementado con 10% de suero fetal bovino y 15% de glicerol a -70°C [66].

4.7 Extracción de DNA de las biopsias gástricas y de las cepas de *H. pylori*.

4.7.1 Biopsias gástricas

El DNA cromosomal fue extraído de cada biopsia gástrica por el método de tiocianato de guanidina-EDTA-sarcosinato [67]. Brevemente, 500 μl de una solución de tiocianato de guanidina 5M, EDTA 0.1M y sarcosinato 0.5% (GES) se adicionaron a 100 μL del homogeneizado de la biopsia, se mezcló suavemente. Se agregó un volumen de 250 μl acetato de amonio 7.5 M y se mezcló. Se adicionaron 550 μL de cloroformo-alcohol isoamílico (1:24), mezclando por 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas por 15 min. a 16,000 X g. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se adicionó un volumen de isopropanol; se mezcló e incubó a -70°C mínimo 2 horas; posteriormente, se centrifugó por 5 min. El DNA precipitado se resuspendió dos veces con etanol al 70% y se secó por 10 min. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso.

4.7.2 Cepas de *H. pylori*

La extracción del DNA cromosomal de las cepas de *H. pylori* se realizó por el método de GeneClean (GeneClean III, Bio 101, Inc., La Joya, CA) de la siguiente manera: las suspensiones bacterianas fueron centrifugadas a 14,000 rpm/2 min. Para obtener el paquete bacteriano, se adicionó un volumen de 200 µL de solución de GES a cada muestra y se agitó suavemente; posteriormente se agregaron 20 µL de Glassmilk, los tubos se agitaron suavemente durante 30 min, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Después se adicionaron 500 µL de solución de lavado (New Wash) y se centrifugó nuevamente. Se adicionaron 15 µL de solución de elusión (agua calidad PCR), se incubaron las muestras a 56° C durante 5 min, se centrifugó a 14,000 rpm/1 min y se obtuvo el DNA disuelto en el sobrenadante; se repitió el procedimiento.

4.8 Detección de *H. pylori* en las biopsias gástricas por PCR.

La detección de *H. pylori* se llevó a cabo por la amplificación del gen *16S rRNA* por PCR semi-anidado [68]. La primera amplificación se realizó de la siguiente manera: cinco µl del templado de DNA se adicionaron a 20 µl de una mezcla de reacción para PCR que contenía: Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1.0 mM, 200 µM de cada uno de los deoxinucleótidos (Roche, Manheim, Alemania), 10 pmol de cada uno de los iniciadores Hp1 y Hp3 (Tabla 3) y 1U de *Taq* DNA polimerasa (Roche, Manheim, Alemania) [68].

La segunda amplificación se realizó de manera similar a la primera amplificación, sólo que para la segunda amplificación se utilizaron 24 µL de la mezcla de reacción para PCR anteriormente descrita; se emplearon en esta ocasión los iniciadores Hp1 y Hp2 (Tabla 3) y 1 µL del pPCR obtenido en la primera amplificación. Para cada ensayo de amplificación por PCR, se incluyó DNA de *H. pylori* 84-183, *H. pylori* ATCC 43504 y *H. pylori* 86-313 como controles positivos, DNA humano como control negativo y agua como control negativo de contaminación. La amplificación por PCR se realizó en un termociclador GeneAmp 9700 (PE, Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos a 94° C por 3 min, 60° C por 45 s y 72° C por 7 min. Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio a través del transiluminador con luz ultravioleta.

4.9 Caracterización genotípica de *vacA* de *H. pylori* en biopsias gástricas y cepas de *H. pylori* por PCR.

La caracterización genotípica de *vacA* se realizó por PCR [49]. Brevemente, se adicionó un volumen de 3 µl de DNA a 22 µl de una mezcla de reacción para PCR, que contenía: Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 200 µM de cada uno de los deoxinucleótidos (Roche, Manheim, Alemania), 20 pmol de cada uno de los iniciadores (Sigma, Genosys, México) y 1U de *Taq* DNA polimerasa (Roche, Manheim, Alemania).

La secuencia señal de *vacA* de cada cepa de *H. pylori* fue tipificada como s1a, s1b o s2 al realizar por separado 3 ensayos de PCR, en los cuales se utilizó un iniciador alelo-específico delantero diferente y un iniciador reverso común (Tabla 4). La región media de *vacA* fue tipificada como m1 o m2 realizando dos ensayos de PCR por separado, cada uno con dos iniciadores alelo-específicos (Tabla 4). Para cada ensayo de amplificación por PCR se utilizaron como controles positivos DNA de diversas cepas de *H. pylori* 84-183, ATCC 43504, 86-313, 88-22, 88-23 y como control negativo DNA humano, así como agua como control negativo de contaminación. Las condiciones de amplificación del DNA fueron 35 ciclos a 94° C por 4 min, 52° C por 1 min y 72° C por 7 min. Los productos de la amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%.

4.10 Análisis estadístico de los resultados.

Los resultados obtenidos de la detección de *H. pylori* en las biopsias gástricas de sujetos con cáncer gástrico y sujetos dispépticos no ulcerosos, tanto por cultivo como por PCR, se analizaron mediante prueba estadística de chi cuadrada. La topografía de los genotipos de *vacA* de *H. pylori* obtenida se analizó mediante la prueba estadística de ANOVA. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Tabla 3. Iniciadores utilizados para la detección de *H. pylori* por PCR [68].

Iniciadores	Secuencia (5' a 3')	Región de <i>16S rRNA</i> en referencia a <i>E. coli</i>
Hpl	CTG GAG AGA CTA AGC CCT CC	834-853
Hp2	ATT ACT GAC GCT GAT TGT GC	744-763
Hp3	AGG ATG AAG GTT TAA GGA TT	407-426

Tabla 4. Iniciadores utilizados para la genotipificación de *vacA* de *H. pylori* [37].

Región amplificada	Iniciadores	Secuencia del iniciador	Peso Molecular del producto de PCR
s1a	SS1-F	5' GTCAGCATCACACCGCAAC 3'	190 pb
	VA1-R	5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	
s1b	SS3-F	5' AGCGCCATACCGCAAGAG 3'	187 pb
	VA1-R	5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	
s2	SS2-F	5' GCTAACACGCCAAATGATCC 3'	199 pb
	VA1-R	5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	
m1	VA3-F	5' GGTCAAATGCGGTCATGG 3'	290 pb
	VA3-R	5' CCATTGGTACCTGTAGAAAC 3'	
m2	VA4-F	5' GGAGCCCCAGGAAACATTG 3'	352 pb
	VA4-R	5' CATAACTAGCGCCTTGAC 3'	

5.- RESULTADOS

5.1 Características de la población de estudio.

De los 30 sujetos incluidos en el estudio, el 53% (16/30) presentaron cáncer gástrico y el 47% restante (14/30) fueron sujetos dispépticos no ulcerosos. El intervalo de la edad de la población fue el siguiente: los casos presentaron una edad promedio de 57.6 años mientras que en los sujetos dispépticos no ulcerosos (DNU) fue de 49.1 años (Tabla 5).

Tabla 5. Edad promedio de los sujetos estudiados.

	Sujetos	
	Cáncer gástrico [n=16]	DNU [n=14]
Edad promedio \pm DE [años]	57.6 \pm 16.8	49.1 \pm 15.9

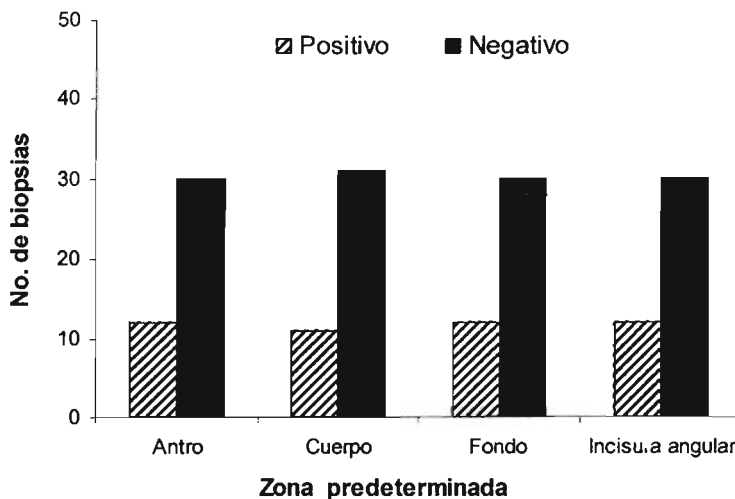
Los sujetos con cáncer gástrico se clasificaron en base a sus estadios; estadio 0-I: 3 casos, estadio II: 2, estadio III: 7 y estadio IV: 4.

5.2 Positividad a *H. pylori* por cultivo en los grupos estudiados.

5.2.1 Sujetos dispépticos no ulcerosos (controles).

La positividad a *H. pylori* por cultivo en las biopsias de zonas predeterminadas (antro, cuerpo, fondo e incisura angular) pertenecientes a los sujetos dispépticos no

ulcerosos, fue de un 28%. En la gráfica 1 se observa que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la positividad a *H. pylori* y las diferentes zonas predeterminadas de los sujetos dispépticos no ulcerosos ($p=1$).



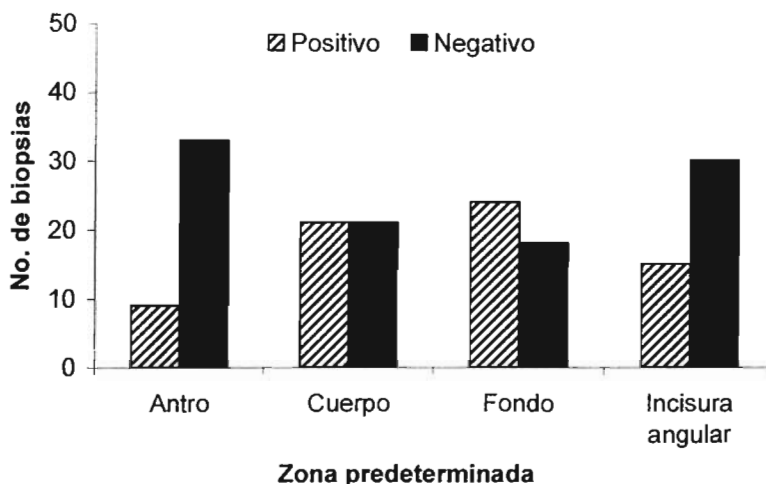
Gráfica 1: Positividad a *H. pylori* por cultivo en los sujetos dispépticos no ulcerosos

5.2.2 Sujetos con cáncer gástrico (casos).

5.2.2.1 Zonas predeterminadas

En las biopsias de zonas predeterminadas (antro, cuerpo, fondo e incisura angular) pertenecientes a los sujetos con cáncer gástrico, la positividad a *H. pylori* por cultivo fue de 40.4%. Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la

positividad a *H. pylori* por cultivo y las zonas predeterminadas de los sujetos con cáncer gástrico ($p=0.003$), observándose una mayor positividad en fondo y cuerpo (Gráfica 2).



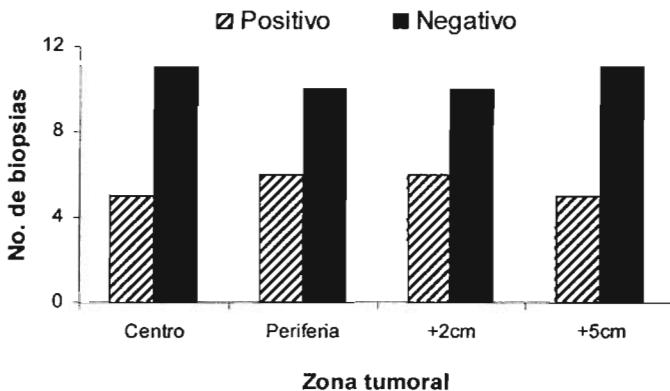
Gráfica 2: Positividad a *H. pylori* por cultivo en zonas predeterminadas de sujetos con cáncer gástrico

Al comparar la positividad a *H. pylori* obtenida por cultivo en los sujetos dispépticos no ulcerosos con la positividad en las zonas predeterminadas de los sujetos con cáncer gástrico, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.022$), encontrándose una mayor positividad a *H. pylori* por cultivo en los sujetos con cáncer gástrico que en los sujetos dispépticos no ulcerosos (40.4% vs 28%, respectivamente).

5.2.2.2 Zonas del tumor

En las biopsias de las zonas del tumor (centro del tumor, periferia, +2 cm y +5 cm) de los sujetos con cáncer gástrico se obtuvo una positividad a *H. pylori* por cultivo de

34.4%, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los valores de positividad correspondientes a cada una de las zonas del tumor estudiadas ($p=1$). En la gráfica 3 se observa que el número de biopsias positivas a *H. pylori* por cultivo es prácticamente igual en todas las zonas del tumor, no habiendo asociación entre la positividad a *H. pylori* por cultivo y las zonas del tumor en sujetos con cáncer gástrico.



Gráfica 3: Positividad a *H. pylori* por cultivo en zonas del tumor de sujetos con cáncer gástrico.

Al comparar la positividad a *H. pylori* obtenida por cultivo en las zonas predeterminadas de los sujetos con cáncer gástrico con la positividad a *H. pylori* obtenida en las zonas del tumor de los mismos sujetos, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.454$) por cultivo en las zonas predeterminadas y zonas del tumor (40.4% vs 34.4%, respectivamente).

5.2.3 Estadios del cáncer gástrico.

Para analizar los resultados de positividad a *H. pylori* por cultivo obtenidos en los sujetos con cáncer gástrico y su estadio, primero se recategorizaron los estadios como tempranos (0, I y II) y avanzados (III y IV) debido al número de sujetos estudiados.

La positividad a *H. pylori* por cultivo obtenida en los sujetos con cáncer gástrico en estadios tempranos fue de 25% mientras que en los sujetos con cáncer gástrico en estadios avanzados fue de 38.6% (Tabla 6), no encontrándose una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.4$).

Tabla 6. Positividad a *H. pylori* por cultivo considerando los estadios del cáncer gástrico

Estadio	Cultivo de <i>H. pylori</i>		Total biopsias por estadio
	Positivo	Negativo	
Temprano	5	15	20
%	25.00	75.00	100
Avanzado	17	27	44
%	38.64	61.36	100

$p=0.4$

Se analizó también la positividad a *H. pylori* obtenida por cultivo en las distintas zonas del tumor de los pacientes con cáncer gástrico y el estadio correspondiente del cáncer (Tablas 7 y 8).

Tabla 7. Positividad a *H. pylori* por cultivo en las zonas del tumor de sujetos con cáncer gástrico en estadios tempranos

Zona Tumoral	Cultivo de <i>H. pylori</i>		Biopsias por zona
	Positivo	Negativo	
Centro	1	4	5
Periferia	2	3	5
+ 2 cm	1	4	5
+ 5 cm	1	4	5
Total	5	15	20
%	25.00	75.00	100

p= 1

Tabla 8. Positividad a *H. pylori* por cultivo en las zonas del tumor de sujetos con cáncer gástrico en estadios avanzados

Zona Tumoral	Cultivo de <i>H. pylori</i>		Biopsias por zona
	Positivo	Negativo	
Centro	4	8	12
Periferia	4	8	12
+ 2 cm	5	7	12
+ 5 cm	4	8	12
Total	17	31	48
%	35.42	64.58	100

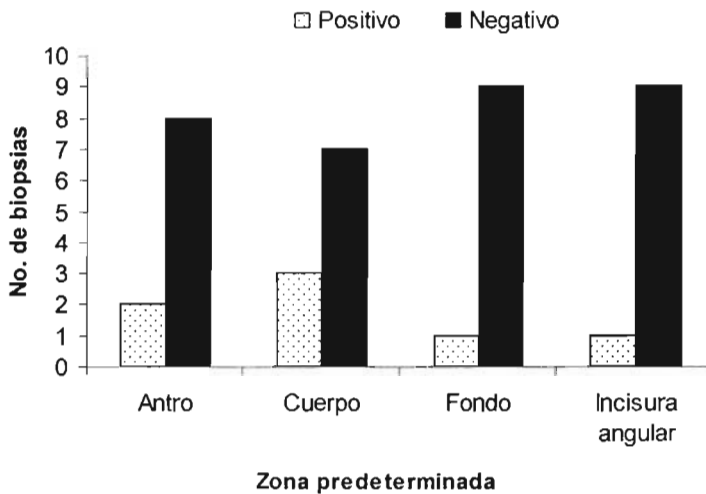
p= 1

No se encontró asociación entre la positividad a *H. pylori* obtenida por cultivo en las distintas zonas del tumor y el estadio del cáncer gástrico (p=1).

5.3 Positividad a *H. pylori* por PCR en los grupos estudiados.

5.3.1 Sujetos dispépticos no ulcerosos (controles)

Se obtuvo un 17.5% de positividad a *H. pylori* por amplificación del gen *16S rRNA* en las biopsias de zonas predeterminadas (antro, cuerpo, fondo e incisura angular) pertenecientes a los sujetos dispépticos no ulcerosos. En la gráfica 4 se observa que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la positividad a *H. pylori* y las diferentes zonas predeterminadas de los sujetos dispépticos no ulcerosos ($p=0.805$).

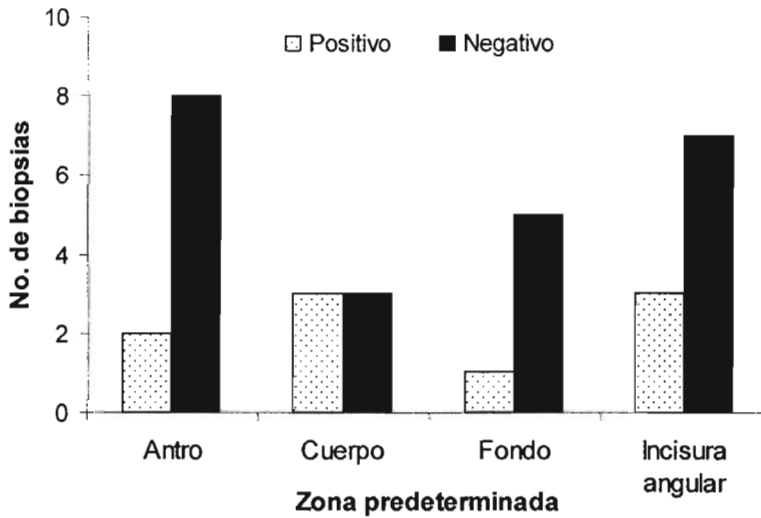


Gráfica 4: Positividad a *H. pylori* por PCR en los sujetos dispépticos no ulcerosos.

5.3.2 Sujetos con cáncer gástrico.

5.3.2.1 Zonas predeterminadas.

En las biopsias de zonas predeterminadas (antro, cuerpo, fondo e incisura angular) pertenecientes a los sujetos con cáncer gástrico, se obtuvo un 28.1% de positividad a *H. pylori* por PCR, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0.635$); esto se aprecia en la gráfica 5.



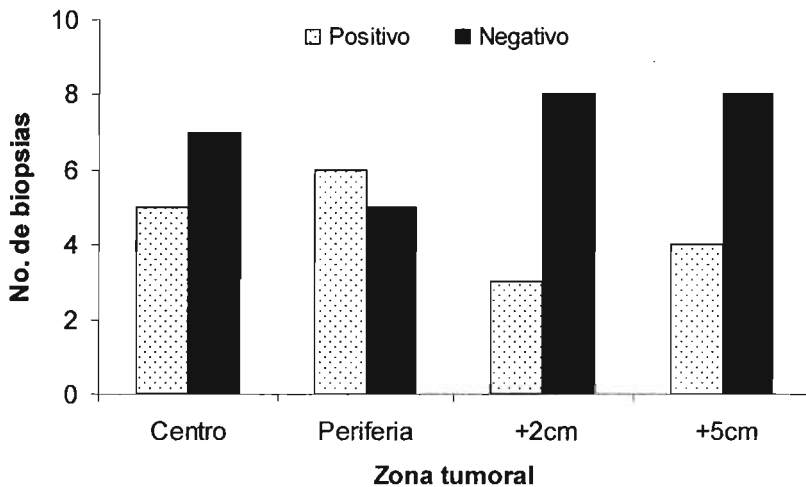
Gráfica 5: Positividad a *H. pylori* por PCR en zonas predeterminadas de sujetos con cáncer gástrico

No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.393$) al comparar la positividad de *H. pylori* obtenida por PCR en los sujetos dispépticos no ulcerosos con la

positividad a *H. pylori* obtenida por PCR en las zonas predeterminadas de los sujetos con cáncer gástrico (28.1% vs 17.5%, respectivamente).

5.3.2.2 Zonas del tumor.

En las biopsias de las zonas del tumor (centro de la lesión, periferia,+2 cm y +5 cm) de los sujetos con cáncer gástrico se obtuvo una positividad a *H. pylori* por PCR de 39.1%, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0.6$) entre los valores de positividad correspondientes a cada una de las zonas del tumor estudiadas (Gráfica 6).



Gráfica 6: Positividad a *H. pylori* por PCR en zonas del tumor de sujetos con cáncer gástrico

Al comparar la positividad a *H. pylori* obtenida por PCR en las zonas predeterminadas de los sujetos con cáncer gástrico con la positividad a *H. pylori* obtenida en las zonas del tumor de los mismos sujetos, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.344$) entre los valores de positividad a *H. pylori* obtenidos por PCR en zonas predeterminadas y en zonas del tumor (28.1% vs 39.1%, respectivamente).

5.3.3 Estadios del cáncer gástrico.

La positividad a *H. pylori* por PCR obtenida en los sujetos con cáncer gástrico en estadios tempranos fue de 40% mientras que en los sujetos con cáncer gástrico en estadios avanzados fue de 38.7% (Tabla 9), no encontrándose una diferencia estadísticamente significativa ($p=1$) entre los estadios.

Tabla 9. Positividad a *H. pylori* por PCR considerando los estadios del cáncer gástrico

Estadio	PCR del gen <i>16S rRNA H. pylori</i>		Total biopsias por estadio
	Positivo	Negativo	
Temprano	6	9	15
%	40.00	60.00	100
Avanzado	12	19	31
%	38.71	61.29	100

p=1.0

5.4 Topografía de los genotipos de la secuencia señal de *vacA* de *H. pylori* en los grupos estudiados.

5.4.1 Sujetos dispépticos no ulcerosos (controles)

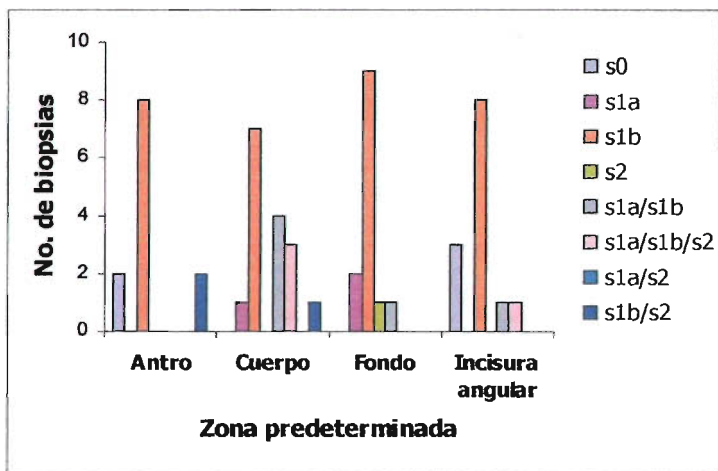
En la tabla 10 se observa que el genotipo de la secuencia señal de *vacA* predominante en los sujetos dispépticos no ulcerosos fue s1b con un 59.3%, seguido de la combinación s1a/s1b (11.1%) y de s1a/s1b/s2 (7.41%), encontrándose una significancia limítrofe ($p=0.057$) al comparar los porcentajes obtenidos para cada uno de los genotipos en las distintas zonas predeterminadas de los sujetos dispépticos no ulcerosos.

Tabla 10. Topografía de los genotipos de secuencia señal de *vacA* de *H. pylori* en los sujetos dispépticos no ulcerosos.

Zona predeterminada	s0	s1a	s1b	s2	s1a/s1b	s1a/s1b/s2	s1a/s2	s1b/s2	Biopsias por zona
Antro	2	0	8	0	0	0	0	2	12
Cuerpo	0	1	7	0	4	3	0	1	16
Fondo	0	2	9	1	1	0	0	0	13
Incisura angular	3	0	8	0	1	1	0	0	13
Total	5	3	32	1	6	4	0	3	54
%	9.26	5.56	59.26	1.85	11.11	7.41	0.00	5.56	100

p=0.057

En la gráfica 7 se aprecia el predominio del genotipo s1b en todas las zonas predeterminadas; además se observa que la zona predeterminada cuerpo es la que presenta una mayor diversidad de genotipos de secuencia señal de *vacA*.



Gráfica 7: Distribución de los genotipos de la secuencia señal de *vacA* de *H. pylori* en los sujetos dispépticos no ulcerosos.

5.4.2 Sujetos con cáncer gástrico.

5.4.2.1 Zonas predeterminadas

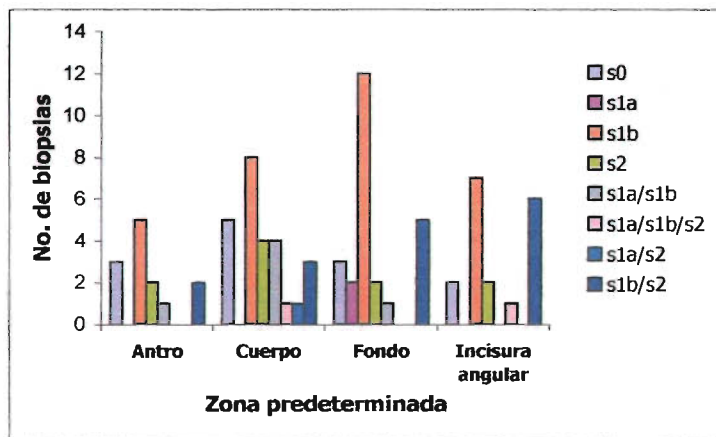
En los sujetos con cáncer gástrico el genotipo de secuencia señal de *vacA* que predominó en las zonas predeterminadas (antro, cuerpo, fondo e incisura angular) fue también s1b, seguido de la combinación s1b/s2 y de s2; cabe mencionar que el porcentaje de cepas de *H. pylori* no genotificables (s0) fue de 15.9% (Tabla 11). No se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.77$) entre los distintos genotipos de la secuencia señal de *vacA* obtenidos en las zonas predeterminadas de los sujetos con cáncer gástrico.

Tabla 11. Topografía de los genotipos de secuencia señal (ss) de *vacA* de *H. pylori* en los sujetos con cáncer gástrico.

Zona predeterminada	s0	s1a	s1b	s2	s1a/s1b	s1a/s1b/s2	s1a/s2	s1b/s2	Biopsias por zona
Antro	3	0	5	2	1	0	0	2	13
Cuerpo	5	0	8	4	4	1	1	3	26
Fondo	3	2	12	2	1	0	0	5	25
Incisura angular	2	0	7	2	0	1	0	6	18
Total	13	2	32	10	6	2	1	16	82
%	15.85	2.44	39.02	12.20	7.32	2.44	1.22	19.51	100

$p=0.7671$

En la gráfica 8 se observa que el genotipo predominante fue s1b en las zonas predeterminadas de los sujetos con cáncer; también se aprecia que en dichos sujetos, el cuerpo es la zona predeterminada con una mayor diversidad de genotipos de secuencia señal de *vacA*.



Gráfica 8: Distribución de los genotipos de secuencia señal de *vacA* de *H. pylori* en los sujetos con cáncer gástrico.

Al comparar la distribución de los genotipos de secuencia señal de *vacA* de *H. pylori* en los sujetos dispépticos no ulcerosos (Tabla 10) con la distribución de los genotipos de secuencia señal de *vacA* de *H. pylori* en las zonas predeterminadas de los sujetos con cáncer gástrico (Tabla 11), se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.011$); esta diferencia está dada principalmente por los distintos porcentajes obtenidos de los genotipos s1b (59.3% en los sujetos dispépticos no ulcerosos vs 39% en sujetos con cáncer gástrico), s2 (1.9% vs 12.2%) y s1b/s2 (5.6% vs 19.5).

5.4.2.2. Zonas del tumor

Se observa que para las zonas del tumor de los sujetos con cáncer gástrico no existe un genotipo de secuencia señal de *vacA* predominante; sin embargo, destacan los genotipos s1b y s2, ambos con 19.4% y las combinaciones genotípicas s1a/s1b y s1b/s2, con un 16.7% en ambos casos (Tabla 12).

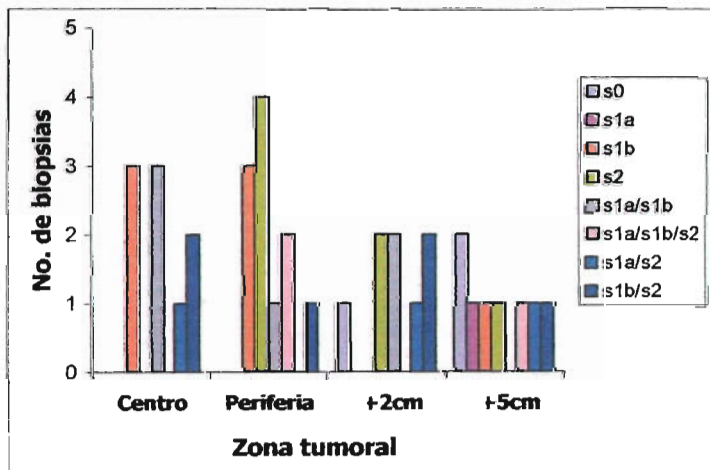
Al comparar los porcentajes de cada uno de los genotipos en las distintas zonas del tumor, no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.277$) entre los genotipos de la secuencia señal de *vacA* obtenidos en las distintas zonas del tumor de los sujetos con cáncer gástrico.

Tabla 12. Topografía de los genotipos de secuencia señal de *vacA* de *H. pylori* en las zonas del tumor de sujetos con cáncer gástrico.

Zona Tumoral	s0	s1a	s1b	s2	s1a/s1b	s1a/s1b/s2	s1a/s2	s1b/s2	Biopsias por zona
Centro	0	0	3	0	3	0	1	2	9
Periferia	0	0	3	4	1	2	0	1	11
+ 2 cm	1	0	0	2	2	0	1	2	8
+ 5 cm	2	1	1	1	0	1	1	1	8
Total	3	1	7	7	6	3	3	6	36
%	8.33	2.78	19.44	19.44	16.67	8.33	8.33	16.67	100

$p=0.2767$

En la gráfica 9 también se logra apreciar que no existe un genotipo que predomine en todas las zonas del tumor de los sujetos con cáncer gástrico y que existe una gran diversidad de genotipos en dichas zonas.



Gráfica 9: Distribución de los genotipos de secuencia señal de *vacA* de *H. pylori* en zonas del tumor de sujetos con cáncer gástrico.

Al comparar la distribución de los genotipos de secuencia señal de *vacA* de *H. pylori* obtenida en las zonas predeterminadas de los sujetos con cáncer gástrico (Tabla 11) con la distribución de los genotipos de secuencia señal de *vacA* de *H. pylori* obtenida en las zonas del tumor de los mismos sujetos (Tabla 12), se obtuvo una diferencia estadísticamente marginal ($p=0.056$). El valor de p se debe principalmente a las diferencias existentes entre los porcentajes de los genotipos s1b (39% en zonas predeterminadas de sujetos con cáncer gástrico vs 19.4% en zonas del tumor), s1a/s1b (7.3% vs 16.7) y s2 (12.2% vs 19.4%).

5.4.3 Estadios del cáncer gástrico.

Al comparar los genotipos de secuencia señal de *vacA* de *H. pylori* obtenidos en los sujetos con cáncer gástrico en estadio temprano con los obtenidos en sujetos con cáncer gástrico en estadio avanzado (Tabla 13), se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.017$).

Tabla 13. Genotipos de secuencia señal de *vacA* de *H.pylori* en sujetos con cáncer gástrico considerando los estadios del cáncer.

Estadio	s0	s1a	s1b	s2	s1a/s1b	s1a/s1b/s2	s1a/s2	s1b/s2	Total biopsias por estadio
Temprano	0	1	1	0	3	2	0	4	11
%	0.00	9.09	9.09	0.00	27.27	18.18	0.00	36.36	100
Avanzado	3	0	6	7	3	1	3	2	25
%	12.00	0.00	24.00	28.00	12.00	4.00	12.00	8.00	100

$p= 0.0165$

En la tabla 13 se observan las diferencias existentes entre los porcentajes de los genotipos s1b (9.1% en estadios tempranos vs 24% en estadios avanzados), s1a/s1b (27.3% vs 12%) y s1b/s2 (36.4% vs 8%).

5.5 Topografía de los genotipos de la región media de *vacA* en los grupos estudiados.

5.5.1 Dispépticos no ulcerosos (controles).

En la tabla 14 se observa que el genotipo de la región media de *vacA* predominante en los sujetos dispépticos no ulcerosos fue m1 con un 51.8%, seguido de m0 (cepas no genotificables) con un 32.1% y de la combinación m1/m2 con 10.71%.

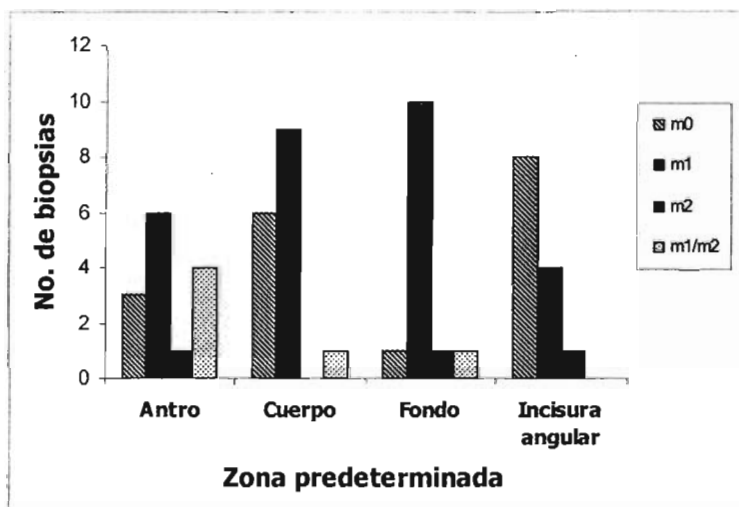
Al comparar los porcentajes obtenidos para cada uno de los genotipos en las distintas zonas predeterminadas se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.032$) entre los distintos genotipos de la secuencia señal de *vacA* obtenidos en los sujetos dispépticos no ulcerosos.

En la gráfica 10 también se observa el predominio del genotipo m1 en la mayoría de las zonas predeterminadas analizadas, con excepción de la incisura angular donde predominaron las cepas m0.

Tabla 14. Topografía de los genotipos de región media de *vacA* de *H. pylori* en las zonas predeterminadas de los sujetos dispépticos no ulcerosos.

Zona predeterminada	m0	m1	m2	m1/m2	Biopsias por zona
Antro	3	6	1	4	14
Cuerpo	6	9	0	1	16
Fondo	1	10	1	1	13
Incisura angular	8	4	1	0	13
Total	18	29	3	6	56
%	32.14	51.79	5.36	10.71	100

p=0.0321



Gráfica 10: Distribución de los genotipos de región media de *vacA* de *H. pylori* en los sujetos dispépticos no ulcerosos.

5.5.2. Sujetos con cáncer gástrico.

5.5.2.1 Zonas predeterminadas.

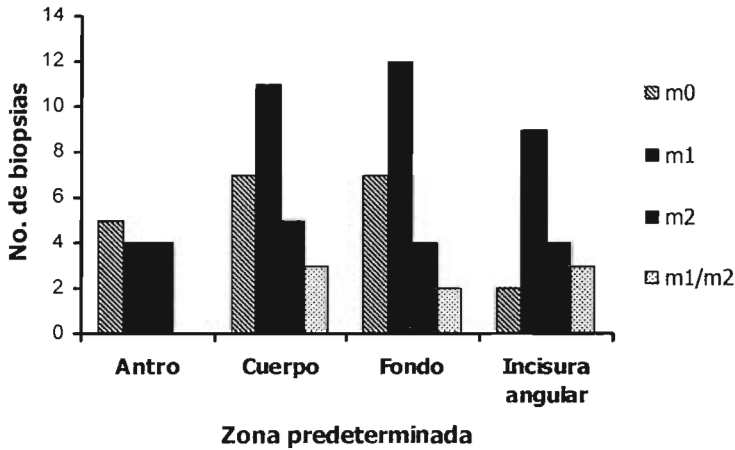
En los sujetos con cáncer gástrico el genotipo de región media de *vacA* que predominó en las zonas predeterminadas (antro, cuerpo, fondo e incisura angular) fue también m1, seguido de m0 y de m2 (Tabla 15), no encontrándose una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.71$) entre los distintos genotipos de la región media de *vacA* obtenidos en las zonas predeterminadas de los sujetos con cáncer gástrico.

Tabla 15. Topografía de los genotipos de región media de *vacA* de *H. pylori* en los sujetos con cáncer gástrico.

Zona predeterminada	m0	m1	m2	m1/m2	Biopsias por zona
Antro	5	4	4	0	13
Cuerpo	7	11	5	3	26
Fondo	7	12	4	2	25
Incisura angular	2	9	4	3	18
Total	21	36	17	8	82
%	25.61	43.90	20.73	9.76	100

$p=0.7105$

En la gráfica 11 se observa el predominio de m1 en la mayoría de las zonas predeterminadas estudiadas; solo en el antro predominan las cepas no genotificables (m0).



Gráfica 11: Distribución de los genotipos de región media de *vacA* de *H. pylori* en zonas predeterminadas de sujetos con cáncer gástrico.

Al comparar la distribución de los genotipos de región media de *vacA* de *H. pylori* en las zonas predeterminadas de los sujetos dispépticos no ulcerosos (Tabla 14) y de los sujetos con cáncer gástrico (Tabla 15), no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.082$) entre los dos grupos estudiados.

5.5.2.2 Zonas del tumor.

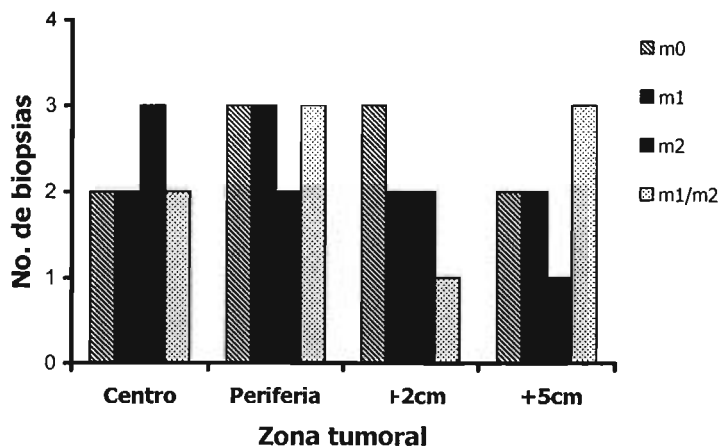
Se observa que en las zonas del tumor de los sujetos con cáncer gástrico no existe un genotipo de región media de *vacA* predominante; las cepas no genotificables (m0) fueron las que presentaron el más alto porcentaje (27.8%), seguidas de m1 y la combinación m1/m2, ambos con un 25% (Tabla 16). Al comparar los porcentajes de cada

uno de los genotipos en las distintas zonas del tumor, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.993$) entre los genotipos de la región media de *vacA*.

Tabla 16. Topografía de los genotipos de región media de *vacA* de *H. pylori* en las zonas del tumor de sujetos con cáncer gástrico.

Zona tumoral	m0	m1	m2	m1/m2	Biopsias por zona
Centro	2	2	3	2	9
Periferia	3	3	2	3	11
+ 2 cm	3	2	2	1	8
+ 5 cm	2	2	1	3	8
Total	10	9	8	9	36
%	27.78	25.00	22.22	25.00	100

$p=0.9929$



Gráfica 12: Distribución de los genotipos de región media de *vacA* de *H. pylori* en zonas del tumor de sujetos con cáncer gástrico.

En la gráfica 12 se observa que no hay predominio de un genotipo en particular en todas las zonas del tumor de los sujetos con cáncer gástrico y que la distribución de los genotipos de región media de *vacA* es similar en las cuatro zonas del tumor estudiadas.

Al comparar la distribución de los genotipos de región media de *vacA* de *H. pylori* obtenida en las zonas predeterminadas (Tabla 15) con la distribución en zonas del tumor (Tabla 16) en los sujetos con cáncer gástrico, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.097$).

5.5.3 Estadios del cáncer gástrico.

En cuanto a los genotipos de región media de *vacA* de *H. pylori* obtenidos en los sujetos con cáncer gástrico en estadio temprano, al compararlos con los obtenidos en sujetos con cáncer gástrico en estadio avanzado (Tabla 17), no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.363$).

Tabla 17. Genotipos de región media de *vacA* de *H.pylori* en sujetos con cáncer gástrico considerando los estadios del cáncer.

Estadio	m0	m1	m2	m1/m2	Total biopsias por estadio
Temprano	2	2	2	5	11
%	18.18	18.18	18.18	45.45	100
Avanzado	8	7	6	4	25
%	32.00	28.00	24.00	16.00	100

p= 0.3633

6.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La infección por *H. pylori* se ha asociado con la presencia de úlcera duodenal, úlcera gástrica y gastritis crónica activa. *H. pylori* se ha especulado que participa de forma importante en el desarrollo de cáncer gástrico, en parte, debido a la presencia de la citotoxina vacuolizante. En este estudio analizamos la topografía de *H. pylori* y los genotipos de *vacA* en sujetos con cáncer gástrico y sujetos dispépticos no ulcerosos.

La positividad a *H. pylori* por cultivo en los sujetos dispépticos no ulcerosos fue de 28%; este resultado concuerda con lo reportado en un estudio recientemente realizado en Singapur en el cual se analizaron sujetos dispépticos no ulcerosos y se obtuvo una positividad a *H. pylori* por cultivo de 29% [61]. En nuestro estudio al igual que en el realizado en Singapur, se realizó un muestreo sistemático de *H. pylori*, para evitar falsos negativos por un error de muestreo, ya que se consideraba que *H. pylori* era capaz de colonizar la mucosa gástrica en forma de parches; sin embargo esto ha sido descartado por varios estudios que demostraron lo contrario, ya que mostraron que la colonización por *H. pylori* fue uniforme.

En nuestro estudio al igual que en el estudio de Ho y cols. encontramos que *H. pylori* se distribuye en todo el estómago y no hay un sitio donde *H. pylori* colonice preferencialmente [61]; debido a esto, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de positividad a *H. pylori* por cultivo correspondientes a

cada una de las zonas predeterminadas estudiadas en los sujetos dispépticos no ulcerosos.

Con respecto a la positividad a *H. pylori* obtenida por cultivo en las zonas predeterminadas de los sujetos con cáncer gástrico, ésta fue de 40.4% mientras que en las biopsias que resultaron negativas a *H. pylori* por cultivo y sometidas a PCR fue de 28.1%; por lo tanto la positividad global a *H. pylori* en las zonas predeterminadas de dichos sujetos fue de 68.5%. En nuestro estudio la positividad a *H. pylori* por cultivo fue significativamente mayor en las zonas predeterminadas (fondo y cuerpo) de los sujetos con cáncer gástrico que en los sujetos dispépticos no ulcerosos y específicamente en el fondo del estómago de los sujetos con cáncer gástrico se presentó con mayor frecuencia; esto probablemente se deba a que el fondo es una zona próxima al cuerpo y se ha reportado que la gastritis inducida por *H. pylori* predominantemente en cuerpo está asociada a un incremento en el riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico [13, 20, 69]; sin embargo, los hallazgos en fondo aún no son del todo claros.

En cuanto a la positividad a *H. pylori* obtenida por cultivo en las zonas del tumor de los sujetos con cáncer gástrico, ésta fue de 34.4% y en las biopsias que resultaron negativas a *H. pylori* por cultivo y sometidas a PCR fue de 39.1%; por lo tanto la positividad global a *H. pylori* en la zona tumoral de los sujetos con cáncer gástrico fue de 73.5%; este porcentaje es superior al reportado en un estudio donde se analizaron tumores de sujetos con cáncer gástrico en diferentes estadios, ya que en dicho estudio

se obtuvo una positividad a *H. pylori* de 52.2% [70]; sin embargo, es importante considerar que en el estudio mencionado la positividad a *H. pylori* fue determinada solo por PCR. La alta positividad a *H. pylori* que se obtuvo en las zonas del tumor es controversial, ya que se ha considerado que *H. pylori* difícilmente podría desarrollarse en un epitelio gástrico con una lesión cancerígena, debido a que dicho epitelio ha sufrido cambios que se ha especulado que desfavorecerían el crecimiento de la bacteria [71]. No obstante, en varios estudios realizados *in vitro* para el desarrollo de las fases iniciales de la patogenia de la infección por *H. pylori*, con líneas celulares de cáncer gástrico como AGS Y KATO III, se demostró que *H. pylori* fue capaz de inducir daño celular letal mediante superóxido y la apoptosis [72]; esto sugiere que *H. pylori* podría persistir de esta manera también *in vivo*. Además se describió que la infección por *H. pylori* conduce a un incremento en la excreción de ácido gástrico y una disminución de ácido ascórbico en las glándulas gástricas, causando proliferación celular y daño crónico a la mucosa gástrica e induce también a largo plazo una respuesta inflamatoria tolerante que le permitiría sobrevivir en el epitelio gástrico [73] aún en presencia de lesiones cancerígenas, ya que éstas son tejido poco diferenciado y probablemente permisible para la adherencia, colonización y permanencia de *H. pylori*, más aun pareciera que los epitelios pocos diferenciados garantizan su presencia y permanencia, ya sea por una multicolonización o bien por la ausencia de una respuesta inmune. Con respecto a esto, se ha reportado que la presencia de la citotoxina vacuolizante facilita a *H. pylori* la colonización de la mucosa gástrica, ya que VacA inhibe la activación y proliferación de linfocitos T *in vitro* [74].

Por otro lado, las biopsias que resultaron cultivo negativo a *H. pylori* fueron sometidas a la amplificación del gen *16S rRNA* por PCR, ya que es un método más sensible [75, 76]; sin embargo, no se encontró asociación de la positividad a *H. pylori* por PCR con las zonas predeterminadas en los grupos estudiados, ni tampoco una diferencia estadísticamente significativa entre las zonas predeterminadas de los sujetos dispépticos no ulcerosos y las zonas predeterminadas de los sujetos con cáncer gástrico; así como tampoco se encontraron diferencias significativas entre las zonas predeterminadas y las zonas del tumor de los sujetos con cáncer gástrico, además de que la positividad a *H. pylori* resultó sin asociación a zonas del tumor, ni al estadio del cáncer gástrico en particular. Con respecto a esto, anteriormente se reportó que *H. pylori* no se observaba colonizando el epitelio metaplásico, ya que se consideraba que la mucosa ácida producida por las células epiteliales formaba un microambiente inhóspito para el microorganismo [13]; sin embargo, recientes estudios basados en casos donde *H. pylori* si se observó adherido a epitelio metaplásico de tipo incompleto [77, 78], han contradicho las observaciones reportadas y sustentan que la metaplasia incompleta representa un fenotipo híbrido en el cual todavía se expresan moléculas de superficie a las cuales *H. pylori* se adhiere; esto apoya nuestros resultados, ya que en nuestro estudio se observó que *H. pylori* colonizó de manera indistinta los tejidos diferenciados (zonas predeterminadas) y poco diferenciados (zonas del tumor).

Debido a que los genotipos de la secuencia señal y de la región media de *vacA* fueron determinados a partir de cultivos primarios, la presentación y discusión de los

resultados de ambas secuencias se realizó de manera individual. La diferencia en la frecuencia en que se encontraron estos distintos genotipos presentó una significancia marginal solo en los sujetos dispépticos no ulcerosos; además en la zona predeterminada de cuerpo se presentó la mayor diversidad de genotipos en sujetos con y sin cáncer gástrico, lo que aun queda poco claro y requiere realizarse estudios para entender el porque esta región es más permisible para *H. pylori*. Esta diversidad de genotipos encontrada en cuerpo ratifica los reportes previos con relación a que la población mexicana está coinfectada con múltiples cepas de *H. pylori* [49]. Con respecto a esto, se sabe que *H. pylori* produce gastritis predominantemente en antro o en cuerpo y que cuando la gastritis es predominantemente en cuerpo, el proceso inflamatorio suprime la producción de ácido por las células parietales y que la hipoclorhidria aumenta el riesgo de desarrollar úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico [20]. Por otro lado, el hecho de que haya una gran diversidad de genotipos se puede deber a que se sabe que las poblaciones de *H. pylori* son genéticamente diversas, y que aunque no se tienen buenos estimados de la tasa de mutación de *H. pylori* durante una colonización aguda o crónica, se ha propuesto que esta diversidad también refleja una falta de competencia directa entre la mayoría de las distintas cepas de *H. pylori*, aun cuando residan en diferentes personas dentro de la misma comunidad; además la diversidad podría verse acentuada por la amplia separación geográfica de las poblaciones en el mundo y por la correspondiente clonalidad o multiclonalidad de las cepas de *H. pylori* que portan dichas poblaciones [19].

Por otro lado, el genotipo s1b fue el que predominó en las zonas predeterminadas de ambos grupos de estudio. El hecho de que haya predominado el genotipo s1b en los sujetos dispépticos no ulcerosos coincide con lo reportado en un estudio previo realizado en México [49], en donde reportaron el predominio del mismo genotipo de secuencia señal de *vacA* en el grupo de dispepsia no ulcerosa. Esto apoya que quizás el genotipo s1b de *vacA* sea un marcador epidemiológico geográfico debido a su alta prevalencia en México y en América [48].

Un hallazgo importante en nuestro estudio fue demostrar la topografía de los genotipos de secuencia señal de *vacA*, la cual fue significativamente distinta en los sujetos dispépticos no ulcerosos y los sujetos con cáncer gástrico ($p=0.011$); siendo el genotipo s1b asociado a los sujetos sin cáncer, mientras que s2 y la combinación de s1b/s2 están asociados a los sujetos con cáncer, como fue reportado por Kidd y cols., en el estudio realizado en Sudáfrica [79]. Además, la diferencia en la frecuencia en que se encontraron los distintos genotipos en las zonas predeterminadas y las zonas del tumor de los sujetos con cáncer gástrico presentó una significancia marginal. Con respecto a los sujetos con cáncer gástrico, fue importante considerar que no existen estudios previos diseñados como el presente estudio para las cuatro zonas del tumor, sólo en un estudio realizado recientemente en Taiwan se determinaron los genotipos de *vacA* en la zona de + 2cm de la lesión [62]. En dicho estudio el genotipo predominante en los sujetos con cáncer gástrico fue s1a; sin embargo, se debe tomar en cuenta que en dicho estudio, a diferencia de éste, se utilizó una población de 167 pacientes con

cáncer gástrico, en Asia existe mayor prevalencia de casos de cáncer gástrico que en América, específicamente en México [12, 13] y que s1a es el genotipo prevalente en Asia por lo que se debilita su asociación al cáncer gástrico [48, 60]. No obstante, la asociación del genotipo s2 y de la combinación s1b/s2 a los sujetos con cáncer gástrico resulta controversial, debido a que el genotipo s1 y en especial s1a, es considerado el más citotóxico y fue asociado en diversos estudios al desarrollo de adenocarcinoma gástrico [36, 63].

La diversidad de los genotipos de *vacA* se ha intentado explicar mediante el establecimiento de diversos mecanismos de coevolución para las cepas de *H. pylori* y el hospedero. Uno de los más factibles es el que plantea que en infecciones naturales o mixtas, aparentemente predominan diversos genotipos en diferentes sitios. Se ha propuesto que el estómago está constituido por múltiples micronichos y que la bacteria que se encuentra en nichos individuales puede provenir de misma clona. De ser correcto esto, una posible consecuencia a largo plazo, de la aparición de variantes altamente agresivas de *H. pylori*, sería presencia de un estómago completamente inadecuado, y como resultado puede ocurrir la eliminación del microorganismo. Por otro lado, las variantes agresivas que permanecen en el micronicho, solo podrían destruir su habidad local (produciendo parches locales de metaplasia intestinal) y así disminuiría en numero sin directamente afectar las cepas menos virulentas que ocupan otros nichos gástricos [19].

Con relación a los estadios del cáncer, la topografía de los genotipos de la secuencia señal de *vacA* fue significativamente distinta en los sujetos con estadios tempranos y avanzados, asociándose las combinaciones s1a/s1b y s1b/s2 a los estadios tempranos y los genotipos s1b y s2 a los estadios avanzados. En cuanto a esto, el estudio realizado en Taiwan indagó la asociación entre los genotipos de *vacA* y el estadio del cáncer de los sujetos y reportó que en su población los genotipos obtenidos en los sujetos con cáncer gástrico en estadios tempranos, fueron similares a los de los sujetos con cáncer en estadios avanzados [62], no así en nuestro estudio, lo que sugiere que una vez que el tejido es poco diferenciado, *H. pylori* ya no cuenta con retos para persistir en el epitelio y empieza a expresarse con el genotipo menos tóxico, como lo observamos en nuestro resultados en los cuales detectamos una transición del genotipo s1a en los estadios tempranos por una combinación s1b/s2 en los estadios avanzados.

Con referencia a los genotipos de la región media de *vacA*, la diferencia en la frecuencia en que se encontraron los distintos genotipos fue significativa en los sujetos dispépticos no ulcerosos, no así en los sujetos con cáncer. El genotipo m1 se detectó en la mayoría de las zonas predeterminadas de ambos grupos; en el estudio realizado en México anteriormente mencionado [49], también se encontró el genotipo m1 para el grupo de dispepsia no ulcerosa, lo que indica que el genotipo de la región media no es un marcador de virulencia, y más bien parece comportarse como un marcador epidemiológico geográfico.

Por otro lado, las diferencias significativas fueron inexistentes en la topografía de los genotipos de región media de *vacA* en las zonas predeterminadas de los grupos estudiados y tampoco existieron diferencias significativas en la frecuencia en que se encontraron los distintos genotipos en las zonas predeterminadas y las zonas tumorales de los sujetos con cáncer gástrico; lo que sugiere que los genotipos de región media de *vacA* no participan en el desarrollo de adenocarcinoma gástrico. En relación a esto, no existen aún estudios previos en los cuales analicen las cuatro zonas del tumor, solo en un estudio realizado en Taiwan, se determinaron los genotipos de *vacA* en la zona de +2cm de la lesión, sin encontrar diferencias entre los genotipos m1 y m2 [62], lo que sugiere que la región media no participa en patogénesis en cáncer gástrico, al menos en esta población y es probable que esto suceda también en nuestra población. Con respecto a los estadios de cáncer gástrico, no se presentaron diferencias significativas en la distribución de los genotipos de la región media de *vacA* en los sujetos con estadios tempranos y avanzados de cáncer gástrico, lo cual apoya las observaciones previamente reportadas también en el estudio realizado por Lin y cols., donde los genotipos de la región media de *vacA* obtenidos en los sujetos con cáncer gástrico en estadios tempranos fueron similares a los de los sujetos con cáncer en estadios avanzados [62].

Finalmente, en nuestro estudio se encontró una alta frecuencia de cepas de *H. pylori* no tipificables tanto para secuencia señal y región media, en los sujetos con cáncer gástrico y en los sujetos dispépticos no ulcerosos. Esto es explicable debido a la

gran variación que presenta el gen *vacA* en estas regiones, como ya fue documentado anteriormente en otros estudios [49, 62].

La perspectiva de la presente investigación será determinar y caracterizar los alelos de *vacA* que en este estudio quedaron indefinidos y que podrían ser una pieza clave en el entendimiento de la patogénesis de tan relevante enfermedad con características de aguda a crónica por diferencia de décadas en el tiempo.

7.- CONCLUSIONES

- El porcentaje de *H. pylori* positivo en los sujetos con cáncer gástrico fue mayor que en los sujetos dispépticos no ulcerosos para zonas predeterminadas.
- La presencia de *H. pylori* por cultivo y PCR en la zona tumoral fue inesperada y requiere de estudios posteriores.
- Los genotipos s1b y m1 de *vacA* fueron mayoritarios en las zonas predeterminadas de ambos grupos.
- La zona predeterminada cuerpo fue la que presentó la mayor diversidad de genotipos de secuencia señal de *vacA* en ambos grupos.
- El genotipo s1b se asoció a los sujetos dispépticos no ulcerosos, mientras que s2 y la combinación de s1b/s2 fueron asociados a los sujetos con cáncer.
- Las combinaciones s1a/s1b y s1b/s2 fueron asociadas a los estadios tempranos y los genotipos s1b y s2 a los estadios avanzados de cáncer gástrico.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- 1) Pantoflickova D, A Blum. *Helicobacter pylori*: a historical overview. In: M Achtman, S Suerbaum. *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology. Horizon Scientific Press. Inglaterra. 2001. pp. 1-14.
- 2) Dunn BE, H Cohen, MJ Blaser. *Helicobacter pylori*. Clinical Microbiology Reviews 1997;10:720-741.
- 3) Uemura N, S Okamoto, S Yamamoto, *et al.* *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med 2001;345:784-789.
- 4) Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and related organisms. In G Mandell, J Bennett, R Dolin. Principles and Practice of infectious diseases. Ed. Churchill Livingstone. USA. 4th ed., vol. 2, 1995. pp. 1956-1964.
- 5) Ernst P, B Gold. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: The immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. Annu Rev Microbio 2000; 54:615-640.
- 6) Morales Espinosa R, G Castillo-Rojas, Y López-Vidal, *Helicobacter pylori* en: E. Martínez, J. Martínez. Microbios en línea. Editado por la Coordinación de la Investigación Científica, UNAM. 2001. pp. 199-219.
<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>
- 7) Marais A, G Mendz, S Hazell, F Megraud. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. Microbiology and molecular biology reviews 1999;63:642-674.

- 8)** Tomb JF, O White, AR Kerlavage, RA Clayton, GG Sutton *et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997;388:539-547.
- 9)** Alm RA, LL Ling, DT Moir, BL King, ED Brown *et al.* Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999;397:176-180.
- 10)** Covacci A, J Telford, G del Giudice, J Parsonnet, R Rappuoli. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999;284:1328-1333.
- 11)** Frenck R, J Clemens. *Helicobacter* in the developing world. *Microbes and Infection* 2003;5:705-713.
- 12)** Brown L. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiology Reviews* 2000;22:283-297.
- 13)** Smith V, R Genta. Role of *Helicobacter pylori* gastritis in gastric atrophy, intestinal metaplasia and gastric neoplasia. *Microscopy research and technique* 2000;48:313-320.
- 14)** Stone M. Transmission of *Helicobacter pylori*. *Posgrad Med Journal* 1999;75:198-200.
- 15)** Castillo-Rojas G, M Mazari-Hiriart, Y López-Vidal. *Helicobacter pylori*: focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud Pública de México* 2004;46:538-547.
- 16)** Mitchel H. Epidemiology of infection. In: H Mobley, G Mendz, S Hazell. *Helicobacter pylori*: physiology and genetics. ASM PRESS. Washington DC, USA. 2003. pp. 7-18.

- 17)** Feldman R, Epidemiologic observations and open questions about disease and infection caused by *Helicobacter pylori*. In: M Achtman, S Suerbaum, *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology. Horizon Scientific Press, Ingleterra. 2001. pp. 29-51.
- 18)** Konturek J. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *J Physiol Pharmacol* 2003;54(Suppl 3):23-41.
- 19)** Blaser MJ, DE Berg. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 2001;107:767-773.
- 20)** Blaser MJ, JC Atherton. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004;113:321-333.
- 21)** Höcker M, P Hohenberger. *Helicobacter pylori* virulence factors-one part of a big picture. *Lancet* 2003;362:1231-1233.
- 22)** Testerman T, D McGee, H Mobley. Adherence and colonization. In: H Mobley, G Mendz, S Hazell. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM PRESS. Washington DC, USA. 2003. pp. 381-417.
- 23)** Prinz C, N Hafsı, P Volland. *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends in Microbiology* 2003;11:134-138.
- 24)** Yoshiyama H, T Nakazawa. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes and infection* 2000;2:55-60.

- 25) Stoicov C, R Saffari, X Cai, C Hasyagar, J Houghton. Molecular biology of gastric cancer: *Helicobacter* infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. *Gene* 2004;341:1-17.
- 26) Spohn G, V Scarlato. Motility, Chemotaxis, and Flagella. In: H Mobley, G Mendz, S Hazell. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM PRESS. Washington DC, USA. 2003. pp. 239-247.
- 27) Mobley H. Urease. In: H Mobley, G Mendz, S Hazell. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM PRESS. Washington DC, USA. 2003. pp. 179-191.
- 28) Shimoyama T, JE Crabtree. Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1998;43(suppl 1):S2-S5.
- 29) Moran A. Molecular Structure, biosynthesis and pathogenic roles of lipopolisaccharides. In: H Mobley, G Mendz, S Hazell. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM PRESS. Washington DC, USA. 2003. pp. 81-95.
- 30) De Luca A, M De Falco, S Iaquinto, G Iaquinto. Effects of *Helicobacter pylori* infection on cell cycle progression and the expression of cell cycle regulatory proteins. *J Cell Physiol* 2004;200:334-342.
- 31) Montecucco C, R Rappuoli. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:457-466.
- 32) Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer* 2004;4:688-694.

- 33)** Stein M, R Rappuoli, A Covacci. The *cag* pathogenicity island. In: H Mobley, G Mendz, S Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM PRESS. Washington DC, USA. 2003. pp. 345-353.
- 34)** Cascales E, P Christie. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 2003;1:137-149.
- 35)** Peek R. Clandestine intracellular delivery of *Helicobacter pylori* CagA: guess who's coming to dinner?. *Gastroenterology* 2004;127:669-672.
- 36)** Atherton J, T Cover, E Papini, J Telford. Vacuolating Cytotoxin. In: H. Mobley, G. Mendz, S Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM PRESS, USA, 2003. pp. 97-110.
- 37)** Atherton J, P Cao, RM Peek, MK Tummuru, MJ Blaser *et al*. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995;270:17771-17777.
- 38)** Gebert B, W Fisher, R Haas. The *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: from cellular vacuolation to immunosuppressive activities. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004;152:205-220.
- 39)** Montecucco C, M de Bernard. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes and Infection* 2003;5:715-721.
- 40)** Letley DP, JL Rhead, RJ Twells, B Dove, JC Atherton. Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 2003;278:26734-26741.

- 41)** Pagliaccia C, M de Bernard, P Lupetti, X Ji, D Burroni, *et al.* The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:10212-10217.
- 42)** Boquet P, V Ricci, A Galmiche, NC Gauthier. Gastric cell apoptosis and *Helicobacter pylori*: has the main function of VacA finally been identified? Trends Microbiol 2003;11:410-413.
- 43)** Cho SJ, NS Kang, SY Park, BO Kim, DK Rhee, *et al.* Induction of apoptosis and expression of apoptosis related genes in human epithelial carcinoma cells by *Helicobacter pylori* VacA toxin. Toxicol 2003;42:601-611.
- 44)** Gebert B, W Fischer, E Weiss, R Hoffmann, R Haas. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. Science 2003;301:1099-1102.
- 45)** Boncristiano M, SR Paccani, S Barone, C Olivieri, L Patrussi, *et al.* The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. J Exp Med 2003;198:1887-1897.
- 46)** Montecucco C, de Bernard M. Immunosuppressive and proinflammatory activities of the VacA toxin of *Helicobacter pylori*. J Exp Med 2003;198:1767-1771.
- 47)** Pai R, TL Cover, AS Tarnawski. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin [VacA] disorganizes the cytoskeletal architecture of gastric epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1999;262:245-250.
- 48)** Van Doorn LJ, C Figueiredo, F Megraud, S Pena, P Midolo, *et al.* Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1999;116:823-830.

- 49)** Morales-Espinosa R, G Castillo-Rojas, G Gonzalez-Valencia, S Ponce de Leon, A Cravioto, *et al.* Colonization of Mexican Patients by Multiple *Helicobacter pylori* Strains with Different *vacA* and *cagA* Genotypes. *J Clin Microbiol* 1999;37:3001-3004.
- 50)** Kelley J, J Duggan. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol* 2003;56:1-9.
- 51)** Secretaría de Salud, Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2001. *Salud pública de México*. 2002; 44: 565-581.
- 52)** Dicken B, D Bigam, C Cass, J Mackey, A Joy, *etal.* Gastric adenocarcinoma. *Annals of Surgery* 2005;241:27-39.
- 53)** Stolte M, A Meining, *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *The Oncologist*. 1998;3;124-128.
- 54)** <http://www-depdb.iarc.fr/globocan/GLOBOframe.htm>
- 55)** Correa P. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:238s-241s.
- 56)** Asaka M, A Sepulveda, T Sugiyama, D Graham. Gastric Cancer. In: H Mobley, G Mendz, S Hazell. *Helicobacter pylori*: physiology and genetics. ASM PRESS. Washington DC, USA. 2003. pp. 481-498.
- 57)** Parkin D, P Pisani, J Ferlay. Global Cancer Statistics. *Cancer J Clin* 1999;49:33-64.
- 58)** Forman D, Webb P, Parsonnet J. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Lancet* 1994;343:243-244.

- 59)** Griffiths M, K Murray, P Russo, Oncología Básica: Fisiopatología, evaluación y tratamiento, Ed. Prensa Médica Mexicana, México, 1998, pp. 381-382.
- 60)** Yamaoka Y, T Kodama, O Gutierrez, J Kim, K Kashima, *et al.* Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA* and *vacA* status and clinical outcome: Studies in four different countries. J Clin Microbiol 1999;37:2274-2279.
- 61)** Ho Y, Ho Khek, Ascencio F, Bow Ho. Neither gastric topological distribution nor principle virulence genes of *Helicobacter pylori* contributes to clinical outcomes. World J Gastroenterol 2004;10:3274-3277.
- 62)** Lin H, C Perng, W Lo, C Wu, G Tseng, *et al.* *Helicobacter pylori* *cagA*, *iceA* and *vacA* genotypes in patients with gastric cancer in Taiwan. World J Gastroenterol 2004;10:2493-2497.
- 63)** Shimoyama T, Yoshimura T, Mikami T, Fukuda S, Crabtree JE, *et al.* Evaluation of *Helicobacter pylori* *vacA* genotype in Japanese patients with gastric cancer. J Clin Pathol 1998;51:299-301.
- 64)** Dixon MF, RM Genta, JH Yardley, P Correa. Classification and Grading of Gastritis. The Updated Sydney System. Am J Surgical Pathology 1996;20:1161-1181.
- 65)** Rugge M, P Correa, MF Dixon, T Hattori , G Leandro, *et al.* Gastric dysplasia: the Padova international classification. Am J Surgical Pathology 2000;24:167-176.
- 66)** Versalovic J, JG Fox. *Helicobacter*. In: PR Murray, EJ Barron, JH Jorgensen, MA Pfaller, RH Tenover. Manual of Clinical Microbiology. ASM PRESS, 8th Edition. Washington DC, USA. 2003. pp. 915-928.

- 67)** Pitcher DG, NA Saunders, RJ Owen. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidinium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 1989;8:151-156.
- 68)** Sheng-Ang Ho, JA Hoyle, FA Lewis, AD Secker, D Cross, *et al.* Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol* 1991;29:2543-2549.
- 69)** Hunt R. Will Eradication of *Helicobacter pylori* infection influence the risk of gastric cancer?. *Am J of Med* 2004;117:86S-91S.
- 70)** Van Grieken N, M Weiss, G Meijer, M Hermsen, G Scholte, *et al.* *Helicobacter pylori*-related and –non-related gastric cancers do not differ with respect to chromosomal aberrations. *J Pathol* 2000;192:301-306.
- 71)** Zhang C, N Yamada, Y Wun, M Wen, T Matsuhisa, *et al.* *Helicobacter pylori* infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11:791-796.
- 72)** Asaka M, A Sepulveda, T Sugiyama, D Graham. Gastric Cancer. In: H Mobley, G Mendz, S Hazell. *Helicobacter pylori*: physiology and genetics. ASM PRESS. Washington DC, USA. 2003. pp. 481-498.
- 73)** Tang Y, R Gan, B Dong, R Jiang, R Tang. Detection and location of *Helicobacter pylori* in human gastric carcinomas. *World J Gastroenterology* 2005;11:1387-1391.
- 74)** Cover T, S Blanke. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:320-332.

- 75)** Lage A, E Godfroid, A Fauconnier, A Burette, J Butzler, *etal.* Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol 1995;33:2752-2756.
- 76)** Kim D, Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection using polymerase chain reaction in gastric biopsy specimens. Gut 1997;41(s):A84-08/308.
- 77)** Genta RM. Recognizing atrophy: another step toward a classification of gastritis. Am J Surgical Pathology 1996;20:S23-S30.
- 78)** Ota H, T Katsuyama, S Nakajima, H el-Zimaity, JG Kim, *etal.* Intestinal metaplasia with adherent *Helicobacter pylori*: a hybrid epithelium with both gastric and intestinal features. Hum Pathol 1998;29:846-850.
- 79)** Kidd M, AJ Lastovica, JC Atherton, JA Louw. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes:association with gastroduodenal disease in South Africa?. Gut 1999;45:499-502.