



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TOPOGRAFIA DE *Helicobacter pylori* Y
EL GEN ASOCIADO A LA CITOTOXINA
(cagA) EN SUJETOS CON CÁNCER
GÁSTRICO Y DISPEPSIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICO BIOLOGICA

P R E S E N T A :

MARTÍNEZ DÍAZ ANA KARINA



MEXICO, D.F. EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

Septiembre 2005

m 347738



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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. Jesús Fernando Montiel Aguirre


Vocal: Prof. Luciano Hernández Gómez

Secretario: Profa. Yolanda López Vidal

1er. Suplente: Prof. Gonzalo Castillo Rojas

2do. Suplente: Prof. Ma. Benita Leonor Fernández Salgado

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


Ana Karina Martínez Díaz
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

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 sus consejos, tiempo y apoyo enfocados a la supervisión de la presente.

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 de estudio y por el análisis estadístico de los resultados de este estudio.

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

Durante la realización de la tesis gocé de una beca parcial otorgada por el proyecto de DGAPA IN207302.

DEDICATORIAS

Dios:

Eres lo que ha guiado mi vida desde que tengo uso de razón, eres la persona más grande que existe en mi vida, gracias por estar junto a mí en los momentos que más te necesitaba, porque a pesar de no ser la mejor hija, tu siempre has sido el mejor padre, sin ti y sin saberte presente en los momentos que flaqueaba y de soledad, nada habría logrado, Gracias por darme la oportunidad de vivir, por ser mi amigo, mi confidente, mi padre, mi todo.

A mis maestros y mi Universidad:

Quienes me enseñaron a ser la profesionista que hoy en día trato de ser, gracias al conocimiento que me proporcionaron pero sobre todo a los valores que me inculcaron.

A mi familia: Alberto, Luz y Fátima:

Agradezco ser parte de ustedes y el cariño tan profundo que cada uno me brinda.

Papi:

Aun recuerdo aquel primer día de clases, en el que me regañaste porque había obtenido un 6 de calificación, en ese momento solo comprendí que era malo, pero ahora, con el paso del tiempo y con cada una de las palabras que pronunciaste a lo largo de mi vida estudiantil, se que siempre deseaste que fuera la mejor, que querías hacerme saber que mi objetivo debería ser alcanzar lo máximo que se puede obtener en cada cosa que hagas en la vida.

Gracias por enseñarme a pensar en grande, por enseñarme que la vida no es fácil y que ante ello nunca debemos ponernos obstáculos, ya que ellos solo están en la mente de cada persona. Gracias por considerarme tu orgullo, te prometo que siempre trataré de serlo y de no defraudarte.

No tengo palabras para agradecerte todo el amor que me has brindado desde que supiste que iba a nacer.

Mami:

Te agradezco el que hayas sacrificado tus ilusiones, tu tiempo, tu superación personal, con la única finalidad de mantener unida la familia tan maravillosa de la cual formo parte y de que todos los integrantes restantes de esta familia lográramos nuestros objetivos.

Recuerdas que te prometí que esto era un reto y lo terminaría, aquí está, también es tuyo, pues sacrificamos mucho tiempo sin compartir vivencias, te podría decir que ello es lo que más me dolió cuando partí de Veracruz en busca de sueños; a pesar de eso, sabía que no estaba sola pues me presentaste a la persona más valiosa de mi vida: Dios.

Sabes bien que tu corazón tan grande es lo que más admiro de ti y lo que me ha hecho valorar la vida, sin ti, amiga, no sería quien ahora te escribe, aunque con muchos defectos, siempre

trato de ser una persona con valores. Gracias por siempre confiar en mí y saber quien es tu hija.

Hermanita:

8 años pasaron para que mis padres me dieran uno de los mejores regalos en la vida, tu nacimiento, nunca imagine que me hicieras tanta falta. Se que cuando yo me vine a lograr este objetivo, una de las personas que mas sufrió fuiste tu, perdón por haberte lastimado y gracias por demostrarme tanto amor como hasta ahora lo has hecho. Hoy te digo, que esto fue muy difícil, pero que deseo que ahora que tu te encuentras en esta situación sepas que aquí estoy y siempre estaré a tu lado; te digo que en ocasiones desearas salir corriendo pero cuando ello suceda, piensa que hay personas que esperamos mucho de ti. Te quiero nena y se que desde que eres pequeña me has tomado como ejemplo a seguir, tu también eres el mío, pues a pesar de tu corta edad en muchas ocasiones me has sorprendido por tu capacidad de amar y de dar soluciones a las cosas.

A mis Abuelitos: Adalberto, Teresa, Alberto y Juanita

Quienes son mis ejemplos de perseverancia, fortaleza, amor y responsabilidad.

Abuelito Beto:

No sabes cuanta falta me haces porque si por alguien conocí el cariño de un abuelo es por ti. Son tantas las cosas que te debo pues desde el haberme dado a una madre tan maravillosa, hasta considerarme como una hija. Escribo esto y se me vienen muchos recuerdos de ti. Eres mi ejemplo de perseverancia y mi orgullo. Abuelito, de mi corazón no has partido.

Abuelita Tere:

Gran parte de este logro tengo que agradecértelo a ti, pues me abriste las puertas de tu casa y me brindaste todo lo necesario para poder subsistir, con ello me refiero no solo a lo material sino también al amor y cuidados que me diste. Muchas ocasiones mencionas que los logros de tus nietos, son los de tus hijos, espero que este lo sientas tuyo porque así es.

Abuelita Juanita:

Se que lo que has vivido no ha sido fácil, ahora te entrego uno de los frutos que mi papá ha cortado, gracias a ti. Aun con esa vida tan dura que te tocó vivir, lograste hacer de el un buen hombre y por lo tanto ayudarme a mi a llegar a esto. Gracias.

A mis Tíos:

Quienes en la medida de sus posibilidades y de sus edades me han ayudado a ser quien soy:

Carmen y René:

A ustedes les agradezco el haberme brindado un hogar cuando llegué a esta ciudad, porque no solo me ofrecieron un apoyo económico sino también un cariño que hasta la fecha está presente.

David:

Se que cuando yo era un bebé y mis papás requerían dejarme algún tiempo para poder continuar con sus estudios, tu los apoyaste, por ello hoy te agradezco tus cuidados para conmigo.

Teresa:

Hay cosas que no se pueden retribuir, como el hecho de que a donde quiera que vayas me lleves contigo, pues se que siempre te acuerdas de mí. Te recuerdo en muchos momentos de mi vida, en la mayoría de los cuales yo anhelaba algo y tú lo conseguías: fiestas, regalos, etc. No dejes de quererme como lo haces, tqm tía.

Nora:

Te admiro por ser una mujer en toda la extensión de la palabra y quiero que sepas que en el momento que me necesites yo estaré ahí porque tu siempre has estado cuando te necesito.

Gabriela:

Gracias por secar mis lágrimas cuando lo requerí, por escucharme cuando lo necesité, por cuidarme cuando me enfermé, por brindarme apoyo en ciertos momentos en los que por la distancia a mi familia no podía recurrir a ellos.

Raúl:

Existen días en la vida, en los que a uno le duele mucho fracasar, como a mí me sucedió, sin embargo, tu estuviste ahí para hacerme dar cuenta de que eso son situaciones que se presentan en la vida pero que se debe observar alrededor para notar que hay otras cosas por las cuales preocuparse más.

Arturo:

Me da mucho gusto que estés presente en este momento como lo has estado en otros más. Te agradezco el cariño que me brindas.

Alejandro y Beti:

Los considero mis hermanos, yo aun no olvido que en mis juegos estaban presentes ustedes, que solo soñaba con que llegaran las vacaciones para estar en su casa; ahora las cosas son muy diferentes pues ciertas situaciones hacen que la vida de un giro y no sean las cosas como solían ser, sin embargo, a pesar de la distancia y del momento que cada uno de nosotros vive, quiero que sepan que en mi corazón siguen y que me siento muy feliz de poder compartir esto con ustedes.

A mis tíos: Sergio, Memo, Lupe, Rogelio, Julia

Muchas veces no es necesario tener a alguien junto a ti para saber que te quiere y lo quieres, eso es lo que sucede entre nosotros. Les agradezco la manera en que me quieren y su presencia en aquellos momentos en que los necesité.

A mis niños: Rafa, Marco, Montse, Moni, Teresita, Dani, Roberto, Ibrahim

Rafa:

Últimamente nos hemos unido mucho, espero que así perdure y que sepas que puedes contar conmigo. Se que algún día estaré leyendo tus dedicatorias pues tengo fe en ti y en que saldrás adelante, hazlo por ti pequeño, ya ves que la vida no es fácil.

Marquito:

Sabes que eres el hermanito pequeño que no tuve, desde que naciste, mi felicidad fue muy grande; ahora que ya vas al camino de responsabilidades mayores le pido a Dios te ayude en todo lo que sigue.

Montse:

Al fin se cumplió, ¿no crees? Ahora espero la tuya, ojala que no sea tan tardada como la mía. Nena sigue siendo quien hasta hoy eres, lucha por lo que quieres y por ser el orgullo de tus padres, te quiero.

Moni, Teresita, Dani e Ibra:

Su presencia ha enriquecido mis alegrías, Moni, eres una de las lucecitas de mi vida, te adoro chiquita.

A mis amigas Fabiola y Leonor:

Muy pocas somos las personas afortunadas en tener amigos verdaderos, yo soy una de ellas gracias a ustedes.

Fabiola:

Desde que te conozco me has brindado tu amistad incondicional, se que has estado ahí en todo momento, bueno y malo, no me arrepiento de haberme venido a estudiar pues gane muchas cosas, de las principales: tu amistad. Te quiero mucho amiga.

Leonor:

Finalmente lo logré, tu mejor que nadie sabes lo que esto significa: esfuerzos, tiempo, carencias, ¿te acuerdas? tantas cosas que le dedicamos, yo se que un día la vida y Dios nos los recompensará, ten fe porque todo aquí es justo. Gracias por formar parte de mi vida profesional, por ayudarme cuando lo necesité, por ser quien se quedaba hasta el final de las

clases conmigo, compartiendo conocimientos pero sobre todo vivencias. En el presente se que no solo éramos compañeras de clase pues con cada una de las situaciones que se han venido suscitando en nuestras vidas he podido percatarme de que eres mi amiga y que me aprecias tanto como yo te aprecio a ti. Deseo que nuestra amistad perdurará por siempre, tqm.

A mis amigos: Aaron, Allan, Elías, Carlos y Job

Contar con todos ustedes fue algo gratificante, ya que de una u otra forma estaban a mi lado apoyándome. Elías y Job, deseo que sepan que son mis mejores amigos, que nunca los olvidaré y que a pesar de que mis actitudes demuestren lo contrario, de corazón les digo: " son muy importantes para mí ". Gracias por brindarme su apoyo en todos los momentos que lo requerí.

A Jorge:

Gracias por creer en mí en esos momentos en los que ni yo creía que podía salir adelante en la carrera, pero sobre todo gracias por haberme enseñado a valorarme y no permitir que me lastimen.

A Gonzalo:

Cuya presencia, palabras y actitudes colaboraron en gran parte a que yo llegara a esta meta. Gracias por ser más que mi asesor.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología Molecular Microbiana:

Fue un placer compartir tiempo y espacio con ustedes; especialmente a Roxana, le quiero agradecer su mano amiga en aquellas ocasiones que la necesité

INDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	<i>iii</i>
DEDICATORIAS	<i>iv</i>
INDICE	<i>ix</i>
RESUMEN	<i>xi</i>
ABREVIATURAS	<i>xii</i>
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Características Microbiológicas de <i>H. pylori</i> .	1
1.2.- Características Genómicas.	3
1.3.- Epidemiología.	4
1.3.1.-Transmisión de la Infección con <i>H. pylori</i> .	6
1.3.2.-Asociación de la Infección por <i>H.</i> con el Desarrollo de Algunas Enfermedades.	8
1.4.- Factores de Virulencia.	8
1.5.- Cáncer Gástrico.	29
1.5.1.-Patología	30
1.5.2.- <i>H. pylori</i> y Cáncer Gástrico	31
2.- JUSTIFICACIÓN	34
3.- OBJETIVOS	35
3.1.- Objetivo General.	35
3.2.- Objetivos Particulares.	35
4.- METODOLOGÍA	36

4.1.- Población en Estudio.	36
4.2.- Criterios de Exclusión.	36
4.3.- Muestreo Endoscópico.	37
4.4.- Esquema General de Trabajo.	38
4.5.- Aislamiento de <i>H. pylori</i> .	38
4.6.- Extracción de DNA a partir de cepas de <i>H. pylori</i> .	39
4.7.- Extracción de DNA a partir de biopsias gástricas.	39
4.8.- Detección de <i>H. pylori</i> en las biopsias gástricas por PCR.	40
4.9.- Detección del gen <i>cagA</i> en aislamientos de <i>H. pylori</i> .	41
4.10.- Detección del gen <i>cagA</i> en biopsias gástricas.	41
4.11.- Análisis estadístico.	42
5.- RESULTADOS	44
5.1.- Población en Estudio.	44
5.2.- Frecuencia de positividad y topografía de <i>H. pylori</i> .	45
5.2.1.- Frecuencia de positividad y topografía de <i>H. pylori</i> por cultivo.	45
5.2.2.- Frecuencia de positividad y topografía de <i>H. pylori</i> por PCR-16S RNAr.	50
5.3.- Frecuencia de positividad y topografía del gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> .	53
6.- DISCUSIÓN	56
7.- CONCLUSIONES	68
8.- PERSPECTIVAS	69
9.- BIBLIOGRAFÍA	70

RESUMEN

H. pylori es una bacteria que infecta a más de la mitad de la población mundial, sin embargo a pesar de las altas tasas de infección, pocos desarrollan las enfermedades relacionadas: úlceras gástricas, linfoma tipo MALT y cáncer gástrico. Evidencias epidemiológicas han demostrado que existe una asociación entre la infección con *H. pylori* y el desarrollo de cáncer gástrico, pero aún se desconoce el modo en que pudiera estar causando carcinogénesis, por lo que se han estudiado diversos factores bacterianos, entre ellos el gen asociado a la citotoxina (*cagA*); con respecto a este se sabe que su presencia incrementa el riesgo para desarrollar cáncer gástrico y que altera ciertas vías de señalización celular.

Objetivo: Conocer la distribución topográfica de *H. pylori* y *cagA* en el estómago de sujetos con cáncer gástrico y dispepsia.

Metodología: Biopsias de fondo, cuerpo, incisura angular y antro fueron tomadas a sujetos con cáncer gástrico y dispepsia; a los sujetos con cáncer también se les tomaron biopsias de las regiones de centro, periferia, +2 y +5 cm de la lesión; tales biopsias gástricas se sometieron a cultivo microbiológico para *H. pylori* y en aquellos casos negativos, se realizó la amplificación del gen 16S *RNA*r de *H. pylori* por PCR; en las biopsias positivas a *H. pylori* así como en los aislamientos se detectó la presencia del gen *cagA* por PCR-Hibridación.

Resultados: *H. pylori* fue detectado en un porcentaje mayor de sujetos con cáncer gástrico, comparado con sujetos dispépticos; encontrándose preferencialmente en las regiones fondo y antro de sujetos con cáncer gástrico. Las prevalencias de *H. pylori* en sujetos con estadios tempranos y avanzados de cáncer gástrico no presentaron diferencias significativas. El gen *cagA* estuvo presente en aproximadamente un 70 % de las biopsias *H. pylori* positivas, siendo prácticamente igual dicho porcentaje en los grupos de estudio (cáncer gástrico y dispepsia), las diferentes regiones estudiadas y los sujetos con diferentes estadios de cáncer gástrico.

Conclusiones: Se encontró una mayor frecuencia de *H. pylori* en sujetos con cáncer gástrico que en sujetos con dispepsia, se encontró asociación en las regiones anatómicas del grupo de cáncer gástrico, no así en las regiones del tumor, ni con el estadio clínico. No se encontró asociación entre la presencia del gen *cagA* y el cuadro clínico. Esto indica que el desarrollo de cáncer gástrico es altamente complejo e involucra múltiples factores bacterianos, del huésped y ambientales.

ABREVIATURAS

<i>cagA</i>	Gen asociado a la citotoxina
CagA	Proteína asociada a la citotoxina
CO ₂	Dióxido de Carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>glr</i>	Gen de la glutamato racemasa
GES	Tiocinato de guanidina-EDTA-n-lauril sarcosinato
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IARC	Agencia internacional para la Investigación en Cáncer
IL-8	Interleucina 8
kDa	Kilodaltons
kb	Kilobases
LPS	Lipopolisacáridos
M	Molar
μl	Microlitros
mm	Micrómetros
NAP	Proteína Activadora de Neutrófilos
N ₂	Nitrógeno
O ₂	Oxígeno
ORFs	Marcos de lectura abiertos
PAI <i>cag</i>	Isla de Patogenicidad <i>cag</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
SFB	Suero fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSC	Solución salina de citratos
SSTIV	Sistema de secreción de proteínas tipo IV
VacA	Citotoxina vacuolizante
<i>vacA</i>	Gen de la citotoxina vacuolizante
UV	Luz ultravioleta

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es un microorganismo cuya presencia fue observada en biopsias gástricas humanas desde hace más de 100 años por W. Jaworski¹; sin embargo, a dichos hallazgos se les dio poca importancia hasta 1979, año en que fueron corroborados por Robin Warren cuando visualizó una bacteria curva sobre mucosa gástrica mediante exámenes histológicos. En 1982 R. Warren y B. J. Marshall lograron el cultivo de *H. pylori* y en 1984 encontraron una fuerte asociación entre la infección con *H. pylori* y la presencia de inflamación en mucosa gástrica²; derivado de estos hallazgos y con el conocimiento de que la gastritis superficial crónica esta asociada con el desarrollo de úlceras (gástricas y duodenales), cáncer gástrico y linfoma tipo MALT es ahora reconocido que la infección con *H. pylori* está relacionada con las entidades clínicas antes mencionadas³.

1.1.- Características Microbiológicas de *H. pylori*.

H. pylori es un bacilo gramnegativo en forma espiral o de S (1-3 curvaturas), de aproximadamente 0.5 μm de ancho x 5 μm de largo, posee flagelos lofótricos (2-6 flagelos) y es microaerofílico (5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂)⁴⁻⁶.

La morfología microscópica predominante del microorganismo es la forma espiral, sin embargo, se han observado formas cocoides en biopsias gástricas y en cultivos viejos⁷.

H. pylori requiere de medios de cultivo complejos con algún tipo de suplementación (sangre de carnero o caballo, suero de caballo, suero fetal bovino, emulsión de yema de huevo, etc). El agar Brucella y el agar Columbia son de los medios más empleados como base, mientras que la sangre de caballo a una concentración de 7-10% mejora las condiciones de crecimiento⁴. La temperatura óptima para el crecimiento de *H. pylori* es de 35 a 37° C y el tiempo requerido para la detección de cultivos positivos es de 3-5 días, siendo incluso en algunas ocasiones hasta de 7 días^{2, 8}.

H. pylori en medios de cultivo sólidos se observa como colonias pequeñas (apenas perceptibles) y no hemolíticas; en agar sangre de caballo lisada al 7% las colonias presentan una coloración que va de translúcida a amarillenta con un diámetro de 0.5 a 2 mm a diferencia de las colonias visualizadas en agar sangre, las cuales se observan desde translúcidas a gris pálido y su diámetro es de 0.5 a 1 mm⁴. Las colonias de *H. pylori* son oxidasa, catalasa y ureasa positivas, pruebas bioquímicas que son útiles para la identificación del microorganismo^{2, 8}.

1.2.- Características Genómicas.

La secuenciación del genoma de *H. pylori* fue realizada por primera vez en 1997, con la utilización de la cepa Hp 26695; posteriormente, en 1999 se llevó a cabo la secuenciación de la cepa J99, así como la comparación del genoma de ambas cepas ya secuenciadas, encontrándose que la similitud que existe entre los genomas de dichas cepas de *H. pylori* es muy grande^{9, 10}.

Las cepas Hp 26695 y J99 constan de un cromosoma circular de 1,667,867 y 1,643,831 pb, respectivamente. El contenido promedio de G+C es de 39%, estando presentes regiones con diferente contenido de G+C (5 regiones en la cepa Hp 26695 y 9 regiones en la cepa J99). En ambas cepas, las regiones 1 y 3 (33% G+C) contienen copias del elemento de inserción IS605, genes ribosomales (5S RNAr) y una repetición de 521 pb (denominada repetición 7); además de lo anterior, la región 1 contiene 2 ortólogos del gen *virB4/ptII*, el cual codifica en *Agrobacterium tumefaciens* para una proteína involucrada en la transferencia de DNA-T y en *Bordetella pertussis* para una proteína que participa en la secreción de la toxina. En la región 2 de la cepa Hp 26695 se encuentra presente la isla de patogenicidad *cag* (PAI *cag*), la cual está flanqueada por repeticiones directas de 31 pb, PAI *cag* codifica para 31 genes, dentro de los cuales se encuentran genes asociados con la inducción de interleucina 8 (IL-8) y el gen que codifica a la proteína asociada a la citotoxina (*cagA*)¹¹.

En la cepa *H. pylori* 26695 están presentes 1,590 marcos de lectura abiertos (ORFs), lo que representa el 91.0% del cromosoma mientras que solo 1,495 ORFs se encuentran presentes en la cepa J99, representando el 90.8% de su cromosoma. De acuerdo a Tomb y cols., 1,091 de los 1,590 ORFs presentes en la cepa 26695 tienen homología con genes de otros organismos (lo que permitió asignar papeles biológicos putativos a algunos de ellos); los 499 ORFs restantes son *H. pylori* específicos. Según Alm y cols. la cepa *H. pylori* 26695 posee 1,552 ORFs, de los cuales 1,185 tienen ortólogos en otras especies, 367 son *H. pylori* específicos y 69 son 26695 específicos¹¹.

1.3.- Epidemiología.

La infección con *H. pylori* es altamente prevalente ya que más del 50% de la población mundial (aproximadamente más de 3 billones de personas) se encuentra infectada³; sin embargo, la prevalencia de la infección varía dependiendo de diversos factores, tales como: área geográfica, edad, raza y estatus socioeconómico¹².

La prevalencia de la infección con *H. pylori* es más alta en países en vías de desarrollo que en países desarrollados, mientras en los primeros la prevalencia es de aproximadamente 80%, en los segundos es de entre 20 y 50%, en ambos casos a una edad aproximada de 60 años^{13, 14}.

Es probable que la adquisición de la infección con *H. pylori* ocurra principalmente en la niñez, se estima que en países con economías emergentes la incidencia de la infección en la población pediátrica es de entre 3 y 10% por año mientras que en países industrializados la tasa aproximada es de 1% por año⁷. La prevalencia de la infección con *H. pylori* en niños menores de 10 años que residen en países en vías de desarrollo es de 13-60% a diferencia de la presentada en niños que habitan en países desarrollados, la cual es de 0-5%; se ha observado que por arriba de los 10 años se da un incremento en prevalencia del orden de 0.5-2% por año¹⁵. Lo anterior confirma que la infección por *H. pylori* se presenta en edades más tempranas y con frecuencias mayores en los países en vías de desarrollo comparados con los países desarrollados¹⁶.

En países industrializados como en Norteamérica, Europa Occidental y Asia se ha observado que la prevalencia de la infección ha disminuido significativamente, no así en países en desarrollo¹⁶. Parece ser que las frecuencias mayores de infección con *H. pylori* en países en vías de desarrollo así como la disminución de tasa de infección en países desarrollados sean atribuibles a diferencias en nivel socioeconómico, reflejado en condiciones sanitarias y hacinamiento^{3, 12, 15}.

Se postula que el género no influye en las tasas de infección; sin embargo, existen reportes de que el sexo masculino presenta tasas de infección ligeramente mayores que las del sexo femenino^{2, 16-18}.

Existen ciertas poblaciones humanas, tales como las afroamericanas e hispanas, que presentan adquisición de la infección a edades menores de la vida y tasas de infección mayores comparadas con la población caucásica; lo cual sugiere la probable influencia que puede tener la raza sobre la infección con *H. pylori*^{17, 19}.

1.3.1.- Transmisión de la infección con *H. pylori*.

La fuente y el modo de transmisión de la infección con *H. pylori* son inciertos; entre las probables fuentes de infección se encuentran el agua, los gatos y las moscas^{7, 16}; acerca de la aceptación del agua como fuente de infección existen reportes controversiales, ya que mientras en estudios realizados en México, Perú, Bolivia y Colombia se observó una asociación entre la fuente de agua y el riesgo de infección, en China, Bangladesh y Corea no se encontró tal asociación; sumado a los hallazgos anteriores, se ha visto que el consumo de vegetales crudos está relacionado con una mayor probabilidad de infección por *H. pylori*, tal vez debido a que el agua de riego para estos vegetales se encuentre contaminada con la bacteria^{15, 16}.

El modo de transmisión más aceptado para la infección por *H. pylori* es el de persona a persona, estando sustentado por el hallazgo de alta prevalencia de infección en personas que mantienen un contacto estrecho, como sujetos que habitan en instituciones (de personas con retraso mental, orfanatos, etc.) e individuos integrantes de una misma familia^{2, 12, 15, 16}.

Las rutas de transmisión postuladas son 3: fecal-oral, oral-oral y gastro-oral^{15, 20}; la primera tiene como base la detección de *H. pylori* en heces pero es aun contradictoria por el hecho de que tal detección es en porcentaje bajo, sumado a ello, cuando la detección es por PCR se desconoce si la bacteria se encuentra en forma viable^{15, 16, 20}.

La ruta oral-oral se sustenta en que la bacteria se detectó por cultivo y PCR a partir de saliva y placa dental, además de que existen estudios epidemiológicos que apoyan esta ruta de transmisión, los cuales han mostrado que hábitos culturales como premasticación de alimentos (de madres a hijos), cubrir con saliva los pezones antes de amamantar y emplear palillos están asociados con un incremento en la prevalencia de la infección con *H. pylori*; entre los argumentos en contra de esta ruta se tiene el hecho de que dentistas no presentan un riesgo incrementado de infección^{15, 16, 20}.

La ruta gastro-oral fue propuesta debido a que *H. pylori* está presente en jugo gástrico y en vómito, además es considerada una ruta importante de transmisión en niños debido a que estos presentan comúnmente vómito y regurgitación^{15, 16, 20}.

1.3.2.- Asociación de la infección por *H. pylori* con el desarrollo de algunas enfermedades.

La colonización persistente de la mucosa gástrica por *H. pylori* (durante años, décadas o incluso toda la vida) desencadena gastritis crónica activa en prácticamente todos los sujetos infectados, de los cuales la mayoría no presentan sintomatología; dicha gastritis puede evolucionar en el 10 al 20% de los individuos a patologías más severas como úlceras gástricas y duodenales, adenocarcinoma gástrico y linfoma tipo MALT^{13, 21, 22}; sin embargo, a pesar de lo anterior existen hallazgos de que la presencia de *H. pylori* también puede tener una función de protección ante ciertas enfermedades, tales como reflujo gastroesofágico severo y sus secuelas (esófago de Barrett y adenocarcinoma de esófago). Probablemente la diferencia en consecuencia de la colonización por *H. pylori* sea por la participación de los factores bacterianos, ambientales y del hospedero^{23, 24}.

1.4.- Factores de virulencia.

Debido a la asociación de la infección de *H. pylori* con ciertas enfermedades y a lo relevante de estudiar y comprender el mecanismo por el cual la bacteria coloniza y persiste en el estómago, algunas investigaciones realizadas con respecto al microorganismo se han enfocado a la búsqueda y entendimiento de diversos factores de virulencia (Figura 1), entre los que destacan los siguientes:

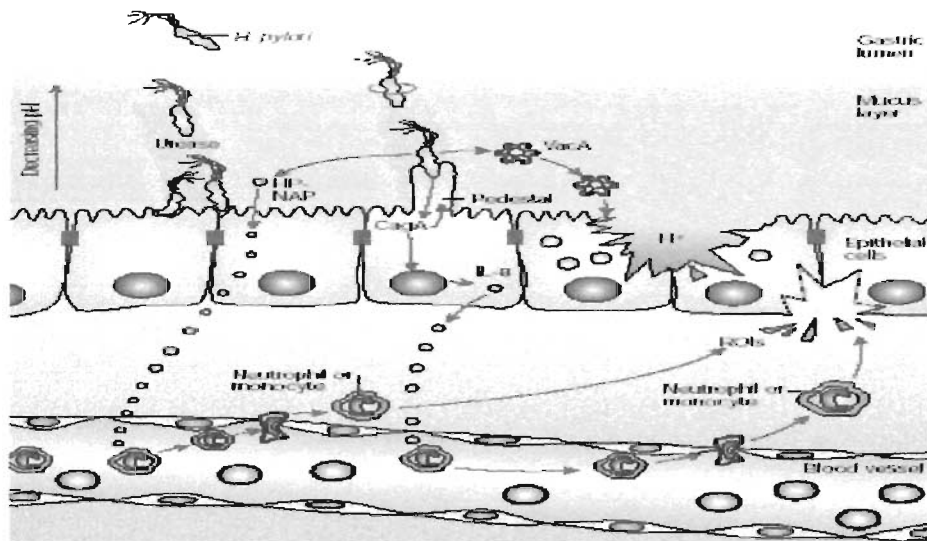


Figura 1. Principales factores de virulencia de *H. pylori*²⁶.

Flagelos: son estructuras proteicas que mediante sus movimientos en forma de hélice capacitan a *H. pylori* para penetrar la capa de moco que cubre el epitelio gástrico, con la finalidad de alcanzar el pH neutro localizado en la superficie del epitelio gastrointestinal. *H. pylori* posee de 2 a 6 flagelos lofótricos de aproximadamente 3 μm de largo, estos se encuentran cubiertos por una vaina, que es una extensión de la membrana externa con composición similar en lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas y cuya función se postula sea la de proteger a los flagelos ante el ácido estomacal^{22,25}.

Los flagelos constan de 3 elementos estructurales: cuerpo basal, gancho y filamento flagelar. El filamento es un copolímero de 2 subunidades de flagelina (FlaA y FlaB), las cuales presentan una gran homología en aminoácidos (58% de identidad) y son codificadas por 2 diferentes genes (*flaA* y *flaB*). Estudios con mutación inducida de *flaA* o *flaB* revelaron que ambos genes son requeridos para una completa movilidad de la bacteria, así como para el establecimiento de una infección persistente en cerdos gnotobióticos, razón por la cual la movilidad es un factor esencial para que *H. pylori* colonice mucosa gástrica^{22, 25}.

La rotación de los flagelos bacterianos se lleva a cabo gracias a la conversión de energía electroquímica a energía mecánica, la fuente de dicha energía es la fuerza motriz protónica suministrada por la hidrólisis de urea intracelular y es por ello que existe una quimiotaxis de la bacteria hacia dicho sustrato (urea); *H. pylori* además de presentar quimiotaxis hacia urea lo hace hacia otros compuestos (mucina, bicarbonato, cloruro de sodio y ciertos aminoácidos) con la finalidad de moverse hacia las células epiteliales evitando ser removida hacia el duodeno por el flujo de moco o eliminada por el ácido presente en el estómago^{11, 25, 26}.

Mucinasa y fosfolipasa: *H. pylori* posee actividades de mucinasa pero las proteínas permanecen aun sin identificarse; con respecto a esto lo que se ha descubierto es que la bacteria tiene la capacidad de desulfatar mucina y actuar proteolíticamente sobre componentes de la misma²⁷, además de que posee un gen que es casi idéntico al que codifica para la mucinasa de *Vibrio cholerae*⁵.

Se sabe que *H. pylori* tiene actividades de fosfolipasa, razón por la cual daña las membranas de células epiteliales mediante la disrupción de la capa de lípidos²⁸. Dorell y cols. construyeron una mutante de *H. pylori* en *pldA* (único gen descrito hasta ahora que codifica para fosfolipasa) y encontraron que la cepa mutante no presentaba actividad fosfolipasa, no colonizaba ratones a las 2 y 8 semanas después de la infección y que a pesar de que generó anticuerpos, los títulos fueron menores que los provocados por la cepa silvestre; esto último sugiere que la bacteria mutante es capaz de persistir en el ratón pero solo por un periodo de tiempo corto; en otro estudio se observó que los niveles de fosfolipasa A₂ (PLA₂) y lisolecitina (producto de hidrólisis de fosfolípidos) eran mas altos en pacientes infectados con *H. pylori* que en controles (no infectados); lo que indica que PLA₂ puede contribuir a daño celular in vivo y por lo tanto jugar un papel importante en patogénesis²⁷.

La fosfolipasa de *H. pylori* además de dañar membranas celulares también puede causar inhibición de secreción de moco y degradación de polímeros de glicoproteína del mismo, trayendo como consecuencia la pérdida de viscosidad de la capa de moco²⁸. De manera que *H. pylori* al haber logrado la degradación de la capa de moco mediante estos y otros mecanismos supera una de las defensas del hospedero, además de facilitarse la migración y por lo tanto la adherencia a la superficie de las células epiteliales gástricas²⁹.

Adhesinas: A pesar de que *H. pylori* se encuentra en un 90 % en la capa de moco, un número limitado es capaz de atravesarla y colonizar las células epiteliales gástricas, para ello la bacteria debe adherirse a dichas células a través de adhesinas, las cuales median la interacción entre la bacteria y los receptores en la superficie de las células epiteliales (Tabla 1)²⁷.

Tabla 1. Principales adhesinas de *H. pylori* y sus receptores.

Adhesina	Receptor Celular en Hospedero
Lipoproteínas asociadas a la adherencia (AlpA, AlpB)	Desconocido
Adhesina de unión a grupo sanguíneo Lewis (BabA)	Lewis b
Adhesina de unión a ácido siálico (SabA)	Lewis X-sialil dímérico
Proteína de Membrana Externa de <i>H. pylori</i> (HopZ)	Desconocido
Adhesina de <i>H. pylori</i> (Hpa), Proteína Activadora de Neutrófilos (NAP), 20, 56, 62 y 64kDa	Acido siálico
Lipopolisacárido (LPS)	Receptor de mucina (97 kDa) Laminina, Lewis x
Proteína Activadora de Neutrofilos (NAP)	Mucina gástrica

Ureasa: Dentro de los mecanismos de protección del hospedero para evitar la colonización microbiana del estómago se encuentra el ácido gástrico, *H. pylori* para lograr sobrevivir dentro de este ambiente ácido y poder llegar a la capa de moco emplea su enzima ureasa, la cual ayuda a la bacteria a crear un microambiente neutro alrededor de sí, mediante la conversión de urea a amoniaco^{29, 30}.

La ureasa es una metaloenzima citoplásmica y en ocasiones asociada a membrana externa, representa como máximo el 10% del contenido proteínico total y su peso molecular es de 550 kDa^{11, 26, 30, 31}. La enzima es un dodecámero constituido por 6 subunidades de UreA y seis subunidades de UreB, organizadas en un doble anillo de 13 nm de diámetro. El sitio activo de la enzima se encuentra en la subunidad UreB y parece ser que por cada sitio activo se requieren 2 iones Ni²⁺^{22, 30, 31}.

Los genes que codifican la ureasa de *H. pylori* (*ureABIEFGH*) están localizados dentro de un único grupo genético (6.13 kb) en el cromosoma de la bacteria; dentro de ellos *ureA* y *ureB* son genes estructurales y los restantes (*ureEFGHI*) son genes accesorios; mientras la expresión de los primeros es suficiente para el ensamblaje de la enzima, las proteínas expresadas por los genes accesorios (excepto *ureI*) interaccionan con la apoenzima y llevan a cabo la inserción de iones Ni²⁺ dando como resultado una ureasa catalíticamente activa; con respecto a *ureI* se propone que este codifica para una proteína de membrana interna formadora de poros urea-específicos con el fin de controlar el acceso al sustrato (urea) mediante la apertura de canales a pH bajos y cierre a pH altos^{21, 31}.

La función de la enzima como factor de virulencia es sustentada por diversos estudios que demuestran que mutantes de *H. pylori* deficientes en ureasa son incapaces de colonizar mucosa gástrica de cerdos gnotobióticos, ratones desnudos o gerbos. Eaton y cols. observaron que mutantes ureasa negativo presentaron solo 0.4% de la actividad ureasa de la cepa silvestre y que no colonizaron ni provocaron patología alguna en cerdos gnotobióticos retados; además de lo anterior observaron que la cepa silvestre colonizó y causó gastritis a todos los cerdos infectados. Por otro lado, se tienen reportes de que la ureasa es necesaria para la colonización pero no es requerida para viabilidad *in vitro* ya que en mutantes *ureA*⁻, *ureB*⁻ o *ureG*⁻ aparentemente no hay alteración en la tasa de crecimiento^{31, 32}.

La ureasa además de permitirle a la bacteria sobrevivir en su nicho ecológico, le puede ocasionar daño al hospedero ya que el amoníaco producido: a) es un compuesto tóxico por si mismo, b) provoca infiltración y activación de polimorfonucleares y monocitos, lo que desencadena una respuesta inflamatoria localizada que puede conducir a daño en epitelio gástrico, c) induce una mayor activación de la citotoxina vacuolizante y d) puede reaccionar con intermediarios liberados por la mieloperoxidasa conllevando a la formación de agentes carcinogénicos que posiblemente participen en el desarrollo de adenocarcinoma gástrico asociado a *H. pylori*^{30, 31}.

Debido a la gran actividad de la ureasa, esta enzima es empleada para la identificación del microorganismo así como para el diagnóstico y seguimiento del tratamiento en pacientes infectados³¹.

Proteína Activadora de Neutrófilos (HP-NAP): Es una proteína oligomérica de 150 kDa formada por 10 subunidades idénticas, se encuentra presente en el citosol bacteriano y en ocasiones puede hallarse unida a superficie de membrana externa (de manera similar a la ureasa), esto último ocurre presumiblemente como resultado de su liberación al medio después de que la bacteria sufre autólisis³³. Una vez que dicha proteína se encuentra adherida a la superficie celular, se propone que pueda actuar como una adhesina, mediando la interacción con mucina o con esfingomiolina de polimorfonucleares³⁴.

HP-NAP una vez que es liberada de la bacteria atraviesa la capa epitelial del estómago y alcanza el tejido subyacente donde se encuentran células cebadas, sobre las cuales actúa al llevar a cabo su activación lo que trae como consecuencia la liberación del contenido de sus gránulos y de la citocina proinflamatoria IL-6, de la cual se sabe recluta monocitos y neutrófilos; además de lo mencionado anteriormente, se sabe que HP-NAP puede actuar directamente sobre monocitos y neutrófilos ya que tiene efecto quimiotáctico para ellos y promueve su infiltración en mucosa gástrica así como su activación³⁴.

HP-NAP es un factor importante en la estimulación de la producción de radicales reactivos de oxígeno y actúa a través de una cascada de eventos intracelulares, como el incremento de la concentración de calcio citosólico y de fosforilación de proteínas, lo que conduce finalmente al ensamble de NADPH oxidasa sobre membrana plasmática de neutrófilos^{30, 34}.

En un estudio realizado por Satin y cols. se vio que la vacunación de ratones con HP-NAP confirió protección a ratones infectados con *H. pylori*, además de demostrar que el 60% de pacientes infectados con *H. pylori* presentaban anticuerpos contra esta proteína, comprobando con estos hallazgos que HP-NAP tiene una función importante en la infección con la bacteria³³.

Lipopolisacárido (LPS): Es un componente primordial de la membrana externa de *H. pylori* y se considera un importante factor de virulencia; presenta una baja actividad biológica ya que confiere baja endotoxicidad e induce poca respuesta inmunológica cuando se compara con el LPS de enterobacterias; lo anterior se propone sea debido a modificaciones químicas en su lípido A, ya que no cuenta con algunos ácidos grasos ni con fosforilación, además de que presenta una longitud mayor en sus cadenas de ácidos grasos. Por el hecho de que el LPS de *H. pylori* induce una baja respuesta inmunológica se postula que permite persistir a la bacteria en mucosa gástrica^{35, 36}.

Por otra parte, se sabe que el antígeno O (componente del LPS) contiene estructuras idénticas a los antígenos Lewis de grupo sanguíneo (Lewis x, Lewis y, Lewis a y Lewis b), las cuales también están presentes en mucosa gástrica, razón por la cual probablemente el LPS tenga gran relevancia en el mimetismo y realice dos eventos diferentes: a) favorecer la tolerancia inmunológica por la identidad a los antígenos propios del hospedero o b) inducir la producción de autoanticuerpos que reconozcan a las células epiteliales gástricas. La presencia de autoanticuerpos antigástricos en

pacientes infectados con *H. pylori* fue documentada y correlacionada con el grado de infiltración gástrica y la atrofia glandular presente en estos pacientes^{17, 23, 35-37}.

Entre los estudios realizados con respecto al LPS se encontró lo siguiente: 1) la cepa mutada que produjo un LPS truncado colonizó ratones menos eficientemente que la cepa silvestre, 2) cepas con pérdida en su cadena O y por lo tanto pérdida de expresión de antígenos Lewis perdieron la capacidad de infectar ratones, 3) cepas con mutación en el gen 1, 4 galactosiltransferasa, implicado en la síntesis del antígeno O, colonizaron menos eficientemente la mucosa estomacal en modelo murino, 4) ratones inmunizados con cepas *H. pylori* que expresaban Lewis x y Lewis y presentaron altos títulos de autoanticuerpos gástricos, comparados con aquellos ratones que fueron inmunizados con aislamientos carentes de expresión de antígenos Lewis³⁵; todo esto apoya la importancia del LPS en la patogénesis de *H. pylori*.

Citotoxina Vacuolizante (VacA): Algunos factores de virulencia que están presentes solo en determinadas cepas de *H. pylori* han sido asociados con ciertas enfermedades, tal es el caso de la citotoxina vacuolizante, que fue denominada así por ser una proteína que induce vacuolización en células epiteliales gástricas^{11, 21}. VacA confiere una ventaja competitiva de colonización del estómago a las cepas que la poseen con respecto a mutantes *H. pylori* VacA negativo³⁰.

La proteína VacA es producida solo en aproximadamente el 50% de las cepas a pesar de que el gen que la codifica, *vacA*, está presente en todas las cepas. Esta diferencia entre la presencia del gen y la expresión de la proteína está determinada por la variación que presenta *vacA*¹³, a este respecto se definió a *vacA* como un gen cromosomal polimórfico presente en una única copia dentro del genoma de *H. pylori*, razón por la que presenta diferentes genotipos, dependiendo de la combinación de los alelos de la región secuencia señal (s1a, s1b o s2) con los alelos de la región media (m1 o m2). Actualmente ya se tienen reportadas todas las combinaciones de los alelos de la secuencia señal con los alelos de la región media (s1a/m1, s1a/m2, s1b/m1, s1b/m2, s2/m1 y s2/m2)^{22, 24}.

La región secuencia señal codifica para el péptido señal y la región N-terminal de la toxina procesada, mientras que la región media codifica parte del dominio de la citotoxina que se une a las células epiteliales gástricas. La citotoxina codificada por *vacA* s1 es completamente activa a diferencia de la citotoxina codificada por *vacA* s2, la cual presenta poca actividad citotóxica. VacA s2 al tener una extensión N-terminal corta, bloquea la formación de vacuolas y atenúa formación de poros en membranas eucarióticas²⁴.

Se ha observado que *vacA* s1a está asociada con un incremento en infiltración de neutrófilos y linfocitos en células epiteliales gástricas y que cepas *H. pylori vacA* m1 están asociadas con daño en epitelio gástrico, lo que sugiere que las cepas s1a/m1 son el genotipo más virulento³⁷; lo anterior fue confirmado en el estudio realizado por Atherton y cols., que reportó a s1a/m1 como el genotipo con mayor actividad

citotóxica; además, el grupo de Atherton reportó que las cepas con genotipo s2/m2 no presentaron actividad citotóxica, así como que cepas s1a/m1 fueron aisladas con mayor frecuencia a partir de pacientes ulcero pépticos, cepas con genotipo s1b/m1 provenían principalmente de pacientes con gastritis y cepas *vacA* s2/m2 se encontraron en un gran número de pacientes asintomáticos²². Sumado a las observaciones anteriores, existen reportes de que cepas *H. pylori* s1/m1 comparadas con cepas *H. pylori* s1/m2, inducen mayor vacuolización y daño a epitelio gástrico así como formas más severas de gastritis, atrofia y metaplasia intestinal¹³; sin embargo, la asociación entre genotipos de *vacA* y el resultado clínico en población occidental, no fue demostrada en población asiática y japonesa, en esta última se encontró la presencia de genotipo s1a/m1 también en pacientes con gastritis crónica³⁷.

La proteína VacA es sintetizada como una protoxina de aproximadamente 140 kDa, la cual sufre 2 cortes proteolíticos: uno en la región amino terminal (péptido señal) y el otro en la región carboxilo terminal, resultando un monómero de 88-95 kDa que puede ser liberado al medio extracelular o permanecer en la superficie de la bacteria, tal monómero extracelularmente experimenta rupturas proteolíticas tanto en la región amino terminal como en la región carboxilo terminal, siendo p37 y p58, respectivamente los fragmentos resultantes de estos cortes, se sabe que tales fragmentos permanecen asociados no covalentemente^{22,34}. Aproximadamente 6 a 7 monómeros de p37 y de p58 se asocian para formar una estructura oligomérica en forma de flor de alrededor de 30 nm de diámetro³⁴.

La forma oligomérica de VacA tiene poca actividad vacuolizante pero al disociarse en monómeros, por exposición a pH bajo, se observó el incremento de la actividad citotóxica de la proteína. VacA, sorpresivamente no es desnaturalizada a pH 1.5 y tiene una resistencia inusual a pepsinógeno^{30, 34}.

VacA presenta múltiples efectos específicos que pueden contribuir a la persistencia de *H. pylori* en su nicho gástrico, entre los reportados hasta ahora se encuentran: a) formación de poros en las membranas de las células epiteliales, permitiendo de esta manera la salida de aniones y urea, b) inducción de la pérdida de uniones estrechas, favoreciendo el paso de nutrientes a través de la mucosa hacia lumen gástrico (donde se encuentra la bacteria), c) inmunosupresión del hospedero mediante el bloqueo de la maduración del fagosoma en macrófagos e d) inhibición selectiva de la presentación de antígeno en células T y disminución de efectos Th1. Además de lo anterior, se observó en estudios *in vitro* que VacA puede inducir cambios en el citoesqueleto, apoptosis y supresión de proliferación celular epitelial, así como también induce migración y vacuolización celular²⁴.

Proteína Asociada a la Citotoxina (CagA): Muchas cepas de *H. pylori* producen una importante determinante de virulencia denominada proteína asociada a la citotoxina, la cual es codificada por el gen *cagA*³⁸. y es frecuentemente coexpresada con VacA; sin embargo, el gen *cagA* se localiza a 300 kb de *vacA* y la expresión de VacA es independiente de este, ya que en cepas mutantes nulas en *cagA* no se

afectó la expresión ni la actividad de VacA; además se describió que en mutantes de *vacA* no se anula el fenotipo *cagA* positivo^{11, 22, 24}.

CagA es un antígeno inmunodominante, altamente hidrofílico, localizado sobre la superficie de la bacteria y está presente en aproximadamente 60% de las cepas de *H. pylori*. El tamaño de la proteína CagA oscila entre 120 y 145 kDa, dependiendo de la presencia de duplicaciones de la secuencia de 34 aminoácidos, la cual está determinada por un fragmento de 102 pb del gen *cagA* y se localiza en la región carboxilo terminal de la proteína^{22, 38}.

El gen *cagA* está localizado dentro de la isla de patogenicidad *cag*, por lo cual es un marcador de la ya mencionada isla^{11, 24}; PAI *cag* es un locus de 40 kb conformado por 31 genes, se encuentra integrado dentro del extremo 3' del gen de la glutamato racemasa (*glr*) y está flanqueado por repeticiones directas de 31 pb; la presencia de tales repeticiones es probablemente debida a la duplicación del gen y sugiere que la isla fue adquirida a través de eventos de recombinación³⁹. Los análisis de PAI *cag* revelaron que esta posee un contenido de G+C de 35%, comparativamente menor que el presentado por el resto del genoma (39%), además de lo anterior, se describió que en isla de patogenicidad se puede localizar la presencia de elementos de inserción IS605 (secuencias móviles que codifican 2 transposasas)^{11, 22, 39}. El contenido menor de G+C sumado a la presencia de IS605, son características que sugieren la adquisición de PAI *cag* por transferencia horizontal^{22, 30}. Por otro lado, se reportó que el orden de los genes dentro de la isla de patogenicidad *cag* es conservado²².

En una investigación realizada por Censini y cols. sobre la isla de patogenicidad *cag*, se observó que existía diversidad estructural entre estas regiones de DNA presentes en las diferentes cepas de *H. pylori* estudiadas; en algunas cepas PAI *cag* se encontró como una unidad íntegra, en otras estaba dividida en dos regiones denominadas *cag I* y *cag II*, debido a la inserción de una copia de IS605 o de un fragmento de DNA cromosomal flanqueado por dos IS605, mientras que algunas cepas de *H. pylori* presentan una eliminación total o parcial de *cag I*, *cag II* o de ambas; lo anterior explica la existencia de cepas PAI *cag* positivas o negativas^{22, 39}.

Dentro de los genes presentes en PAI *cag* existen 6 genes homólogos (*cagE*, *cagT*, *HP524*, *HP525*, *HP527* y *HP528*) a genes que codifican para componentes del sistema de secreción tipo IV (SSTIV) en *Agrobacterium tumefaciens*, *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Rickettsia prowazekii* y *Brucella* sp^{17, 22, 40}; el SSTIV está involucrado en la traslocación de la proteína CagA, desde la superficie bacteriana hacia el citosol de las células epiteliales del hospedero; sin embargo, hasta ahora se desconoce si existe otro complejo multimolecular que también pueda ser exportado por este sistema de secreción (Figura 2a)^{13, 41, 42}.

Mutantes de *H. pylori* en diversos genes localizados dentro de la PAI *cag*, tales como: *cagE*, *cagG*, *cagH*, *cagI*, *cagL* y *cagM*, demostraron que tales cepas provocaban una reducción en la capacidad de las células epiteliales para inducir secreción de interleucina 8 (IL-8), sin embargo, mutaciones en *cagN* y en *cagA* no afectaron dicha inducción³⁹, deduciendo que esta isla de patogenicidad confirió actividad inductora de inflamación mediante otras moléculas efectoras diferentes a

CagA, quizás exportadas a células del hospedero o presentadas en la superficie bacteriana⁴¹; existen reportes de que la secreción de IL-8 es inducida por la activación del complejo del factor nuclear kappa beta (NF- κ B)^{17, 22}.

cagA fue identificado en 1993, es un gen que no presenta homólogos en otras especies del género *Helicobacter*, por lo que es considerado un gen especie-específico^{11, 24, 43}; está presente en el 50 a 70% de las cepas de *H. pylori*⁴⁴ razón por la cual las cepas fueron clasificadas en *H. pylori cagA*-positivo y *H. pylori cagA*-negativo⁴⁵.

Múltiples grupos de investigación estudiaron la heterogeneidad en la secuencia de *cagA*; entre ellos se encuentra el grupo de Covacci y cols., el cual encontró que la región 5' del gen es más conservada que la región 3'^{43, 44}; además, observaron que en la región 3' de *cagA* existe una o más repeticiones de un fragmento de DNA de 102 pb; la región genética que contiene estos fragmentos intragénicos fue denominada la región variable de *cagA*⁴³.

Por su parte Evans y cols. reportaron que la diversidad en la región variable del gen *cagA* no depende únicamente de las repeticiones del fragmento de 102 pb; ellos propusieron la división en 2 regiones variables adyacentes, que denominaron: región variable proximal y región variable distal, la primera se encuentra comprendida entre un motivo de 4 a 6 asparaginas y una secuencia de 7 aminoácidos (KIDQ/RLNQ) y la segunda va de KIDQ/RLNQ a KIDNLN/SQ. La región variable proximal comparada con la distal, presentó mayor diversidad en nucleótidos y gran variación en la

secuencia de aminoácidos localizada inmediatamente después del motivo de asparaginas. La región distal mediante las repeticiones de 102 pb es la que proporciona la variación del tamaño de la proteína CagA⁴⁶, ya que cada repetición corresponde a un incremento de aproximadamente 4 kDa⁴⁷.

Las repeticiones de 102 pb no produjeron diversidad antigénica; sin embargo, esto se traduce en un incremento de prolina en la proteína CagA, razón por la cual existe una alta probabilidad de que sea expuesta en superficie y altamente inmunogénica⁴³.

La existencia de 4 diferentes secuencias genéticas en el extremo 3' del gen *cagA*, reflejado en 4 diferentes secuencias primarias de la proteína CagA fue mostrada por Yamaoka y cols., las diversas variantes en la región 3' del gen fueron denominadas A, B, C y D, dichas variantes están formadas por regiones R1 (EPIYA), R2 (QVNKKKTGQATSPE) y R3; sin embargo, la región R2 puede estar ausente en algunas cepas y dependiendo del número de veces que se presenten estas regiones (R1, R2 y R3) será el tipo de variante a la que pertenecen. En la secuencia de aminoácidos codificada por la región R3 se observaron diferencias entre las cepas Orientales y Occidentales (identidades de aproximadamente 45%), mientras las primeras se presentó la secuencia KIASAGKGVGGFSGA, en las segundas la secuencia encontrada fue FPLKRHDKVDDLKSV (Figura 2b). Adicionalmente este grupo de investigación reiteró que existe variación en el peso molecular de la proteína y que este cambio es dependiente de tipo de variante en la región 3' de *cagA*; la proteína codificada por *cagA* tipo C presentó un tamaño de 141-142 kDa y CagA presente en cepas tipo A tiene un tamaño de 129-138 kDa⁴⁸. Además de lo

anterior, se reportó que cepas con un mayor número de repeticiones están asociadas con títulos de anticuerpos altos, mayor grado de atrofia y supervivencia reducida de cepas de *H. pylori* a pH 3; por otro lado, se ha reportado que cepas con más de 4 regiones R1 en la región 3' pueden conferir un mayor riesgo para desarrollar gastritis atrófica y cáncer gástrico^{44, 49, 50}.

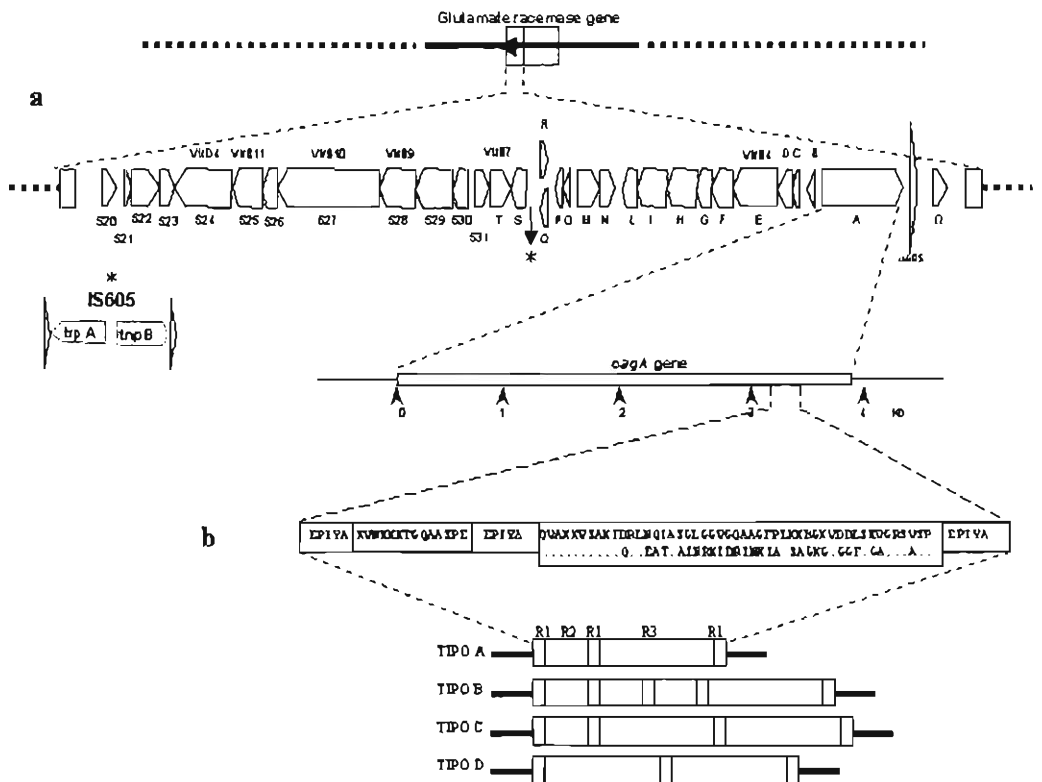


Figura 2. Isla de patogenicidad *cag* (PAI *cag*). a) Estructura de la PAI *cag*. b) Localización del gen *cagA* y variantes en estructura primaria de CagA.

Una vez que la proteína CagA es inyectada a las células del hospedero por el SSTIV, esta se localiza en la membrana plasmática, para su probable fosforilación de tirosina por miembros de la familia de cinasas SRC (Src, Fyn, Lyn y Yes) en motivos EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Alu) presentes en la región carboxilo terminal de la proteína⁴⁵. Los motivos EPIYA son parte de 4 distintos sitios EPIYA (secuencia de 34 aminoácidos): EPIYA A, B, C o D. Los sitios EPIYA A y B se encuentran presentes en todas las proteínas CagA; sin embargo, los sitios EPIYA C y D solo son localizados en proteínas CagA provenientes de cepas Occidentales y Orientales, respectivamente. Los sitios EPIYA C pueden estar presentes de 1 a 3 veces pero mayoritariamente se presentan como un único sitio, mientras que los sitios EPIYA D solo se presentan como una copia. El sitio más común de fosforilación de CagA en cepas Occidentales es el C y en cepas Orientales es el D, lo que implica la diferencia en grado de fosforilación entre cepas de *H. pylori* orientales y occidentales^{38, 45}.

La proteína CagA puede interactuar con diversas vías de señalización intracelular mediante dos rutas: una dependiente y otra independiente de su fosforilación (Figura 3)⁴⁵. Por lo que respecta a la ruta dependiente de fosforilación de la proteína, se sabe que CagA fosforilada (CagA-P) se une a la tirosina-fosfatasa SHP2, y la activa, implicando consecuencias biológicas⁴⁵; SHP2 favorece la activación de la cascada de proteína cinasas activadoras de mitógeno (MAPK), lo que trae como resultado: a) proliferación celular anormal, b) movimiento de células epiteliales gástricas y c) apoptosis. El movimiento celular es representado fenotípicamente por diseminación y elongación, lo que comúnmente se denomina fenotipo disperso y fenotipo colibrí respectivamente^{45, 51, 52}.

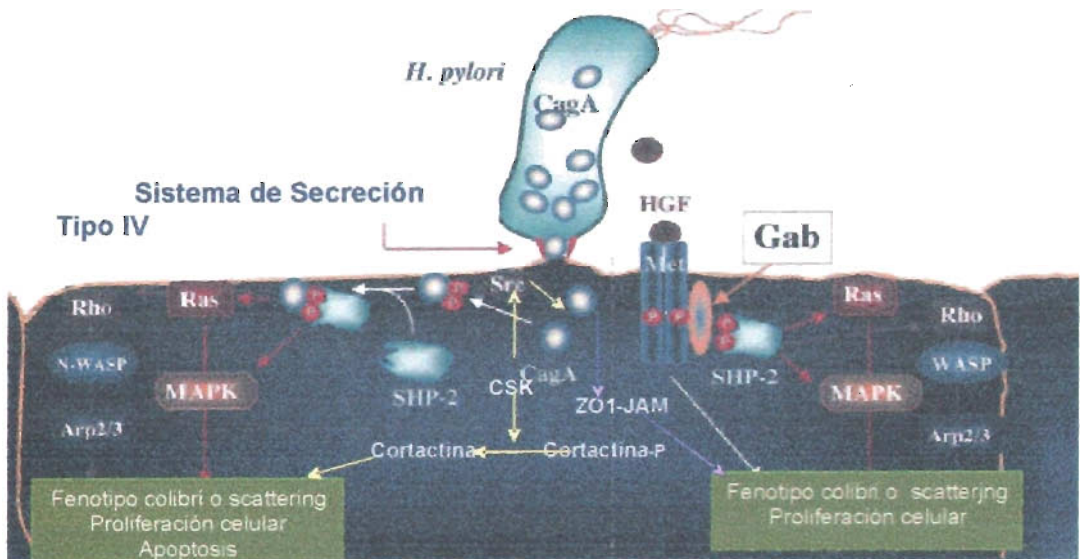


Figura 3. Efectos de Señalización Intracelular Mediadados por la Proteína CagA⁴⁵.

La activación de la cascada de MAPK por SHP2 puede ser dependiente o independiente de Ras, a este respecto se observó que SHP2 fue requerida para la activación de ERK (cinasa reguladora de señales extracelulares), así como para la permanencia de la activación, de forma independiente de Ras y de Grb2⁴⁵; por otro lado, se postula que SHP2 tiene una función positiva en señalización mitogénica mediante la estimulación de Ras logrando un nexo entre esta última y receptores tirosina-quinasas, como c-Met, EGF, PDGF, etc. Por ejemplo, después de la estimulación de HGF, su receptor (c-Met) sufre autofosforilación, lo que produce sitios de unión para Gab directamente o para Grb2, estas últimas a su vez pueden unirse a SHP2, independientemente de la fosforilación de CagA, y es a través de la formación de este complejo proteínico que se estimula Ras, el cual activa la cascada de MAPK.^{38, 53}

La cascada de MAPK se propone que induzca la proliferación celular del epitelio gástrico mediante la activación de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun*⁵²; la excesiva replicación puede incrementar el riesgo de acumulación de mutaciones y por lo tanto predisponer a las células a transformación neoplásica; además quizás promueva apoptosis en células epiteliales gástricas como consecuencia del desequilibrio de señales mitogénicas generadas por la interacción CagA-P/SHP2, lo cual puede favorecer el desarrollo de gastritis atrófica, que es un factor predisponente para cáncer gástrico⁴⁵.

También se observó que el complejo CagA-P/SHP2 puede actuar a nivel de proteínas Rho, regulando complejos de proteínas formados por el factor de nucleación de actina (Arp2/3) y la proteína del síndrome neural Wiskott-Aldrich (N-WASP), que pueden estimular la polimerización de actina resultando en el rearreglo del citoesqueleto y por lo tanto en la formación de pedestal^{22, 38}.

Por otro lado, CagA-P es capaz de unirse a CSK (una cinasa que inhibe la actividad de familia SRC), lo que resulta en defosforilación de CagA y cortactina, esta última cuando se encuentra defosforilada induce cambios morfológicos en células epiteliales gástricas⁴⁵.

Por su parte CagA no fosforilada es capaz de reclutar proteínas ZO-1 y JAM en los sitios donde se encuentra *H. pylori*, provocando la formación de complejos aberrantes en las uniones apicales de las células, manifestados por el ensamblaje ectópico de las uniones estrechas, afecciones en la barrera epitelial y por la pérdida

de polaridad celular. Lo anterior contribuye a las alteraciones en morfología celular inducidas por *H. pylori*^{42, 45, 54}.

1.5.- Cáncer Gástrico.

El cáncer gástrico es un importante problema de salud a nivel mundial, aún cuando su disminución en incidencia durante los últimos años es una realidad^{3, 14, 28}. Un reporte publicado por la Agencia internacional para la Investigación en Cáncer [IARC, organismo perteneciente a la Organización Mundial de las Naciones Unidas (OMS)] muestra que el cáncer gástrico es la tercera causa de cáncer más frecuente en hombres y la quinta en mujeres, también menciona que anualmente se diagnostican 933,937 casos nuevos de cáncer gástrico, lo que corresponde al 8.6% del total de los casos de cáncer a nivel mundial; además de lo anterior, la IARC reportó que el cáncer de estómago fue la segunda causa de muerte debida a neoplasias malignas, con una mortalidad del 10.4% con respecto al total de la muertes por cáncer (6,723,887)⁵⁵.

Asia Oriental es la región geográfica con el mayor porcentaje de casos nuevos de cáncer gástrico (57.9%) ya que dentro de ella se encuentran Corea y Japón, países que presentan las más altas tasas de incidencia de este tipo de cáncer (69.7/100,000 habitantes y 62.0/100,000, respectivamente), contrariamente a las regiones del norte y sur de África, las cuales presentan el menor número de casos nuevos de cáncer gástrico a nivel mundial (0.5 y 0.2% de casos nuevos, respectivamente). En México,

el cáncer gástrico es la tercera causa de cáncer más frecuente; así como, la tercera causa de mortalidad debida a neoplasias, tanto en hombres como en mujeres⁵⁵.

1.5.1.- Patología

Los carcinomas gástricos representan aproximadamente el 90% de los tumores malignos que surgen en el estómago; dentro de ellos existen dos variantes histológicas: la intestinal y la difusa⁵⁶, la primera está caracterizada por la presencia de células mucosas que sufrieron metástasis intestinal y mantienen cohesión, por lo tanto, permiten la formación de estructuras glandulares, esta variante progresa de la siguiente manera: 1) mucosa normal, 2) gastritis atrófica, 3) atrofia, 4) metaplasia intestinal, 5) displasia y 6) adenocarcinoma), se presenta preferentemente en personas mayores de 50 años y con una frecuencia mayor en hombres que en mujeres (2:1); por su parte, la variante difusa se origina de *novo* a partir de las células mucosas gástricas, con la presencia de células neoplásicas individuales que infiltran mucosa sin formación de estructuras glandulares debido a un patrón no polarizado de las mismas; contrario al tipo intestinal, no tiene asociación con atrofia o metaplasia, se presenta a edades tempranas y no presenta predominancia en algún género^{56, 57, 58}.

El carcinoma tipo intestinal predomina en regiones geográficas de alto riesgo tales como Japón, China, Colombia y Chile, mientras que el tipo difuso se presenta similarmente en la mayoría de las poblaciones^{56, 57}.

El carcinoma gástrico se clasifica con base en la profundidad de invasión en: 1) inicial o temprano y 2) avanzado o tardío; definiéndose como temprano cuando la lesión se encuentra confinada a mucosa y submucosa y como avanzado cuando la neoplasia se localiza por debajo de la submucosa dentro de la pared muscular⁵⁶.

1.5.2.- *H. pylori* y Cáncer Gástrico

La carcinogénesis gástrica es un proceso progresivo y multifactorial, dentro de los factores de riesgo que pueden estar implicados en su desarrollo se encuentran: factores genéticos, ambientales, premalignos e infecciosos^{7, 14, 58, 59}. En relación a los factores de riesgo de tipo infeccioso, en los últimos años ha tenido gran importancia la asociación que probablemente existe entre la infección con *H. pylori* y el desarrollo de cáncer gástrico. En 1994 la IARC basada en evidencias epidemiológicas de 3 estudios independientemente realizados en Hawai, California y Gran Bretaña, clasificó a *H. pylori* como carcinógeno tipo I; en tales estudios se encontró que sujetos con cáncer gástrico presentaban un mayor porcentaje de anticuerpos a *H. pylori* comparados con sujetos control, los estudios adicionalmente reportaron que la infección con *H. pylori* tiene una fuerte asociación con el incremento de riesgo para adenocarcinoma gástrico, encontrando razones de momios desde 2.8 hasta 6.0⁶⁰⁻⁶³.

Diversos estudios se enfocaron a la búsqueda de una asociación entre la infección con *H. pylori* y el desarrollo de cáncer gástrico, en algunos de ellos se reportó que efectivamente dicha asociación está presente, pero es notorio que el riesgo relativo que reporta cada estudio es diferente, razón por la que un meta-análisis realizado en

el 2001, sugiere que 5.9 es el riesgo relativo de cáncer no cardias asociado a *H. pylori*⁶⁴.

El porcentaje estimado de casos de cáncer gástrico que son atribuidos a *H. pylori* varía dependiendo de la prevalencia de la infección y del riesgo relativo que hayan sido considerados, ya que por ejemplo Parkin y col. reportan una estimación de 47% en países en vías de desarrollo y 35% en países desarrollados⁶⁵ mientras que por otro lado, el grupo Europeo colaborativo de *Helicobacter* y Cáncer determinan una estimación de 65% en países desarrollados y 80% en países en vías de desarrollo⁶⁴; a pesar de este alto porcentaje de casos de cáncer gástrico debidos a la infección con *H. pylori*, se sabe que el microorganismo ha sido principalmente asociado al adenocarcinoma gástrico distal en sus ambos tipos histológicos: intestinal y difuso³.
58, 64, 66

Del total de sujetos infectados con *H. pylori* solamente el 1% desarrolla cáncer gástrico, lo que cuestiona la función real de *H. pylori* en el desarrollo de este tipo de cáncer, además de lo anterior, otro punto que se contrapone a la relación entre la infección con *H. pylori* y el cáncer de estómago es la existencia de poblaciones con altas tasas de prevalencia del microorganismo y bajas tasas de incidencia de cáncer gástrico, por ejemplo regiones de Asia y África; sin embargo, a pesar de que se describió que *H. pylori* es un riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico, se desconoce la manera precisa en que la bacteria está involucrada en el desarrollo de la neoplasia^{3, 16, 58, 60, 67}.

El porcentaje relativamente pequeño de personas infectadas con *H. pylori* que desarrollan cáncer gástrico se ha atribuido a factores ambientales, del huésped y bacterianos; entre estos últimos se ha encontrado la presencia de determinados genotipos de *vacA*, *babA*, *cagA*, entre otros^{58, 68-71}.

Por lo que respecta al gen *cagA*, se determinó que cepas *H. pylori cagA* positivo son más virulentas que las cepas *H. pylori cagA* negativo, además se observó que las primeras están asociadas con grados de inflamación más severos en mucosa gástrica y con el desarrollo de gastritis atrófica, úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico^{45, 58}, sin embargo, a pesar de que en algunos países Occidentales el gen *cagA* fue asociado con la evolución a diferentes resultados clínicos (como cáncer gástrico), en países Asiáticos las evidencias científicas son contradictorias, ya que la mayoría de los individuos infectados con *H. pylori* presentan cepas *cagA* positivas independientemente de que presenten o no alguna de las entidades clínicas a las cuales está asociado *H. pylori*^{72, 73}.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

Estudios epidemiológicos demostraron que la infección con *H. pylori* es un factor de riesgo para desarrollar cáncer gástrico; dicho riesgo se incrementa cuando las personas son colonizadas por cepas que poseen el gen asociado a la citotoxina (*cagA*); por lo que existe una seroprevalencia mayor de infección con *H. pylori* en sujetos con estadios tempranos que con estadios avanzados de cáncer gástrico; sin embargo, aún se desconoce la topografía de *H. pylori* y de *cagA* en el estómago de sujetos infectados.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1.- Objetivo General.

- Conocer la topografía de *H. pylori* y del gen *cagA* en el estómago de sujetos con cáncer gástrico y dispepsia.

3.2.- Objetivos Particulares.

- Determinar la frecuencia y topografía de *H. pylori* y del gen *cagA* en biopsias de :
 - a) regiones anatómicas del estómago de sujetos con dispepsia y cáncer gástrico.
 - b) regiones de la lesión cancerígena de sujetos con cáncer gástrico.
- Comparar la topografía de *H. pylori* y de *H. pylori cagA*-positivo entre los grupos de estudio (cáncer gástrico y dispepsia).
- Determinar la frecuencia de *H. pylori* y del gen *cagA*-positivo en sujetos con estadios tempranos y avanzados de cáncer gástrico
- Determinar si existe asociación entre la topografía de *H. pylori* y de *H. pylori cagA*-positivo en los diferentes estadios de cáncer gástrico.

CAPÍTULO 4

METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina, UNAM en colaboración con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCSNSZ).

4.1.- Población en estudio.

Sujetos con una lesión compatible con cáncer gástrico o sujetos con indicaciones de endoscopia y presencia de síndromes dispépticos no ulcerosos (grupo control) que ingresaron al servicio de endoscopia del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” entre agosto del 2001 a mayo del 2004, fueron incluidos en un estudio prospectivo, longitudinal, transversal y doble ciego.

4.2.- Criterios de Exclusión.

- Sujetos que no autorizaran su participación en el estudio (la solicitud de dicha autorización fue hecha por escrito antes de la endoscopia).
- Sujetos sintomáticos o con diagnóstico de cáncer gástrico y que no se les realizara toma de biopsia gástrica endoscópica.
- Sujetos a los cuales por cualquier razón no se les tomaran biopsias.

- Sujetos que tuvieran prescripción de tratamiento contra *H. pylori* o que no fueran vírgenes a tratamientos oncológicos.
- Sujetos que presentaran datos clínicos sugestivos de trastorno hemorrágico y/o gastritis congestiva (por hipertensión portal o ingesta de ácido acetilsalicílico en las últimas 72 horas).

4.3.- Muestreo endoscópico.

A todos los sujetos estudiados se les tomó de manera sistemática 3 biopsias de cuatro regiones anatómicas del estómago: fondo, cuerpo, incisura angular y antro, de acuerdo con la clasificación de Sydney modificada⁷⁴. A aquellos pacientes que presentaban macroscópicamente una lesión compatible con cáncer gástrico (según la clasificación de Padova⁷⁵), además de las biopsias mencionadas anteriormente se les tomaron las biopsias correspondientes a las regiones de centro, periferia, tumor +2 cm y tumor +5 cm (Figura 4).

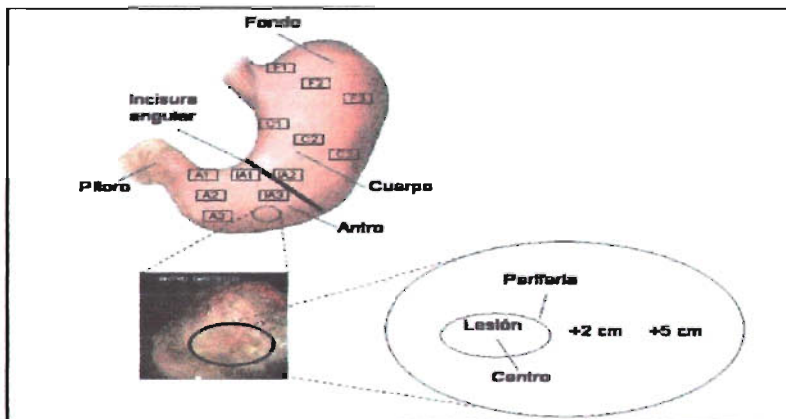
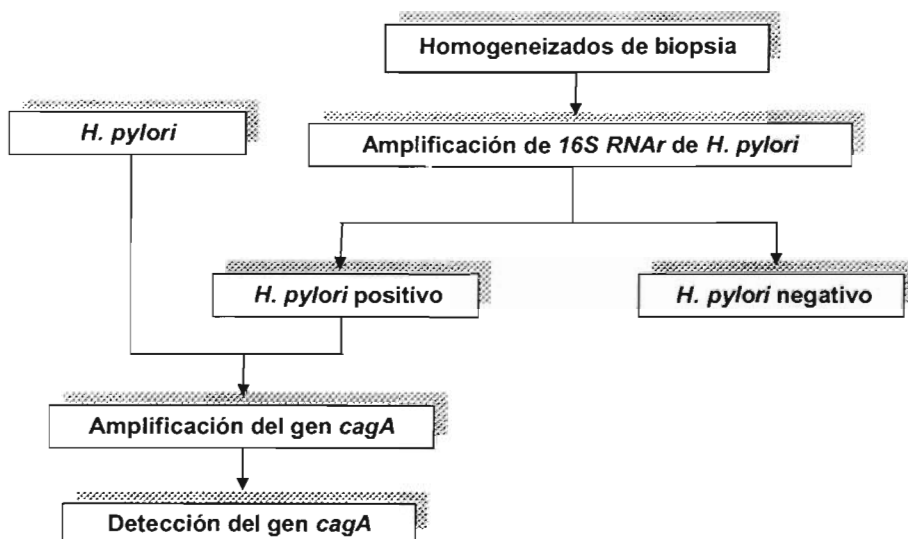


Figura 4. Esquema del muestreo sistemático en los sujetos estudiado.

4.4.- Esquema general de trabajo.



4.5.- Aislamiento de *H. pylori*.

Las biopsias gástricas fueron transportadas en solución balanceada de Hank's suplementada con 12% de suero fetal bovino (SFB) en un periodo de tiempo menor a 2 horas. Cada biopsia fue homogeneizada y diluida en 500 μ L de solución salina isotónica estéril. 100 μ L del homogeneizado fueron empleados para el cultivo microbiológico de *H. pylori* en el laboratorio del Programa de Inmunología Molecular Microbiana.

4.6.- Extracción de DNA a partir de cepas de *H. pylori*.

La extracción de DNA cromosomal de los aislamientos clínicos (conservados en caldo Brucella suplementado con 10% de SFB y 15% de glicerol y almacenados a -70° C), fue realizada utilizando el kit comercial Geneclean (Geneclean III, Bio101, Inc., La Jolla, CA) y se realizó de la manera explicada a continuación: las suspensiones bacterianas se centrifugaron a 14,000 rpm/2 min. para obtener el paquete celular, a cada muestra se le adicionaron 200 µL de una solución de tiocianato de guanidina 5M, EDTA 0.1M y Sarcosinato 0.5% (GES) y se agitó suavemente hasta disolución del paquete, posteriormente se añadieron 20 µL de Glassmilk y se agitó durante 30 min. seguido de una centrifugación a 14,000 rpm/1 min. Se realizaron 3 lavados con 500 µL de New Wash y centrifugaciones a 14,000 rpm/30 segundos. 15 µL de solución de elusión fueron adicionados al botón y los tubos fueron incubados a 56° C durante 4 min., centrifugándose posteriormente a 14,000 rpm/1 min. para recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo, el proceso de elusión se realizó por duplicado.

4.7.- Extracción de DNA a partir de biopsias gástricas.

El método empleado para la extracción de DNA cromosomal fue el de tiocianato de guanidina⁷⁶: a 100 µL de homogenizado de biopsia se le adicionaron 500 µL de solución de GES (tiocianato de guanidina 5M, EDTA 0.1 M y N-lauril sarcosinato 1%), se mezcló e incubó 10 min. a temperatura ambiente; posteriormente, se agregaron 250 µL de acetato de amonio 7.5 M, se mezcló y se incubó 10 min. a 4° C; 550 µL de

cloroformo-alcohol isoamílico (1:24) fueron adicionados y se agitó vigorosamente por 5 min. Los tubos fueron centrifugados a 14,000 rpm por 15 min. y a partir de ellos se recuperó la fase acuosa, la cual se transfirió a tubos nuevos y a estos últimos se les agregó un volumen de isopropanol igual al recuperado de fase acuosa, se mezcló y se incubó a -70°C durante 2 horas. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm/5 min., el paquete de DNA se lavó (por duplicado) con 300 μL de etanol al 70%. Finalmente se dejaron secar los tubos por aproximadamente 10 min., las muestras se almacenaron a -70°C hasta su empleo.

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

A las biopsias gástricas que fueron cultivo negativo para *H. pylori*, se les realizó la detección del microorganismo por la amplificación del gen *16S RNA ribosomal*⁷⁷ mediante la técnica de PCR semi-anidado, empleando el par de iniciadores Hp1/Hp3 en la primera amplificación y Hp1/Hp2 en la segunda amplificación (Tabla 2); para la primera amplificación, 5 μL de DNA fueron adicionados a 20 μL de la mezcla de reacción para PCR [Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, MgCl_2 1.0 mM, 200 μM de cada uno de los deoxinucleótidos (Roche, Boehringer, Mannheim, Alemania), 10 pmol de cada uno de los iniciadores y 1U de *Taq* DNA polimerasa (Roche, Boehringer, Mannheim, Alemania)]. Con respecto a la segunda amplificación, 1 μL del producto de PCR de la primera amplificación fue adicionado a 24 μL de una nueva mezcla de reacción (descrita previamente). Dichas amplificaciones se realizaron en un termociclador GeneAmp 9700 (PE, Applied Biosystems) bajo las

siguientes condiciones: 94° C/3 min., 60° C/45 seg. y 72° C/7 min., durante 30 ciclos. Para cada ensayo de amplificación se incluyeron controles positivos [DNA de *H. pylori* ATCC 43504, 84-183 (ATCC 53726) y 86-313]] y controles negativos (DNA de linfocitos humano y agua). Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%/TBE 0.5X, teñidos con bromuro de etidio y examinados en un transiluminador con luz ultravioleta (UV).

4.9.- Detección del gen *cagA* de *H. pylori* en aislamientos.

La detección de *cagA* se realizó por PCR⁷⁸. Tres µL del templado de DNA fueron adicionados a 27 µL de una mezcla de reacción para PCR (similar a la anteriormente descrita para *16S RNAr*). Los iniciadores que fueron utilizados son mencionados en la tabla 2. Las condiciones de amplificación fueron: 94° C/3min., 58° C/1 min. y 72° C/5 min. por 35 ciclos. En los ensayos de amplificación se emplearon las cepas de *H. pylori* 88-23, 84-183 (ATCC 53726) y ATCC 43504 como controles positivos y las cepas de *H. pylori* 88-22 y 86-313 como controles negativos además se incluyó agua como control negativo de contaminación. La visualización de los productos amplificados fue hecha como se describe previamente.

4.10.- Detección del gen *cagA* de *H. pylori* en biopsias gástricas.

La detección de *cagA* se realizó por PCR-Hibridación, el ensayo de PCR fue realizado de manera similar al de los aislamientos de *H. pylori*: Cinco µL del templado

de DNA fueron adicionados a 25 μ L de una mezcla de reacción para PCR. Los productos obtenidos por la amplificación se sometieron a un ensayo de hibridación con la sonda CAG4 (10 ng/mL, obtenida según el método descrito por Mazari y cols⁷⁹): 10 μ L de los productos de PCR fueron colocados en una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham) y fijados con luz UV en Crosslinker CL-100 (UVP, Udland, CA). La hibridación de la membrana se llevó a cabo a 55° C, posteriormente se lavó con una solución salina de citratos (SSC) 2X y 0.1% de dodecil sulfato de sodio (SDS) y después se realizó un lavado con SSC 0.1X - 0.1% SDS. Los lavados fueron hechos a 65° C por 1 hora. El revelado de la membrana se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante (DIG DNA Labeling and Detection, Boehringer, Mannheim, Germany).

4.11.- Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados estadísticamente empleando frecuencias de la positividad de *H. pylori* y del gen *cagA* en las diferentes regiones del estómago [anatómicas (fondo, cuerpo, incisura angular y antro) y de la lesión (centro, periferia, tumor + 2 cm y tumor + 5 cm)], mediante la prueba estadística χ^2 de McNemar empleando el programa Stata statistical software (Intercooled Stata 7.0 for Windows 98/95/NT Package. 2001). Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado significativo estadísticamente. Los sujetos que integraban al grupo de cáncer gástrico fueron considerados "casos" mientras que los que se encontraban en el grupo de dispepsia se consideraron "controles".

Tabla 2. Iniciadores utilizados en la amplificación de los genes *16S RNAr* y *cagA*.

Gen	Iniciador	Secuencia 5' → 3'	Posición (pb)	Temperatura de alineamiento	Tamaño (pb)
<i>16SRNAr</i> ⁷⁵	Hp1	CTGGAGAGACTAAGCCCTCC	834-853	60° C	109
	Hp2	ATTACTGACGCTGATTGTGC	744-763		
	Hp3	AGGATGAAGGTTTAAGGATT	407-426		
<i>cagA</i> ⁷⁶	cagA1	AATACACCAACGCCTCCAAG	2054-2073	58° C	400
	cagA2	TTGTTGCCGCTTTTGCTCTC	2450-2431		

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1.- Población en Estudio.

En el estudio fueron incluidos 32 sujetos en total y en base a hallazgos endoscópicos se clasificaron 18 sujetos en el grupo de cáncer gástrico y 14 en el grupo de dispepsia; posterior a ello y basado en evidencias histopatológicas, 2 de los sujetos del grupo de cáncer gástrico fueron excluidos por presentar linfoma tipo MALT, por lo que finalmente quedó constituido por 16 personas, de las cuales 5 presentaron cáncer en estadios tempranos (3 con estadio I y 2 con estadio II) y 11 cáncer en estadios avanzados (7 con estadio III y 4 con estadio IV).

Las características demográficas de la población estudiada se muestran en la tabla 3. La edad promedio de los sujetos con cáncer gástrico (57 ± 12 años) fue mayor que la de los sujetos con dispepsia (47 ± 13), además, el grupo de cáncer gástrico presentó un mayor porcentaje de individuos del sexo masculino (56%) comparado con el del grupo de dispepsia (17%).

Tabla 3. Características Demográficas de los Grupos Estudiados.

	Cáncer Gástrico n =16	Dispepsia n =14
Edad ± DE	57±12	47± 13
Sexo (M/F)	9/7	2/12
Estadios (Tempranos/Avanzados)	5/11	

5.2.- Frecuencia de positividad y topografía de *H. pylori*.

5.2.1.- Frecuencia de positividad y topografía de *H. pylori* por cultivo.

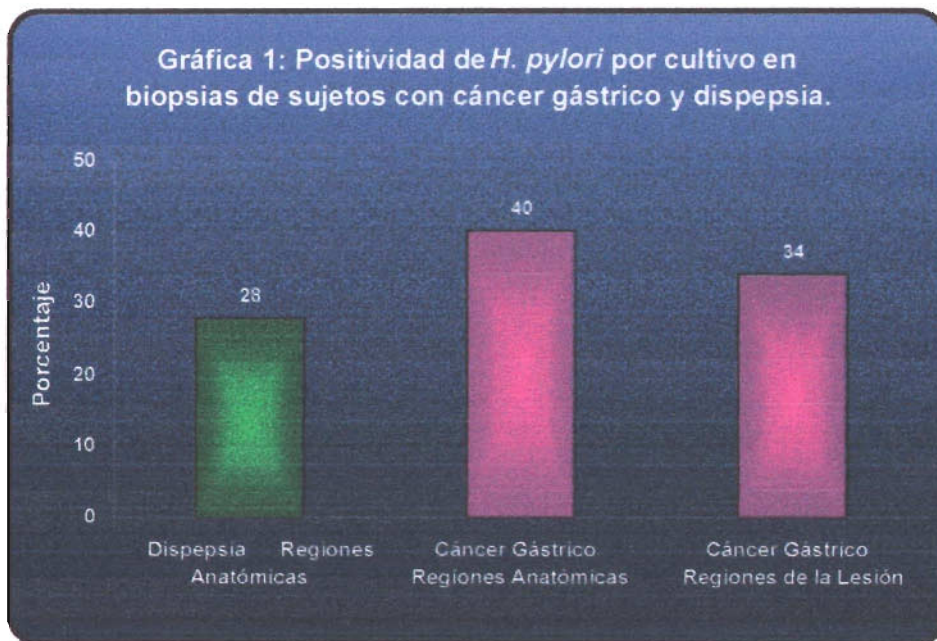
La frecuencia global de *H. pylori* por cultivo en los grupos de estudio, se encontró de 28% en el grupo de dispepsia y 40% en el grupo de cáncer gástrico, considerando únicamente las regiones anatómicas del estómago (fondo, cuerpo, incisura angular y antro), esta diferencia entre ambos grupos fue de significancia estadística ($p= 0.022$), no así para el grupo de cáncer gástrico cuando se comparó la frecuencia de positividad de *H. pylori* en las regiones anatómicas del estómago (40%) con la frecuencia en las regiones de la lesión (34%), $p= 0.454$. Tabla 4 y Gráfica 1.

Tabla 4: Frecuencia de positividad a *H. pylori* por cultivo en biopsias de sujetos con cáncer gástrico y dispepsia

Grupo	Región	Frecuencia (%)		P
		Hp negativo	Hp positivo	
Dispepsia	Anatómica del estómago*	121/168 (72)	47/168 (28)	0.022
	Cáncer Gástrico	102/171 (60)	69/171 (40)	
	Lesión**	42/64 (66)	22/64 (34)	0.454

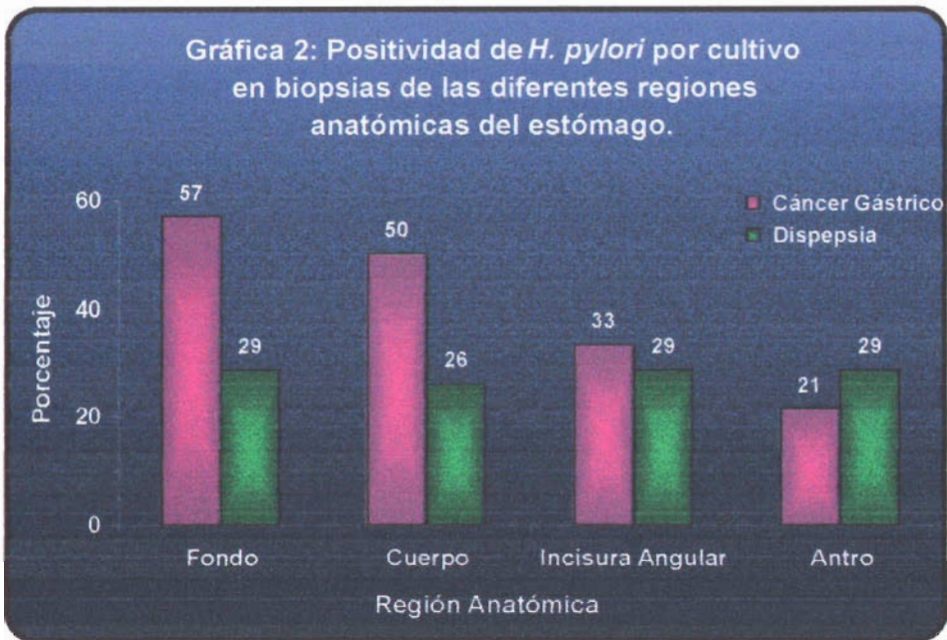
*Se consideró fondo, cuerpo, incisura angular y antro.

**Se consideró centro, periferia, tumor + 2 cm y tumor + 5 cm.

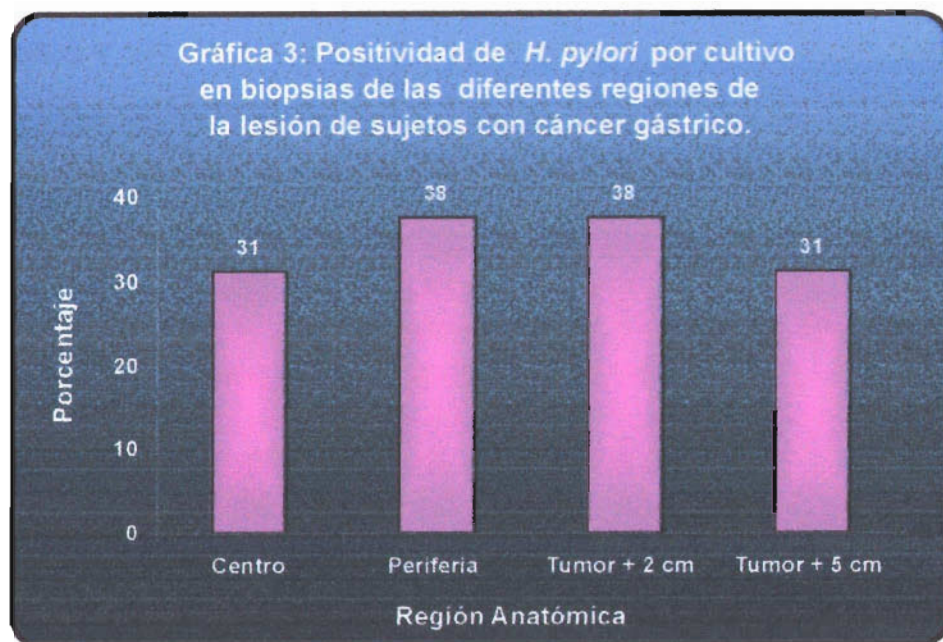


En cuanto a la frecuencia de *H. pylori* por cultivo en las diferentes regiones anatómicas del estómago, se observó que en el grupo de dispepsia el microorganismo estuvo presente en 29% de las biopsias de fondo, incisura angular y antro y en 26% de las biopsias de cuerpo, sin significancia estadística entre las

frecuencias en las diferentes regiones estudiadas ($p= 1.0$); por su parte, en los sujetos con cáncer gástrico se encontraron diferencias significativas en frecuencias de positividad por cultivo entre las diversas regiones anatómicas ($p=0.003$): en fondo la positividad fue de 57%, en cuerpo de 50%, en incisura angular de 33% y en antro de 21%. Gráfica 2.



En relación a las positivities de *H. pylori* por cultivo en las distintas regiones de la lesión cancerígena se encontró que fueron de 31% en centro y +5 cm de la lesión y de 38% en periferia y +2 cm de la lesión, sin diferencias significativas estadísticamente ($p=1.0$). Gráfica 3.



Por lo que respecta a la presencia de *H. pylori* detectada por cultivo en los diferentes estadios de cáncer gástrico, se encontró que esta fue de 25% en los casos de estadios tempranos y de 35% en los casos de estadios avanzados, sin haber significancia estadística entre dichos resultados ($p=0.397$). Tabla 5.

Tabla 5: Frecuencia de positividad a *H. pylori* por cultivo en biopsias de sujetos con diferentes estadios de cáncer gástrico.

Estadios	Frecuencia (%)		p
	Hp negativo	Hp positivo	
Tempranos*	15/20 (75)	5/20 (25)	0.397
Avanzados**	31/48 (65)	17/48 (35)	

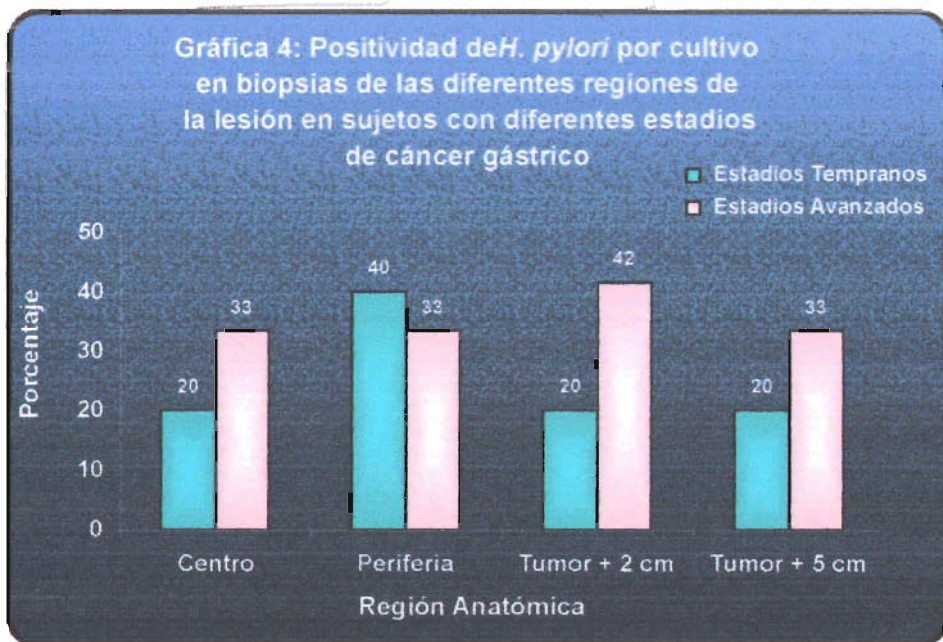
*Estadios I y II

**Estadios III y IV

Solo se tomaron en cuenta las regiones de la lesión (centro, periferia, + 2 cm y + 5 cm).

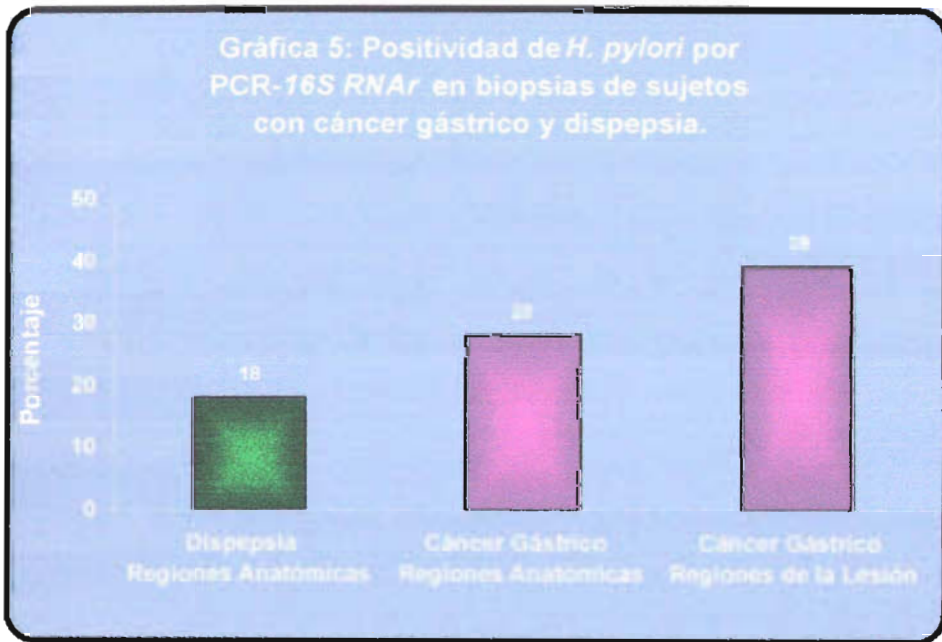
La frecuencia de *H. pylori* por cultivo en las diferentes regiones de la zona tumoral de los sujetos con diferentes estadios de cáncer gástrico, se presentó de la siguiente manera: en el grupo de sujetos con estadios tempranos fue de 20% en centro, tumor + 2 cm y tumor + 5 cm y de 40% en periferia; mientras que en el grupo de sujetos con estadios avanzados las frecuencias de positividad fueron de 33% en centro, periferia y tumor + 5 cm y de 42% en tumor + 2 cm; sin diferencias estadísticamente significativas entre las positivities en las diversas regiones de la lesión en los 2 grupos de sujetos con diferentes estadios ($p=1.0$).

Gráfica 4.



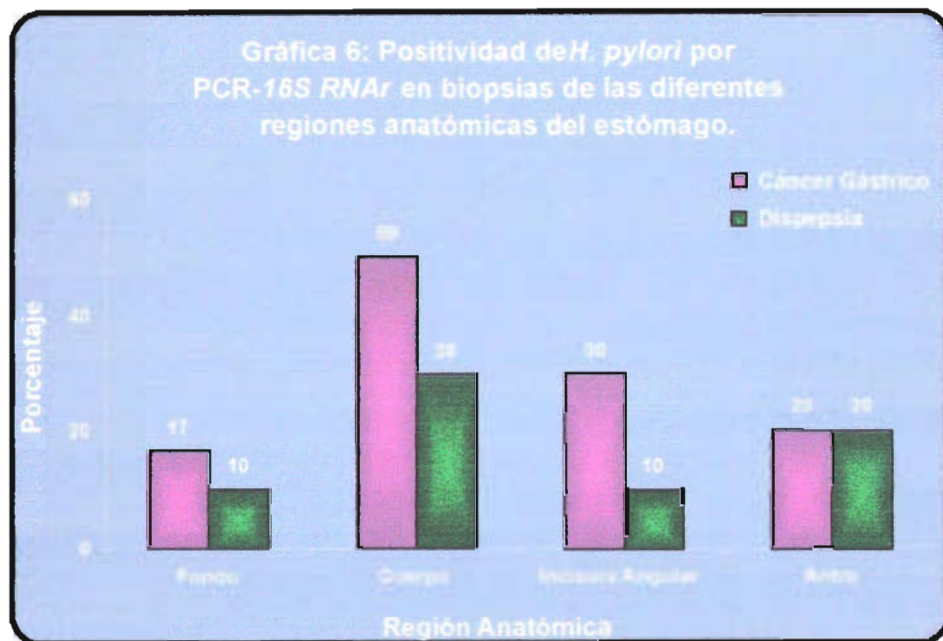
5.2.2.- Frecuencia de positividad y topografía de *H. pylori* por PCR-16S RNAr.

La frecuencia global de *H. pylori* por la amplificación del gen 16S RNAr por PCR para únicamente las regiones anatómicas del estómago fue de 18% en el grupo de dispepsia y de 28% en el grupo de cáncer gástrico, con una *p* no significativa cuando se compararon estos porcentajes ($p=0.393$); por otro lado, la frecuencia de *H. pylori* por PCR en las regiones de la lesión cancerígena fue de 39%, sin diferencia significativa estadísticamente entre este último porcentaje y el del mismo grupo de estudio en las regiones anatómicas del estómago ($p=0.344$). Gráfica 5.

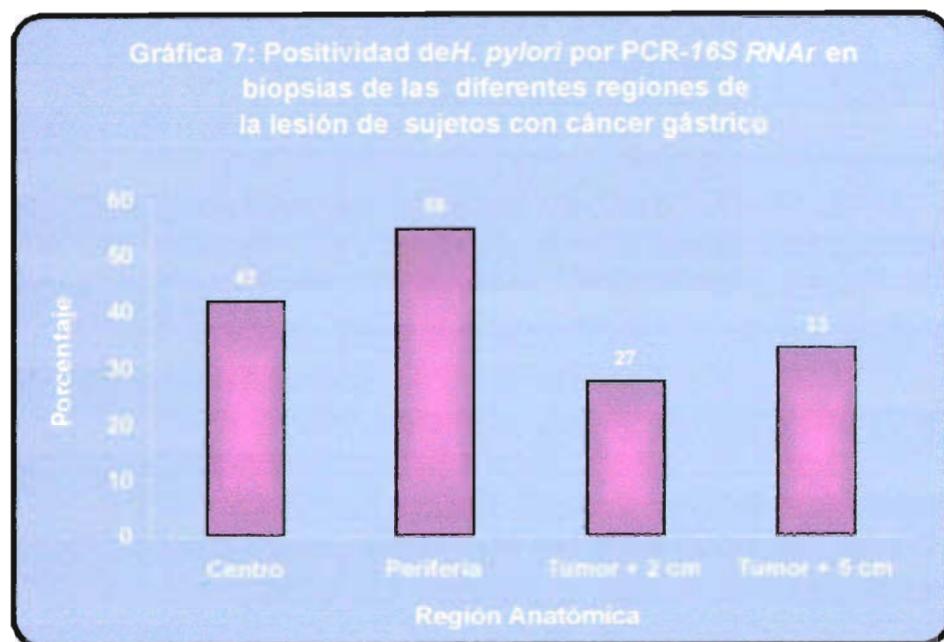


En el grupo de sujetos con dispepsia la positividad de *H. pylori* por PCR fue de 100% en fondo e incisura angular, de 30% en cuerpo y de 20% en antro, con una *p* no significativa ($p=0.805$); el grupo de sujetos con cáncer gástrico presentó un

porcentaje de positividad en fondo de 17%, en cuerpo de 50%, en incisura angular de 30% y en antro de 20%, sin diferencias estadísticas entre las positivities en las diferentes regiones anatómicas de este grupo ($p=0.635$). Gráfica 6.



En las regiones de la lesión cancerígena se obtuvo un porcentaje de positividad a *H. pylori* por PCR de 42% en centro, 55% en periferia, 27% en tumor + 2 cm y 33% en tumor + 5 cm, con una p sin significancia ($p= 0.600$) cuando se compararon dichas positivities en las diferentes regiones, Gráfica 7.



En sujetos con estadios tempranos de cáncer gástrico la frecuencia de *H. pylori* por PCR fue de 40%, mientras que en sujetos con estadios avanzados fue de 39%, sin encontrar diferencia significativa entre las frecuencias de *H. pylori* en sujetos con diferentes estadios ($p=1.0$). Tabla 6.

Tabla 6: Frecuencia de positividad a *H. pylori* por PCR 16S *RNAr* en biopsias de sujetos con diferentes estadios de cáncer gástrico.

Estadios	Frecuencia (%)		p
	Hp negativo	Hp positivo	
Tempranos*	9/15 (60)	6/15 (40)	} 1.0
Avanzados**	19/31 (61)	12/31 (39)	

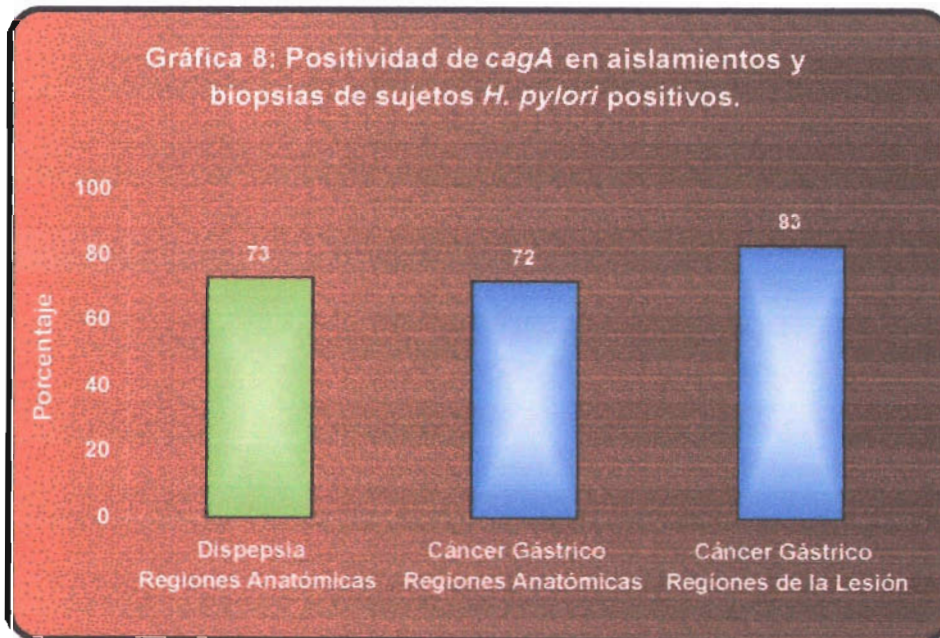
*Estadios I y II

**Estadios III y IV

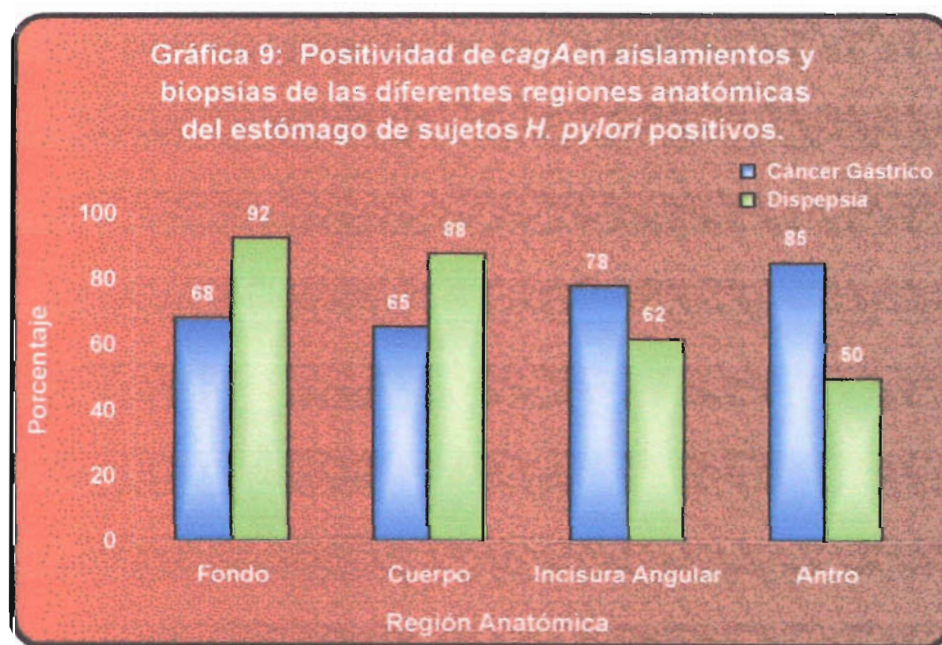
Solo se tomaron en cuenta las regiones de la lesión (centro, periferia, + 2 cm y + 5 cm

5.3.- Frecuencia de positividad y topografía del gen *cagA* de *H. pylori*.

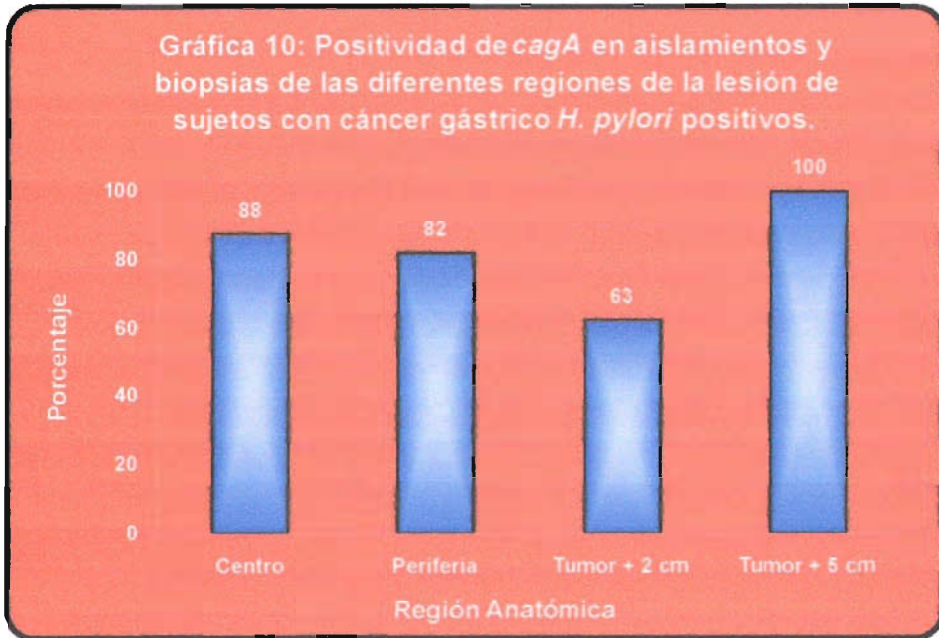
Con respecto a la frecuencia del gen *cagA* en biopsias de las regiones anatómicas del estómago que fueron positivas a *H. pylori* por cultivo o PCR, en sujetos con dispepsia y en sujetos con cáncer gástrico fue de 73% y 72%, respectivamente; además en los sujetos con cáncer gástrico la frecuencia de *cagA* en las regiones de la lesión fue de 83%; sin diferencias significativas estadísticamente entre la frecuencias del gen *cagA* en las regiones anatómicas del estómago de ambos grupos estudiados ($p= 1.0$), así mismo se determinó sin significancia la diferencia entre la frecuencia de *cagA* en las regiones anatómicas del estómago y la frecuencia en las regiones de la lesión en sujetos con cáncer gástrico ($p=0.249$). Gráfica 8.



Al determinar la frecuencia de *cagA* en fondo, cuerpo, incisura angular y antro en sujetos dispépticos fue de 92%, 88%, 62% y 50%, respectivamente; encontrando que existe significancia estadística entre estas diferencias ($p=0.036$). En sujetos con cáncer gástrico se obtuvieron frecuencias de positividad de 68% en fondo, 65% en cuerpo, 78% en incisura angular y 85% en antro, sin diferencias significativas entre éstas ($p=0.606$), Gráfica 9.



La frecuencia del gen *cagA* en la zona tumoral fue en centro de 88%, en periferia de 82%, en tumor + 2 cm de 63% y en tumor + 5 cm de 100%, presentando una p sin significancia ($p=0.349$), Gráfica 10.



La frecuencia de *cagA* en aislamientos y biopsias de sujetos con estadios tempranos y estadios avanzados fue de 73% y 87%, respectivamente; sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($p=0.351$), Tabla 7.

Tabla 7: Frecuencia de positividad a *cagA* en aislamientos y biopsias de sujetos con diferentes estadios de cáncer gástrico.

Estadios	Frecuencia (%)		p
	Hp negativo	Hp positivo	
Tempranos*	3/11 (27)	8/11 (73)	} 0.351
Avanzados**	3/24 (13)	21/24 (87)	

*Estadios I y II

**Estadios III y IV

Solo se consideraron las regiones de la lesión (centro, periferia, + 2 cm y + 5 cm).

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

El cáncer gástrico es una neoplasia altamente frecuente a nivel mundial, sin embargo, no existe una clara etiología de la misma, diversos factores se han mencionado que pudieran causarla, entre los cuales el papel de *H. pylori* se ha destacado, razón por la que a este respecto diversas investigaciones se han realizado, entre ellas destacan los estudios seroepidemiológicos realizados en la década de los 90, en los que se encontró que individuos con cáncer gástrico presentaban una frecuencia mayor de anticuerpos anti-*H. pylori* que individuos que no desarrollaban tal malignidad⁶¹⁻⁶³, derivado de lo anterior se estableció que efectivamente la infección con *H. pylori* es un factor de riesgo para desarrollar cáncer gástrico, pero una vez que fue establecida dicha asociación surgieron grandes interrogantes a este respecto y por lo tanto las investigaciones para responderlas; entre estas investigaciones, se han realizado unas concernientes a la existencia en diferencias entre la frecuencia de *H. pylori* en personas con estadios tempranos comparadas con personas en estadios avanzados, a este respecto, en un estudio se reportó que existe una mayor frecuencia del microorganismo en pacientes con cáncer de estadios tempranos⁸⁰, mientras que otros demuestran una similar frecuencia en los diferentes estadios⁸¹, razón por la cual en este estudio se investigó si existían diferencias en la frecuencia de *H. pylori* en población mexicana con diferentes estadios de cáncer gástrico, pero mediante técnicas de detección directa del microorganismo ya que en muchos de los estudios realizados anteriormente se

emplearon métodos seroepidemiológicos, los cuales, si bien es cierto pueden dar una idea de la presencia de *H. pylori*, esta puede ser por infección reciente o por exposición previa.

En el presente estudio la positividad de *H. pylori* por cultivo en los sujetos dispépticos (28%) fue menor que en el grupo con cáncer gástrico (40%), Gráfica 1, esto concuerda con los estudios realizados por los grupos de Tabata⁸² y de Ho⁸³, en el primero se encontró que la positividad de *H. pylori* por cultivo fue de 54% en controles y de 88% en pacientes con cáncer gástrico; mientras que en el segundo estudio, *H. pylori* estuvo presente en una frecuencia de 29% de los sujetos dispépticos no ulcerosos. La positividad de *H. pylori* en sujetos con cáncer gástrico es controversial, ya que existen estudios que reportan altas frecuencias de infección por *H. pylori* en personas con cáncer gástrico; además, en algunos de ellos, tales frecuencias son significativamente diferentes a las frecuencias encontradas en sujetos control, tal es el caso de los estudios realizados por Deguchi y cols.⁸⁴ y por Enomoto y cols.⁸⁵ quienes reportaron una positividad de 85.9% y de 98% respectivamente, por su parte, Parsonnet y cols.⁸⁶, reportaron una seroprevalencia de 87.4% en pacientes con cáncer gástrico contra un 64% en controles, los resultados anteriores sumados a los de Tabata y col.⁸² sugieren una fuerte asociación de *H. pylori* con el desarrollo de cáncer gástrico, sin embargo, por otro lado, estudios como el de Shin y cols.⁸⁷, quienes reportaron una seropositividad del 83.7% en pacientes con cáncer gástrico y de 80.6% en controles empleando población de Corea del Sur, sugieren que no hay asociación entre la infección de *H. pylori* y el riesgo de adenocarcinoma gástrico, razón por la cual, se ha visto que la

asociación de *H. pylori* al desarrollo de cáncer gástrico es controvertida de acuerdo a la población que se estudie; en el presente trabajo se encontró que en la población mexicana estudiada existe una significancia estadística entre la presencia de *H. pylori* y el cáncer gástrico.

Por otro lado, se observó que las frecuencias de infección determinadas por cultivo, en las diferentes regiones anatómicas del estómago fueron prácticamente iguales en el grupo de dispepsia, no así en el grupo de cáncer gástrico, ya que en este último, fondo (57%) y cuerpo (50%) fueron las regiones con mayor positividad (Gráfica 2); estos resultados son similares a los descritos por Ho y cols.⁸³, ya que ellos también determinaron la topografía de *H. pylori* para conocer si esta influía en el resultado clínico, sin embargo, al igual que en nuestro estudio, dicha topografía en sujetos dispépticos fue uniforme y no hay un sitio para que *H. pylori* colonice el estómago preferencialmente⁸³; en cuanto a la alta frecuencia de infección con *H. pylori* en cuerpo gástrico de sujetos con cáncer, los grupos de Tabata⁸² y de Zhang⁸⁸ reportan dicha región como la de mayor infección con respecto a las que estudiaron (antro y cuerpo en ambos casos), resultados concordantes con lo que obtuvimos. El alto porcentaje de positividad en el fondo del estómago de los sujetos con cáncer gástrico probablemente se deba a que dicha región es una zona próxima a cuerpo, la cual es una zona colonizada en la gastritis inducida por *H. pylori*^{13, 89}; sin embargo, los hallazgos en el fondo gástrico aún no son del todo claros.

Con respecto a la positividad por PCR de *H. pylori*, al hacer la comparación entre la frecuencia obtenida en las regiones anatómicas del estómago en el grupo de

dispepsia (18%) vs el grupo de cáncer gástrico en las mismas regiones (28%), no se tuvo diferencia estadística (Gráfica 5), observándose que dichas frecuencias fueron menores comparadas con las que se obtuvieron por cultivo (Gráfica 1).

En cuanto a la positividad de *H. pylori* por PCR en las regiones de fondo, cuerpo, incisura angular y antro en los sujetos con dispepsia y con cáncer gástrico se encontró que aparentemente en ambos grupos la región con mayor frecuencia del microorganismo fue cuerpo (Gráfica 6), sin significancia estadística; parecido a lo hallado por cultivo.

Por su parte, la positividad *H. pylori* en la zona tumoral de los sujetos con cáncer gástrico, fue de 34% por cultivo y de 39% por PCR (amplificación del gen *16S RNAr*), Gráfica 1 y 5; tales frecuencias coinciden con las obtenida por Lin y cols.⁹⁰ (39.5%) y por Tang y cols.⁹¹ (39.03% por PCR), dichos estudios emplearon muestras gástricas de la lesión cancerígena, el primero de ellos, trabajó con biopsias tomadas al menos a 2 cm de la zona cancerosa, mientras que el segundo utilizó el centro de la lesión; en otro estudio, realizado por van Grieken y cols.⁹², la positividad de *H. pylori* fue de 52.2% por PCR, este grupo también empleó el área tumoral. La relativamente alta positividad de *H. pylori* en las zonas del tumor en nuestro estudio, es controversial; ya que se ha considerado que *H. pylori* no podría desarrollarse en un epitelio gástrico que ha sufrido cambios morfológicos, ya que estos desfavorecerían el crecimiento del microorganismo⁸⁸; además la infección por *H. pylori* se ha descrito que conduce a un incremento en la excreción de ácido gástrico y a una disminución del ácido ascórbico en las glándulas gástricas, lo que causa proliferación celular y un daño

crónico a la mucosa gástrica e induce a largo plazo una respuesta inflamatoria tolerante que permitiría a *H. pylori* sobrevivir en el epitelio gástrico, aún en presencia de lesiones cancerígenas⁹¹, debido a que este tejido es poco diferenciado y probablemente permisible para la adherencia, colonización y permanencia del microorganismo, esto garantiza su presencia. Se ha especulado que algunos factores de virulencia (tales como la citotoxina vacuolizante o la proteína asociada a la citotoxina, entre otros) puedan participar importantemente en la persistencia del microorganismo en la mucosa gástrica^{24, 93}.

En relación a la positividad de *H. pylori* en las distintas regiones de la lesión tumoral, por cultivo se encontró que la topografía del microorganismo fue homogénea en todas las regiones (Gráfica 3); sin embargo, por PCR sugeriría una mayor positividad en el centro y periferia de la lesión tumoral (gráfica 7), no obstante en ello no se encontró diferencia significativa; tal resultado es opuesto a lo observado por Tang y cols. por tinción de Warthin-Starry, esto es, ellos hallaron un mayor porcentaje de positividad a *H. pylori* en el tejido normal adyacente comparado con el tejido de la lesión cancerígena⁹¹. Entre las posibles explicaciones de los hallazgos anteriores se encuentra el hecho de que en tejido no tumoral (normal) el microorganismo se reúne en forma de banco de peces y en tejido tumoral este se distribuye en todas direcciones, lo cual puede deberse a que en la mucosa gástrica normal el ambiente es adecuado para el desarrollo del *H. pylori*, mientras que la formación del cáncer de estómago cambia la constitución de la estructura de las células epiteliales y por lo tanto el microambiente de la mucosa, lo cual no permite la sobrevivencia de *H. pylori* y ocasiona la pérdida de este⁹⁴. Sin embargo, en contraste con las observaciones

reportadas, estudios recientes muestran a *H. pylori* adherido a tejido metaplásico intestinal incompleto, esto sugiere que la metaplasia intestinal incompleta representa un epitelio híbrido, el cual comparte características de células mucosas de la superficie gástrica y de células de metaplasia intestinal, en el cual todavía se expresan moléculas de superficie a las cuales *H. pylori* puede adherirse; lo que apoya nuestros hallazgos y resultados, ya que en este estudio se observó que *H. pylori* colonizó de manera similar las zonas predeterminadas y las zonas del tumor⁹⁵.

Por lo que respecta a la positividad de *H. pylori* en los diferentes estadios de cáncer gástrico, se encontró que por cultivo existía una mayor positividad en los estadios avanzados (tabla 5), mientras que por PCR prácticamente no hubo diferencias en ambos estadios (tabla 6); en ambos casos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados son contradictorios con los reportados en la literatura, Kato y cols.⁹⁷ describieron una mayor prevalencia de *H. pylori* en sujetos con cáncer gástrico en estadios tempranos que en sujetos con estadios avanzados (86.5% vs. 75.7%), Deguchi y cols.⁸⁴ encontraron una prevalencia de 88.6% y 80% en estadios tempranos y avanzados, respectivamente, y Tang y cols.⁹¹ encontraron una positividad de 62.5% en estadios tempranos y de 34.4% en avanzados; esta mayor positividad en estadios tempranos que en avanzados sugiere que *H. pylori* podría en parte estar involucrado en la aparición y desarrollo del cáncer gástrico temprano. Cahill y cols.⁹⁸ han sugerido que la infección por *H. pylori* tiene una función importante en la carcinogénesis gástrica temprana, y no influye en los estadios avanzados como en los tempranos.

En la metodología seguida en nuestro estudio se empleó la amplificación de fragmentos de DNA por PCR para el análisis de las biopsias gástricas que fueron cultivo negativo a *H. pylori*, así como para la detección del gen asociado a la citotoxina, ya que es reconocido que esta técnica es altamente sensible y específica, como lo muestran diversos estudios^{78, 99}.

La presencia del gen asociado a la citotoxina (*cagA*) tanto en las cepas de *H. pylori* aisladas como en las biopsias positivas a *H. pylori* por PCR se detectó con la finalidad de identificar si este factor de virulencia tiene una posible contribución en el desarrollo del cáncer gástrico en población mexicana, además de conocer su distribución topográfica. Se ha descrito que la presencia del gen asociado a la citotoxina y de la isla de patogenicidad *cag* (PAI-*cag*) en cepas de *H. pylori*, se asocia al desarrollo de úlcera péptica, gastritis atrófica y cáncer gástrico; por su parte, a las cepas que carecen de estos factores de virulencia no se les ha descrito dicha asociación^{100, 101}, por lo cual, la presencia del gen *cagA* ha sido convencionalmente usado como un marcador de cepas patogénicas. En nuestro estudio, no se encontraron diferencias significativas entre la positividad de *cagA* del grupo de sujetos con dispepsia no ulcerosa comparada con la del grupo de cáncer gástrico en las regiones anatómicas del estómago, además de lo anterior, tampoco se obtuvo significancia en la diferencia de positividad de *cagA* del grupo de cáncer gástrico en las regiones anatómicas vs las regiones de la lesión (gráfica 8); estos resultados están en concordancia con lo previamente observado en otros estudios^{102, 103, 104}; sin embargo, estos hallazgos son controversiales debido a que algunos reportes muestran una alta positividad de *H. pylori cagA* positivo en sujetos con cáncer

gástrico comparados con controles^{73, 86, 105}. La alta positividad de *cagA* en nuestro estudio, independiente de la entidad clínica, sugieren un uso limitado como marcador de virulencia en nuestra población; sumado a ello, no se encontró asociación entre la presencia del gen *cagA* y el desarrollo de cáncer gástrico en nuestra población, como fue descrito en otras poblaciones^{90, 106, 107}. Se ha descrito que la presencia de cepas virulentas (*H. pylori cagA* positivas) no necesariamente resulta en mayor inflamación gástrica y con un alto grado de colonización bacteriana¹⁰⁸.

Es importante destacar que estudios recientes muestran que la presencia del gen *cagA* *per se* no es un indicador de la presencia de la PAI-*cag*, ya que fue observado que existen cepas de *H. pylori* que presentan y expresan el gen *cagA*, pero han perdido o no son funcionales otros genes dentro de la PAI-*cag*; lo que hace que estas cepas puedan ser clasificadas funcionalmente como *cagA* negativas¹⁰⁴ y por lo tanto no sean asociadas al desarrollo de patologías^{100, 101, 109}. Maeda y cols.¹¹⁰ en un estudio realizado en Japón, encontraron que todas las cepas con la presencia parcial de la PAI-*cag* provenían de pacientes con dispepsia no ulcerosa, y que el 70% de las cepas con la PAI-*cag* íntegra fueron de pacientes con úlcera péptica y cáncer gástrico. Mas aun, en el estudio reciente realizado por Kauser y cols.¹¹¹ en donde analizaron cepas de *H. pylori* aisladas de 8 diferentes zonas geográficas en el mundo, encontraron que la mayoría de las cepas presentaban una PAI-*cag* parcial; sin embargo, el 57% de las cepas de Japón, el 18.6% de Perú y el 12% de la India presentaban una isla completa, razón por la cual en nuestro estudio se requiere analizar la integridad de la PAI-*cag* de los aislamientos clínicos. Según los estudios realizados hasta ahora, se cree que posiblemente algo fundamental en la implicación

formación del pedestal. Recientemente, Higashi y cols.¹¹², mostraron que en estos sitios de fosforilación es donde se lleva a cabo la unión de la proteína SHP-2 y que dependiendo del número y secuencias de fosforilación de tirosina, el efecto citopático que presentan las células es mayor, tales como: rearreglos del citoesqueleto, proliferación celular, disgregación celular y movilidad, lo cual puede ser un importante factor en patogénesis¹¹⁴. Adicional a estos hallazgos, Higashi y cols.¹¹² describieron a la proteína SHP-2 y observaron que tiene una mayor afinidad a la secuencia ESS que la de WSS. Estas diferencias estructurales en la proteína CagA podrían estar involucradas en el incremento del riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico en personas que estén infectadas con cepas de *H. pylori* que expresan la proteína CagA con alta afinidad a SHP-2^{38, 115-117}.

La frecuencia de positividad de *cagA* en las regiones anatómicas de sujetos dispépticos fue mayor en el cuerpo y fondo gástrico (gráfica 9), siendo significativas estas diferencias; en contraste, en los sujetos con cáncer gástrico fue inversa la positividad, es decir, las zonas anatómicas con mayor positividad a *cagA*, fueron incisura angular y antro, no encontrándose diferencias significativas. Resultados similares en cuanto a la tendencia de positividad en *cagA* fueron observados por el grupo de Ho y cols.⁸³; sin embargo, esto fue visto en pacientes con dispepsia no ulcerosa, mientras que en nuestro estudio fue en sujetos con cáncer gástrico. Estos resultados son muy contrastantes y de difícil interpretación. Con respecto a la alta positividad en *cagA* encontrada en el fondo y cuerpo gástrico en los sujetos con dispepsia no ulcerosa; esta es controversial, Atherton y cols.¹¹⁸ no encontraron diferencias significativas en la distribución de *H. pylori cagA* positivo en biopsias de

antro y cuerpo. Sin embargo, en un estudio realizado con pacientes mexicanos se encontró a *H. pylori cagA* positivo predominantemente en cuerpo¹⁰², esto es poco entendido ya que se ha sugerido que las cepas de *H. pylori cagA* negativas son más tolerantes al ácido que las cepas de *H. pylori cagA* positivas; recientemente, se observó que cepas de *H. pylori* que poseen un mayor número de repeticiones en el extremo 3' de *cagA*, son más susceptibles a pH 3 y se asocian con mayor daño histológico¹¹⁹. Por lo que se requiere de caracterizar la región 3' de *cagA* de las cepas aisladas en este estudio.

Cuando se comparó la frecuencia de positividad en *cagA*, en la zona tumoral (centro, periferia, + 2 y +5 cm de la lesión), en los aislamientos y biopsias de sujetos con cáncer gástrico, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa; sin embargo, se observó una alta positividad en las regiones de la lesión, excepto a + 2 cm de la lesión (gráfica 10), así como en el estadio avanzado (tabla 7). Estos resultados están acorde a lo reportado por Semino-Mora y cols.¹²⁰, quienes encontraron la presencia de *H. pylori cagA*+ en células precancerosas y cancerosas, por otro lado, al igual que en nuestro estudio, Kokkola y cols.¹²¹ en un estudio realizado en Finlandia, encontraron una alta seroprevalencia de CagA tanto en pacientes con estadios tempranos como en pacientes con estadios avanzados. La transformación neoplásica se ha sugerido que puede estar inducida y sostenida, en parte, por la expresión intracelular de *cagA in vivo*; este efecto podría tener una función biológica importante no solo durante los estadios tempranos de la carcinogénesis gástrica, sino que tal vez en el estado tardío durante este proceso¹²⁰. Estos hallazgos son poco entendidos, debido a que también se ha sugerido que la

presencia de *cagA* solo tiene una función importante en el estado inicial del cáncer gástrico^{100, 101}. Se ha especulado que factores de virulencia como CagA pueden estar implicados en la persistencia del microorganismo en mucosa gástrica^{24, 93}, sin embargo, se desconoce cual es su participación en tejido no diferenciado, ya que este desfavorecería el crecimiento de *H. pylori*⁸⁸.

El desarrollo de cáncer gástrico es altamente complejo e involucra múltiples factores bacterianos, del huésped y ambientales. Sujetos que son infectados con cepas virulentas de *H. pylori* (*cagA*, *vacA* s1, *vacA* m1 y *babA2* positivos) se observa que tienen un mayor riesgo para desarrollar cáncer gástrico, por otro lado, dietas ricas en sales, alimentos ahumados y dietas pobres en frutas y verduras frescas favorecen la carcinogénesis gástrica¹²².

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

- La frecuencia de *H. pylori* por cultivo fue mayor en sujetos con cáncer gástrico que en sujetos con dispepsia.
- Fondo y cuerpo gástrico son los sitios anatómicos con mayor prevalencia de *H. pylori* en los sujetos con cáncer gástrico.
- La frecuencia de *H. pylori* en las regiones anatómicas y de la lesión en los sujetos con cáncer no fue significativamente diferente.
- La presencia de *H. pylori* en estadios tempranos y avanzados de sujetos con cáncer no fue significativamente diferente.
- La frecuencia de *H. pylori cagA* positivo en la población de estudio fue mayor al 70%
- Una asociación entre *H. pylori cagA* positivo y las regiones anatómicas fondo y cuerpo se observó en sujetos con dispepsia.
- La frecuencia de *H. pylori cagA* positivo en sujetos con diferentes estadios de cáncer gástrico fue similar.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

Diversos estudios han mostrado que las cepas de *H. pylori cagA* positivas son más virulentas que las cepas *cagA* negativas. Sin embargo, la alta prevalencia de cepas de *H. pylori cagA* positivas en nuestra población hace que la presencia del gen *cagA* *per se* no sea un predictor importante de enfermedad en la infección por *H. pylori*, por lo que se deberá determinarse si el polimorfismo de la región variable 3' del gen puede diferenciar las cepas de *H. pylori* que puedan asociarse al desarrollo de cáncer gástrico. Ya que se ha observado que la proteína CagA es inyectada por el microorganismo a las células epiteliales gástricas, en donde es fosforilada, posteriormente, esta se une a la fosfatasa SHP-2, activándose la actividad de fosfatasa y por lo tanto induce cambios morfológicos en las células, tales como rearreglos del citoesqueleto, proliferación celular, disgregación celular y movilidad. Por otro lado, la diversidad en la secuencia de aminoácidos en los sitios de fosforilación de tirosina de CagA, pueden proveer una de las más importantes variables en el resultado de la infección por *H. pylori*, por lo que deberá determinarse si las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con cáncer gástrico presentan un mayor grado de fosforilación de tirosina en los motivos EPIYA de la proteína CagA, comparadas con cepas aisladas de gastritis crónica y úlcera péptica.

CAPÍTULO 9

BIBLIOGRAFÍA

1. **Konturek JW.** Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its Pathogenetic Role in Ulcer Peptic, Gastritis and Gastric Cancer. *J Physiol Pharmacol* 2003;54:23-41.
2. **Dunn BE, H Cohen, MJ Blaser.** *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:720-741.
3. **Smith VC, RM Genta.** Role of *Helicobacter pylori* Gastritis in Gastric Atrophy, Intestinal Metaplasia, and Gastric Neoplasia. *Microsc Res Tech* 2000;48:313-320.
4. **Andersen PL, T Wadström.** Basic Bacteriology and Culture. In: Harry LT Mobley, George L Mendz, Stuart L Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM Press. Washington DC, USA. 2001. p. 27-38.
5. **O'Rourke J, G Bode.** Morphology and Ultrastructure. In: Harry LT Mobley, George L Mendz, Stuart L Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM Press. Washington DC, USA. 2001. p. 53-68.
6. **Castillo-Rojas Gonzalo.** *Helicobacter pylori* y el gen asociado a la citotoxina (*cagA*) en pacientes mexicanos con úlcera péptica hemorrágica. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM. Julio 2003.
7. **Ernst, PB.** The Disease Spectrum of *Helicobacter pylori*: The Immunopathogenesis of Gastroduodenal Ulcer and Gastric Cancer. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:615-640.
8. **Versalovic J, JG Fox.** *Helicobacter*. In: Murray PR, EJ Barron, JH Jorgensen, MA Pfaller, RH Tenover. *Manual of Microbiology*. 8TH edition. ASM Press. Washington DC, USA. 2003. p. 915-928.
9. **Tomb JF, O White, AR Kerlavage, RA Clayton, et al.** The Complete Genome Sequence of the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997;388:539-547.
10. **Alm RA, LS Ling, DT Moir, BL King, et al.** Genomic-Sequence Comparison of Two Unrelated Isolates of Human Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999;397:176-180.

11. **Marais A, GL Mendz, SL Hazell, F Megraud.** Metabolism and Genetics of *Helicobacter pylori*: the Genome Era. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63:642-674.
12. **Brown, LM.** *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. *Epidemiol Rev* 2000;22:283-297.
13. **Höcker M, P Hohenberger.** *Helicobacter pylori* Virulence Factors-One Part of a Big Picture. *Lancet* 2003;362:1231-1233.
14. **Lunet N, H Barros.** *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Cancer: Facing the Enigmas. *Int J Cancer* 2003;106:953-960.
15. **Mitchell, HM.** Epidemiology of Infection. In: Harry LT Mobley, George L Mendz, Stuart L Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM Press. Washington, USA. 2001. p. 7-18.
16. **Frenck Jr RW, J Clemens.** *Helicobacter* in the Developing World. *Microbes Infect* 2003;5:705-713.
17. **Covacci A, JL Telford, G Del Giudice, J Parsonnet, et al.** *Helicobacter pylori* Virulence and Genetic Geography. *Science* 1999;284:1328-1333.
18. **Felman, RA.** Epidemiologic Observations and Open Questions About Disease and Infection Caused by *Helicobacter pylori*. In: Mark Achtman, Sebastian Suerbaum. *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology. Horizon Scientific Press. England. 2001. p. 29-51.
19. **Blaser MJ.** *Helicobacter pylori* and Related Organisms. In: Gerald L Mandell, John E Bennett, Raphael Dolin. *Infectious Diseases*. Volumen 2. 4TH edition. Churchill Livingstone Inc. USA. 1995. p. 1956-1964.
20. **Stone MA.** Transmission of *Helicobacter pylori*. *Postgrad Med J* 1999;75:198-200.
21. **Prinz C, N Hafsi, P Voland.** *Helicobacter pylori* Virulence Factors and the Host Immune Response: Implications for Therapeutic Vaccination. *Trends Microbiol* 2003;11:134-138.
22. **Castillo-Rojas G, M Mazari-Hiriart, Y López-Vidal.** *Helicobacter pylori*: Focus on CagA and VacA: Major Virulence Factors. *Salud Pública Mex* 2004;46:538-548.
23. **Blaser MJ, DE Berg.** *Helicobacter pylori* Genetic Diversity and Risk of Human Disease. *J Clin Invest* 2001;107:767-773.
24. **Blaser MJ, JC Atherton.** *Helicobacter pylori* Persistence: Biology and Disease. *J Clin Invest* 2004;113:321-333.

25. **Spohn G, V Scarlato.** Motility, Chemotaxis, and Flagella. In: Harry LT Mobley, George L Mendz, Stuart L Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM Press. Washinton DC, USA. 2001. p. 239-248.
26. **Yoshiyama H, T Nakazawa.** Unique Mechanism of *Helicobacter pylori* for Colonizing the Gastric Mucus. *Microbes Infect* 2000;2:55-60.
27. **Testerman TL, DJ McGee, HLT Mobley.** Adherence and Colonization. In: Harry LT Mobley, George L Mendz, Stuart L Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM Press. Washington DC, USA. 2001. p. 381-417.
28. **Asaka M, AR Sepulveda, T Sugiyama, DY Graham.** Gastric Cancer. In: Harry LT Mobley, George L Mendz, Stuart L Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM Press. Washington DC, USA. 2001. p. 481-498.
29. **Wang J, TG Blanchard, PT Ernst.** Host Inflammatory Response to Infection. In: Harry LT Mobley, George L Mendz, Stuart L Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM Press. Washington DC, USA. 2001. p. 471-480.
30. **Montecucco C, R Rappuoli.** Living Dangerously: How *Helicobacter pylori* Survives in the Human Stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:457-466.
31. **Mobley HLT.** Urease. In: Harry LT Mobley, George L Mendz, Stuart L Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM Press. Washington DC, USA. 2001. p. 179-191.
32. **De Reuse H, S Skouloubris.** Nitrogen Metabolism. In: Harry LT Mobley, George L Mendz, Stuart L Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM Press. Washington DC, USA. 2001. p. 125-133.
33. **Satin B, G Del Giudice, VD Bianca, S Dusi, et al.** The Neutrophil-Activating Protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a Protective Antigen and a Major Virulence Factor. *J Exp Med* 2000;9:1467-1476.
34. **Montecucco C, M Bernard.** Molecular and Cellular Mechanism of Action of the Vacuolating Cytotoxin (VacA) and Neutrophil-Activating Protein (HP-NAP) Virulence Factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes Infect* 2003;5:715-721.
35. **Moran AP.** Molecular Structure, Biosynthesis and Pathogenic Roles of Lipopolysaccharides. In: Harry LT Mobley, George L Mendz, Stuart L Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM Press. Washington DC, USA. 2001. p. 81-95.

36. **O'Toole PW, M Clyne.** Cell Envelope. In: Harry LT Mobley, George L Mendz, Stuart L Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM Press. Washington DC, USA. 2001. p. 69-80.
37. **Shimoyama T, JE Crabtree.** Bacterial Factors and Immune Pathogenesis in *Helicobacter pylori* Infection. Gut 1998;43:S2-S5.
38. **Hatakeyama M** *Helicobacter pylori* CagA - A Potential Bacterial Oncoprotein that Functionally Mimics the Mammalian Gab Family of Adaptor Proteins. Microbes Infect 2003;5:143-150.
39. **Censini S, C Lange, Z Xiang, JE Crabtree, et al.** *cag*, a Pathogenicity Island of *Helicobacter pylori*, Encodes Type I-Specific and Disease-Associated Virulence. Proc Natl Acad Sci, USA 1996;93:14648-14653.
40. **Blanke SR, D Ye.** Alternative Mechanisms of Protein Release. In: Harry LT Mobley, George L Mendz, Stuart L Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM Press. Washington DC, USA. 2001. p. 227-237.
41. **Ivler D, R Rappuoli, JL Telford.** Protein Export. In: Harry LT Mobley, George L Mendz, Stuart L Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM Press. Washington DC, USA. 2001. p. 219-226.
42. **Cascales E, PJ Christie.** The Versatile Bacterial Type IV Secretion Systems. Nat Rev Microbiol 2003;1:137-149.
43. **Covacci A, S Censini, M Bugnoli, R Petracca, et al.** Molecular Characterization of the 128-kDa Immunodominant Antigen of *Helicobacter pylori* Associated With Cytotoxicity and Duodenal Ulcer. Proc Natl Acad Sci, USA 1993;90:5791-5795.
44. **Owen RJ, DE Taylor, GE Wang, L-V van Doorn.** Heterogeneity and Subtyping. In: Harry LT Mobley, George L Mendz, Stuart L Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM Press. Washington DC, USA. 2001. p. 363-378.
45. **Hatakeyama M.** Oncogenic Mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA Protein. Nat Rev Cancer 2004;4:688-694.
46. **Evans DJ, DMM Queiroz, EN Mendes, DG Evans.** Diversity in the Variable Region of *Helicobacter pylori* *cagA* Gene Involves More Than Simple Repetition of a 102-Nucleotide Sequence. Biochem Biophys Res Commun 1998;245:780-784.
47. **Stein M, R Rappuoli, A Covacci.** The *cag* Pathogenicity Island. In: Harry LT Mobley, George L Mendz, Stuart L Hazell. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASM Press. Washington DC, USA. 2001. p. 345-353.

48. **Yamaoka Y, T Kodama, K Kashima, DY Graham, et al.** Variants of the 3' Region of the *cagA* Gene in *Helicobacter pylori* isolates From Patients With Different H. pylori- Associated Diseases. J Clin Microbiol 1998;36:2258-2263.
49. **Yamaoka Y, HMT El-Zimaity, O Gutierrez, N Figura, et al.** Relationship Between the *cagA* 3' Repeat Region of *Helicobacter pylori*, Gastric Histology, and Susceptibility to Low pH. Gastroenterology 1999;117:34-349.
50. **Azuma T, A Yamakawa, S Yamazaki, K Fukuta, et al.** Correlation Between Variation of the 3' Region of the *cagA* Gene in *Helicobacter pylori* and Disease Outcome in Japan. J Infect Dis 2002;186:1621-1630.
51. **Rieder G, W Fischer, R Hass.** Interaction of *Helicobacter pylori* With Host Cells: Function of Secreted and Translocated Molecules. Curr Opin Microbiol 2005;8:67-73.
52. **De Luca A, M De Falco, S Laquinto, G Laquinto.** Effects of *Helicobacter pylori* Infection on Cell Cycle Progression and the Expression of Cell Cycle Regulatory Proteins. J Cell Physiol 2004;200:334-342.
53. **Mimuro H, T Suzuki, J Tanaka, M Asahi, et al.** Grb2 is a Key Mediator of *Helicobacter pylori* CagA Protein Activities. Mol Cell 2002;10:745-755.
54. **Amieva MR, R Vogelmann, A Covacci, LS Tompkins, et al.** Disruption of the Epithelial Apical-Junctional Complex by *Helicobacter pylori* CagA. Science 2003;300:1430-1434.
55. **IARC. Globocan. OMS. En**
<http://wwwdepdb.iarc.fr/globocan/GLOBOframe.htm>
56. **Kumar, Cotran y Robbins.** Patología Humana. 7ª Edición, McGraw-Hill, 2004. Pág. 531-533.
57. **Stadtlander CT, Waterbor JW.** Molecular Epidemiology, Pathogenesis and Prevention of Gastric Cancer. Carcinogenesis. 1999;20:2195-2208.
58. **Stoicov C, R Saffari, X Cai, C Hasyagar, et al.** Molecular Biology of Gastric Cancer: *Helicobacter* Infection and Gastric Adenocarcinoma: Bacterial and Host Factors Responsible for Altered Growth Signaling. Gene 2004;341:1-17.
59. **Piñol-Jiménez F, M Paniagua-Estévez.** Cáncer Gástrico: Factores de Riesgo. Rev Cubana de Oncol 1998;14:171-179.
60. **Correa P.** *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003;12:238s-241s.

61. **Parsonnet J, GD Friedman, DP Vandersteen, Y Chang, et al.** *Helicobacter pylori* Infection and the Risk of Gastric Carcinoma. N Engl J Med 1991;325:1127-1131.
62. **Nomura A, GN Stemmermann, PH Chyou, I Kato, et al.** *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Carcinoma Among Japanese Americans in Hawaii. N Engl J Med 1991;325:1132-1136.
63. **Forman D, DG Newell, F Fullerton, JW Yarnell, et al.** Association between Infection with *Helicobacter pylori* and Risk of Gastric Cancer: Evidence From a Prospective Investigation. BMJ 1991;302:1302-1305.
64. **Helicobacter and Cancer Collaborative Group.** Gastric Cancer and *Helicobacter pylori*: A Combined Analysis of 12 Case Control Studies Nested Within Prospective Cohorts. Gut 2001;49:347-353.
65. **Parkin DM, P Pisani, J Ferlay.** Global Cancer Statistics. 1999;49:33-64.
66. **Hohenberger P, S Gretschel.** Gastric Cancer. Lancet 2003;362:305-315.
67. **Miwa H, MF Go, N Sato.** *H. pylori* and Gastric Cancer: the Asian Enigma. Am J Gastroenterol 2002;97:1106-1112.
68. **Queiroz DMM, EN Mendes, GA Rocha, AMR Oliveira.** *cagA*-Positive *Helicobacter pylori* and Risk for Developing Gastric Carcinoma in Brazil. Int J Cancer 1998;78:135-139.
69. **Yamaoka Y, T Kodama, O Gutierrez, JG Kim, et al.** Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, *vacA* Status and Clinical Outcome: Studies in Four Different Countries. J Clin Microbiol 1999;37:2274-2279.
70. **Gerard M, N Lehn, N Neumayer, T Boren, et al.** Clinical Relevance of the *Helicobacter pylori* Gene for Blood-Group Antigen-Binding Adhesin. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:12778-12783.
71. **Zambon CF, F Navaglia, D Basso, M Rugge, et al.** *Helicobacter pylori* *babA2*, *cagA* and *s1 vacA* Genes Work Synergistically in Causing Intestinal Metaplasia. J Clin Pathol 2003;56:287-291.
72. **Nomura AM, J Lee, GG Stemmermann, RY Nomura, et al.** *Helicobacter pylori* CagA Seropositivity and Gastric Carcinoma Risk in a Japanese American Population. J Infect Dis 2002;186:1138-1144.
73. **Oliveira GA, A Santos, JB Guerra, GA Rocha, et al.** *babA2*- and *cagA*-Positive *Helicobacter pylori* Strains are Associated with Duodenal Ulcer and Gastric Carcinoma in Brazil. J Clin Microbiol 2003;41:3964-3966.

74. **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.
75. **Rugge M, P Correa, MF Dixon, T Hattori, et al.** Gastric Dysplasia: the Padova International Classification. *Am J Surg Pathol* 2000;24:167-176.
76. **Pitcher DG, NA Saunders, RJ Owen.** Rapid Extraction of Bacterial Genomic DNA with Guanidinium Thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 1989;8:151-156.
77. **Sheng-Ang H, JA Hoyle, FA Lewis, AD Secker, et al.** Direct Polymerase Chain Reaction Test for Detection of *Helicobacter pylori* in Humans and Animals. *J Clin Microbiol* 1991;29:2543-2549.
78. **Lage AP, E Godfroid, A Fauconnier, A Burette, et al.** 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.
79. **Mazari-Hiriart M, Y López-Vidal, G Castillo-Rojas, S Ponce de León, et al.** *Helicobacter pylori* and Other Enteric Bacteria in Freshwater Environments in Mexico City. *Arch Med Res* 2001;32:458-467.
80. **Shibata T, I Imoto, EC Gabazza.** Detection of *Helicobacter pylori* in Biopsy of Patients With Gastric Carcinoma. *Biomed Pharmacother* 1997;51:22-28.
81. **Asaka M, T Kimura, M Kato, M Kudo, et al.** Possible Role of *Helicobacter pylori* Infection in Early Gastric Cancer Development. *Cancer* 1994;73:2691-2694.
82. **Tabata H, T Fuchigami, H Kobayashi, Y Sakai, et al.** *Helicobacter pylori* and Mucosal Atrophy in Patients With Gastric Cancer: A Special Study Regarding the Methods for Detecting *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 1999;44:2027-2034.
83. **Ho Y, K Ho, F Ascencio, H Bow.** Neither Gastric Topological Distribution Nor Principle Virulence Genes of *Helicobacter pylori* Contributes to Clinical Outcomes. *World J Gastroenterol* 2004;10:3274-3277.
84. **Deguchi R, A Takagi, H Kawata, H Inoko, et al.** Association Between CagA+ *Helicobacter pylori* Infection and p53, Bax and Transforming Growth Factor-beta-RII Gene ;Mutations in Gastric Cancer Patients. *Int J Cancer* 2001;91:481-485.
85. **Enomoto H, H Watanabe, K Nishikura, H Umezawa, et al.** Topographic Distribution of *Helicobacter pylori* in the Resected Stomach. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10:473-478.

86. **Parsonnet J, GD Friedman, N Orentreich, H Vogelmann.** Risk for Gastric Cancer in People With CagA Positive or CagA Negative *Helicobacter pylori* Infection. *Gut* 1997;40:297-301.
87. **Shin A, HR Shin, D Kang, SK Park, et al.** A Nested Case-Control Study of the Association of *Helicobacter pylori* Infection With Gastric Adenocarcinoma in Korea. *British Journal of Cancer* 2005;92:1273-1275.
88. **Zhang C, Y Nobutaka, W Yun-Lin, W Min, 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.
89. **Hunt R.** Will Eradication of *Helicobacter pylori* Infection Influence the Risk of Gastric Cancer? *Am J of Med* 2004;117:86S-91S.
90. **Lin HJ, P Chin-Lin, L Wen-Ching, W Chew-Wun, et al.** *Helicobacter pylori* cagA, iceA and vacA Genotypes in Patients With Gastric Cancer in Taiwan. *World J Gastroenterol* 2004;10:2493-2497.
91. **Tang Y-L, G Run-Liang, D Bi-Hua, J Ri-Chen, et al.** Detection and Location of *Helicobacter pylori* in Human Gastric Carcinomas. *World J Gastroenterol* 2005;11:1387-1391.
92. **Van Grieken NCT, M Marjan, A Gerrit, A Mario, et al.** *Helicobacter pylori*-Related and Non Related Gastric Cancers do not Differ With Respect to Chromosomal Aberrations. *J Pathol* 2000;192:301-306.
93. **Cover T, S Blanke.** *Helicobacter pylori* VacA, a Paradigm for Toxin Multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:320-332.
94. **McGuigan JE.** *Helicobacter pylori*: the Versatile Pathogen. *Dig Dis* 1996;14:289-303.
95. **Genta RM.** Recognizing Atrophy: Another Step Toward a Classification of Gastritis. *Am J Surgical Pathology* 1996;20:S23-S30.
96. **Ota H, T Katsuyama, S Nakajima, H el-Zimaity, et al.** Intestinal Metaplasia With Adherent *Helicobacter pylori*: a Hybrid Epithelium With Both Gastric and Intestinal Features. *Hum Pathol* 1998;29:846-850.
97. **Kato M, M Asaka, Y Shimizu, A Nobuta, et al.** Multi-Centre Study Group. Relationship Between *Helicobacter pylori* Infection and the Prevalence, Site and Histological Type of Gastric Cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20(Suppl 1):85-89.

98. **Cahill RJ, C Kilgallen, S Beattie, H Hamilton, et al.** Gastric Epithelial Cell Kinetics in the Progresión From Normal Mucosa to Gastric Carcinoma. *Gut* 1996;38:177-181.
99. **Kim DY.** Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection Using Polymerase Chain Reaction in Gastric Biopsy Specimens. *GUT* 1997;41(S):A84,08/308.
100. **Moran AP.** Pathogenic Properties of *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol* 1996;31(Suppl 215):22-31.
101. **Takata T, M Okada, T Shirotani, S Fujimoto, et al.** Analysis of the Expression of CagA and VacA and the Vacuolating Activity in 167 isolates From Patients With Either Peptic Ulcers or Non-Ulcer Dyspepsia. *Am J Gastroenterol.* 1998;93:30-34.
102. **Castillo-Rojas G, MA Ballesteros, S Ponce de Leon, R Morales-Espinosa, et al.** Bleeding Peptic Ulcers and Presence of *Helicobacter pylori* by Various Tests: a Case-Control Study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:1113-1118.
103. **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.
104. **Kidd M, AJ Lastovica, JC Atherton, JA Louw.** Conservation of the *cag* Pathogenicity Island is Associated With *vacA* Alleles and Gastroduodenal Disease in South African *Helicobacter pylori* Isolates. *Gut* 2001;49:11-17.
105. **Miehke S, C Kirsch, K Agha-Amiri, T Gunther, et al.** The *Helicobacter pylori vacA* s1, m1 Genotype and *cagA* is Associated With Gastric Carcinoma in Germany. *Int J Cancer* 2000;87:322-327.
106. **Mitchell HM, SL Hazell, YY Li, PJ Hu.** Serological Response to Specific *Helicobacter pylori* Antigens: Antibody Against *cagA* Antigen is not Predictive of Gastric Cancer in a Developing Country. *Am J Gastroenterol* 1996;91:1785-1788.
107. **Kikuchi S, JE Crabtree, D Forman, M Kurosawa.** Association Between Infections With *cagA*-Positive or Negative Strains of *Helicobacter pylori* and Risk for Gastric Cancer in Young Adults. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3455-3459.
108. **Twisk M, JG Kusters, AG Balk, EJ Kuipers, et al.** Colonization Density and Topographic Localization of *Helicobacter pylori* do not Depend on the *cagA* Status. *J Clin Pathol* 2001;54:771-773.

109. **Nilsson C, A Sillén, L Eriksson, ML Strand, et al.** Correlation Between *cag* Pathogenicity Island Composition and *Helicobacter pylori*-Associated Gastroduodenal Disease. *Infect Immun* 2003;71:6573-6581.
110. **Maeda S, H Yoshida, T Ikenoue, K Ogura, et al.** Structure de *cag* Pathogenicity Island in Japanese *Helicobacter pylori* Isolates. *Gut* 1999;44:336-341.
111. **Kauser F, AA Khan, MA Hussain, IA Carroll, et al.** The *cag* Pathogenicity Island of *Helicobacter pylori* is Disrupted in the Majority of Patient Isolates From Different Human Populations. *J Clin Microbiol* 2004;42:5302-5308.
112. **Higashi H, R Tsutsumi, A Fujita, S Yamazaki, et al.** Biological Activity of the *Helicobacter pylori* Virulence Factor CagA is Determined by Variation in the Tyrosine Phosphorylation Sites. *Proc Natl Acad Sci, USA* 2002;99:14428-14433.
113. **Backert S, S Moese, M Selbach, V Brinkmann, et al.** Phosphorylation of Tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA Protein is Essential for Induction of a Scattering Phenotype in Gastric Epithelial Cells. *Mol Microbiol* 2001;42:631-644.
114. **Azuma T, S Yamazaki, A Yamakawa, M Ohtani, et al.** Association Between Diversity in the Src Homology 2 Domain-Containing Tyrosine Phosphatase Binding Site of *Helicobacter pylori* CagA Protein and Gastric Atrophy and Cancer. *JID* 2004;189:820-827.
115. **Peek RM.** Orchestration of Aberrant Epithelial Signaling by *Helicobacter pylori* CagA. *Sci STKE* 2005, pe14 (2005).
116. **Lax AJ.** Opinion: Bacterial Toxins and Cancer - A Case to Answer? *Nat Rev Microbiol* 2005;3:343-349.
117. **Zhu YL, S Zheng, K Quian, PC Fang.** Biological Activity of the Virulence Factor *cagA* of *Helicobacter pylori*. *Chin Med J* 2004;117:1330-1333.
118. **Atherton JC, KT Tham, RM Peek, TL Cover, et al.** Density of *Helicobacter pylori* Infection *in vivo* as Assessed by Quantitative Culture and Histology. *J Infect Dis* 1996; 174:552-556.
119. **Karita M, S Matsumoto, T Kamei.** The Size of *cagA* Based on Repeat Sequence has the Responsibility of the Location of *Helicobacter pylori* in the Gastric Mucus and the Degree of Gastric Mucosal Inflammation. *Microbiol Immunol* 2003;47:619-630. -

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

120. **Semino-Mora C, SQ Doi, Marty A, V Simko, et al.** Intracellular and Interstitial Expression of *Helicobacter pylori* Virulence Genes in Gastric Precancerous Intestinal Metaplasia and Adenocarcinoma. *J Infect Dis* 2003;187:1165-1177.
121. **Kokkola A, J Louhimo, P Puolakkainen, H Alfthan, et al.** *Helicobacter pylori* Infection and Low Serum Pepsinogen I Level as Risk Factors for Gastric Carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11:1032-1036.
122. **Zagari RM, F Bazzoli.** Gastric cancer: Who is at Risk? *Dig Dis* 2004;22:302-305.