



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudio de Posgrado
E Investigación

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES
DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO

TÍTULO DE LA TESIS:

“BÚSQUEDA DE UN MARCADOR EPITELIAL TEMPRANO
PARA EL DESARROLLO DE CÁNCER GÁSTRICO EN
PACIENTES INFECTADOS POR *HELICOBACTER PYLORI*”

Trabajo de Investigación que presenta:
DRA. ERIKA FRANCO FLORES

Para obtener el Diploma de la Especialidad:
GASTROENTEROLOGÍA

Asesor de Tesis:
DRA. MA. ANTONIETA XÓCHITL GARCÍA SAMPER
DRA. ERIKA P. RENDÓN HUERTA

No. De Registro de Protocolo:
397.2007

2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



[Signature]
Dra. María del Carmen García Martínez
Coordinadora de Capacitación
Desarrollo e Investigación

[Signature]
Dr. Guebaldo Patiño Carranza
Jefe de Enseñanza

[Signature]
Dra. Martha Eunice Rodríguez Arellano
Jefe de Investigación

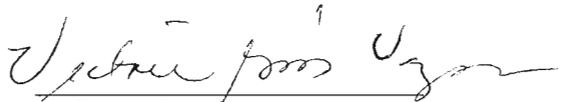




Dra. María Antonieta Xóchitl García Samper
Profesor Titular



Dra. Erika P. Rendón Huerta
Asesora de Tesis



Dra. Victoria Gómez Vázquez
Vocal Comité de Investigación

“Búsqueda de un marcador epitelial temprano para el desarrollo de cáncer gástrico en pacientes infectados por *Helicobacter pylori*”.

RESUMEN

Antecedentes: En 1983 Warren y Marshall descubrieron un microorganismo espiralado y gramnegativo llamado *Helicobacter pylori* que actualmente afecta a más del 50% de la población mundial con mayor prevalencia en los países en vías de desarrollo. Tras múltiples estudios e investigaciones se le ha clasificado como un carcinógeno clase I. La infección por *Helicobacter pylori* se asocia con un 70% de los casos de gastritis crónica activa, con el 95% de las úlceras duodenales y con el 60% de los pacientes con cáncer. La hipótesis que relaciona la presencia de esta bacteria con el desarrollo de cáncer gástrico se basa en el daño progresivo que ésta produce con la aparición de gastritis superficial, gastritis crónica y gastritis atrófica, existiendo en esta última etapa una lesión severa que induce cambios histológicos como metaplasia intestinal, displasia y eventualmente cáncer. Por otro lado a nivel molecular se han identificado a unas proteínas integrales de membrana llamadas claudinas que exhiben distintos patrones de expresión en los tejidos y tipos celulares específicos. Contribuyen a la actividad de adhesión celular y son el principal determinante de la función de barrera de las uniones estrechas celulares. Se ha visto que su expresión está frecuentemente alterada en varios cánceres aunque el papel exacto de esto no está todavía claro, sin embargo se ha propuesto que éstas pueden promover la invasión celular, la movilidad y/o supervivencia, sugiriendo funciones potenciales en la tumorigénesis y metástasis. Investigaciones preliminares sugieren que factores de virulencia de *Helicobacter pylori* modulan las funciones de barrera de los epitelios, aumentando la permeabilidad celular y alterando de la misma forma la función y expresión de las claudinas. Estos eventos parecen ser importantes para promover la transformación celular.

Objetivo: Determinar la existencia de un marcador epitelial temprano para el desarrollo de cáncer gástrico en pacientes infectados por *Helicobacter pylori*.

Material y métodos: Se realizó un estudio observacional, transversal, prospectivo, exploratorio y abierto en el que se incluyeron 27 pacientes infectados por *Helicobacter pylori* de la consulta externa del servicio de Gastroenterología del Hospital Regional “Licenciado Adolfo López Mateos”. Cada uno fue entrevistado y tras el llenado de un cuestionario sencillo les fue practicado el estudio endoscópico respectivo para la obtención de las biopsias gástricas que fueron recolectadas y llevadas al laboratorio de la facultad de Medicina de la UNAM para su procesamiento y análisis mediante estudios inmunohistoquímicos y de Western blot.

Resultados: El análisis molecular reveló que de 15 claudinas probadas, se detectó la expresión de claudinas 1, 2, 3, 4, 7 y 10. La expresión de estas proteínas se localizó predominantemente en la fracción de membrana. Las claudinas 1, 3 y 4 se observaron también en las fracciones de citoesqueleto y las claudinas 2, 7 y 9 en la fracción de citosol.

Conclusiones: Se encontró que en los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* de nuestra investigación los hallazgos a nivel molecular concuerdan con diversos reportes en los que se muestra la deslocalización de claudinas en el citosol.

“Study of an early epithelial marker for gastric cancer development in *Helicobacter pylori* patients”

ABSTRACT

BACKGROUND: In 1983 Warren and Marshall discovered a spiral gramnegative microorganism actually called *Helicobacter pylori* which infects more than 50% of the world population, showing highest prevalence in developing countries. After numerous studies and long research, *Helicobacter pylori* has been classified as a Class I carcinogen. *Helicobacter pylori* infection is associated with 70% of active chronic gastritis, 95% of duodenal ulcers and 60% of gastric cancer cases. The hypothesis that relates the presence of *H. pylori* with gastric cancer development is based on the progressive damage that the bacteria produces, with appearance of superficial, chronic and atrophic gastritis. This last phase shows the presence of a severe lesion inducing histological changes such as intestinal metaplasia, dysplasia, and eventually cancer. Along with the mentioned changes, in a molecular level structural proteins called “claudins” have been described. These show multiple patterns of expression at the tissular and cellular levels. Claudins contribute with cellular adhesion activity and barrier function in the intercellular junction. Their expression is frequently altered in different malignant tumors, but the physiological role of these changes is still unknown. A promoting activity related with cellular invasion has been associated with these molecules, suggesting an important role of claudins in tumoral genesis and metastasis. Preliminar studies suggest that *Helicobacter pylori* virulence factors can modulate the barrier function of the epithelial linings, increasing cellular permeability and altering the expression and function of claudins. These events seem to be important in promoting cellular transformation.

OBJECTIVE: Determine the presence of an early epithelial marker for the gastric cancer development in *Helicobacter pylori* infected patients.

MATERIALS AND METHODS: An observational, transversal, prospective, exploratory and open study was performed in 27 *Helicobacter pylori* infected patients, derived from the Gastroenterology service of the “Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos”. Each patient was individually examined, and after filling a simple questionnaire, an endoscopic study was performed to obtain gastric mucosa biopsies. These biopsies were collected and then transported to the Medicine Faculty of the UNAM to be processed and analyzed using immunohistochemical studies and Western-blot assays.

RESULTS: Molecular analysis of 15 claudins revealed expression of claudins 1, 2, 3, 4, 7 and 10. The expression of these proteins was predominantly detected in the membrane fraction. Claudins 1, 3 and 4 were also observed in the cytoskeletal fraction and claudins 2, 7 and 9 in the cytosolic fraction.

CONCLUSION: In our study, molecular findings detected in patients with *Helicobacter pylori* infection were concordant with multiple previous literature reports that already demonstrated a dislocation of claudin molecules in the cell cytoplasm.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios, por iluminar mi camino y llenar mi vida de bendiciones y retos que me han hecho madurar y ser una persona de bien.

En segundo lugar, a mis padres y hermanos, por apoyarme en todo momento y retroalimentarme cada vez que deseo darme por vencida. Con su orientación y esfuerzo me encuentro en donde estoy aunque sé que aún falta mucho camino por recorrer y obstáculos que superar para llegar a mi meta.

En tercer lugar, agradezco a la Dra. Gabriela Salas Pérez, que me dio la oportunidad de continuar con mi preparación y me abrió las puertas de este hospital, apoyándome en todo momento y ayudándome a superar las pruebas cotidianas de nuestra profesión, ha sido un pilar en mi vida profesional. Mil gracias.

En cuarto lugar y no menos importante agradezco a mi asesora de tesis y Jefa de Servicio, Dra. María Antonieta Xóchitl García Samper por haberme aceptado como parte de su equipo de trabajo, iluminarme con sus conocimientos y cuidarme durante estos tres años como una madre lo hace con sus hijos, nunca olvidaré los momentos vividos bajo su tutela. Muchas gracias.

Gracias también a la Dra. Erika Rendón Huerta por haberme asesorado en el desarrollo del presente trabajo y por haber tenido el tiempo y la paciencia requeridos para su elaboración.

Agradezco de igual manera a mis compañeros residentes y a la Dra. Ivette Karla Cortés Rubio por su apoyo e intervención en la inclusión de los pacientes para mi proyecto.

Un agradecimiento muy especial para la Dra. Carmen Cruz Parada, el Dr. Oscar Govea González, el Dr. Elio Alberto Cruz y el personal de enfermería del Servicio de Endoscopía de nuestra Unidad por haber tenido el tiempo, dedicación y disponibilidad en la realización de los estudios, no lo olvidaré. Gracias.

Y por último gracias a los principales personajes de esta historia, nuestros pacientes, por aceptar participar en esta investigación que aportará un granito de arena más para mejorar nuestra calidad de atención médica en su favor.

Í N D I C E

Introducción.....	8
Antecedentes.....	10
Justificación.....	24
Planteamiento del problema.....	25
Hipótesis.....	26
Objetivos.....	27
Metodología.....	28
Consideraciones éticas.....	31
Resultados.....	32
Discusión.....	35
Conclusiones.....	38
Bibliografía.....	39
Anexos.....	41
Tablas.....	41

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es la bacteria descrita más recientemente que ha causado mayor revuelo a nivel mundial en medicina (descubierta en 1983) pues se considera que afecta a más del 50% de la población del mundo con una prevalencia mayor en los países en vías de desarrollo que en los desarrollados.

Su importancia ha sido tal que a menos de dos décadas de su descubrimiento ya se conoce la secuencia de su genoma, se ha descrito un sin fin de factores de virulencia y se acepta su participación en la causalidad de las gastritis, úlceras pépticas e incluso se asocia con algunos tipos de cáncer gástrico. La OMS encontró en 1994 que había suficiente evidencia epidemiológica e histológica para clasificar a *Helicobacter pylori* como carcinógeno clase I.

Por otro lado, el cáncer gástrico ocupa el 2º lugar entre las neoplasias gástricas de diagnóstico más frecuente a nivel mundial y desafortunadamente en países en vías de desarrollo el diagnóstico se realiza generalmente en estadios avanzados, lo que se asocia con una alta tasa de mortalidad. El adenocarcinoma gástrico se clasifica en dos tipos histológicos distintos: el intestinal y el difuso. El intestinal predomina en poblaciones de alto riesgo y es más común en personas de edad avanzada, es precedido por continuos cambios histológicos tales como gastritis activa, atrofia intestinal, metaplasia y displasia.

La evolución histológica del adenocarcinoma gástrico de este tipo lleva implícitos los cambios histológicos descritos en las infecciones por *Helicobacter pylori* por lo que este agente se ha incriminado en la etiología del cáncer gástrico.

La infección por *Helicobacter pylori* se asocia con un 70% de los casos de gastritis crónica activa, con el 90 – 95% de las úlceras duodenales y con un 60% de los pacientes con cáncer. La hipótesis corriente que relaciona a *Helicobacter pylori* con el desarrollo de cáncer gástrico de tipo intestinal se basa en un daño progresivo inducido por la presencia prolongada de la bacteria que lleva a lesiones que evolucionan de una gastritis superficial, gastritis crónica, gastritis atrófica y en esta última etapa existe una infiltración inflamatoria importante con agregados foliculares linfoides que destruyen la mucosa a tal grado que ocurre pérdida de la función y se induce una metaplasia intestinal, displasia y eventualmente el desarrollo de cáncer.

Mediante nuestro trabajo, queremos sumergirnos en este amplio contexto para incrementar el conocimiento sobre la relación existente entre esta bacteria llamada *Helicobacter pylori* y el cáncer gástrico.

ANTECEDENTES

Desde el descubrimiento de *Helicobacter pylori* en 1983 por Warren y Marshall, el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad gastrointestinal superior ha cambiado enormemente. Se ha reportado un alto riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico en sujetos con exámenes serológicos positivos para *Helicobacter pylori* (1). La Asociación Mundial de la Salud y la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer determinaron en 1994 que hay suficiente evidencia epidemiológica e histológica para clasificar a *Helicobacter pylori* como un carcinógeno definitivo. Muchos estudios han encontrado asociación de *Helicobacter pylori* con cáncer gástrico. Uemura y colaboradores reportaron que cada año en Japón, el cáncer gástrico se desarrolla en 300,000 (0.5%) de las 60 millones de personas quienes son *Helicobacter pylori* positivas, lo que significa que esta entidad estará presente en el 5% de las personas infectadas con dicha bacteria en una década (1).

CARACTERÍSTICAS:

Helicobacter pylori es un microorganismo espiralado gramnegativo, de crecimiento lento, microaerófilo y muy móvil, cuya característica bioquímica más sorprendente es la producción abundante de ureasa. Esta enzima es uno de varios factores importantes para la colonización y constituye un marcador indirecto importante de la presencia del microorganismo porque en ella se basan las pruebas de ureasa rápida en las biopsias y la prueba del aliento de la urea y funciona como antígeno para la detección serológica. *H. pylori* es atraído por el epitelio gástrico (estómago y áreas de metaplasia gástrica fuera del estómago). La infección por *Helicobacter pylori* desencadena respuestas inflamatorias e inmunes importantes que duran toda la vida, salvo que se cure la infección (2).

EPIDEMIOLOGÍA:

La prevalencia de *Helicobacter pylori* en individuos sanos varía de acuerdo con la edad, la clase socioeconómica y el país de origen. La infección se suele adquirir en la infancia. En los países en vías de desarrollo los niños por lo general se infectan a los 10 años de edad, mientras que en los países desarrollados se observa un incremento de la frecuencia de la infección relacionado con la edad (2).

En los Estados Unidos la infección por *Helicobacter pylori* disminuyó alrededor del 10% en los individuos blancos de clase media y alta de 50 años o menos, pero aún es frecuente en la población con desventajas sociales y en la gran cantidad de inmigrantes (2). En países desarrollados la prevalencia puede variar entre los diferentes grupos étnicos con estado socioeconómico similar. La explicación de esta observación tiene componentes ambientales y genéticos del huésped. Se ha encontrado entre los adultos de mediana edad una prevalencia cercana al 80% en muchos países en desarrollo, comparado con 20 a 50% en países industrializados (3).

La infección es adquirida por ingestión oral de la bacteria y es transmitida principalmente entre familias durante la niñez. Se ha visto que como en los países industrializados, la transmisión directa de persona a persona por vómito, saliva o heces predomina; las rutas de transmisión adicional, como el agua quizás sean importantes en países en desarrollo.

VIRULENCIA:

Los factores de virulencia de *Helicobacter pylori* se pueden dividir en:

- a) Factores de colonización: flagelos (para la motilidad), ureasa y factores de adherencia.
- b) Factores responsables de lesión tisular: lipopolisacáridos, reclutamiento de leucocitos y factores activadores, citotoxina vacuolante (VacA), antígeno asociado con la citotoxina (CagA), proteína inflamatoria de la membrana externa (OipA) y proteínas de choque térmico (HspA, HspB).

La toxina vacuolante (VacA) y el antígeno asociado a la citotoxina (CagA) posiblemente sean peptidoglicanos y son producidas mediante un sistema de secreción tipo IV. La primera opera dentro de las células causando su vacuolización, oligomeriza y forma canales anio-selectivos en la membrana plasmática y en la membrana endosomal que conduce a disrupción del tráfico normal de la membrana. Además promueve el proceso inflamatorio al favorecer la liberación de citocinas proinflamatorias (4). Las vacuolas son endocíticamente activas (5).

Otros efectos son el de intoxicar a un extenso tipo de células incluyendo las del epitelio gástrico y células inmunitarias predisponiendo a múltiples y diferentes alteraciones celulares (altera la maduración de fagosomas, interfiere con la presentación de antígenos por los linfocitos B, inhibe la producción de interleucina 2 necesaria para la viabilidad y proliferación de los linfocitos T, entre otras) (5).

Por otro lado CagA, promueve la dispersión de la célula interactuando directamente con el receptor c-Met. Este fenotipo de dispersión celular simula el producido por el factor de crecimiento del hepatocito, también conocido como factor de dispersión que participa en varios aspectos de la carcinogénesis incluyendo las metástasis (4).

HISTOLOGÍA Y PATOGENIA:

Las manifestaciones histológicas de la infección muestran una lesión focal de las células epiteliales además de un infiltrado inflamatorio en la lámina propia que está compuesto por leucocitos polimorfonucleares, eosinófilos y células mononucleares. Entre éstas últimas se incluyen linfocitos B y T, y normalmente implican el desarrollo de folículos linfoides, monocitos y células plasmáticas. El componente linfocitario de la respuesta inflamatoria se denomina tejido linfoide asociado con la mucosa. Las biopsias del cuerpo gástrico también suelen revelar inflamación, pero menos grave que en el antro. En pacientes con úlcera duodenal la gastritis habitualmente es grave en el antro y moderada, leve o incluso ausente en el cuerpo (2). En algunos individuos la gastritis crónica superficial por *Helicobacter pylori* progresa con el tiempo hasta una gastritis atrófica con incremento anual de la prevalencia del 1 al 3% en individuos sanos.

Este tipo de gastritis atrófica genera tres patrones distintos: gastritis atrófica corporal predominante (de tipo difusa), gastritis atrófica antral predominante y gastritis atrófica multifocal (corporal y antral). A medida que avanza el grado de atrofia, la presencia de infección activa por *Helicobacter pylori* parece disminuir, quizás en función de la transformación de la cubierta gástrica de células epiteliales superficiales normales en una metaplasia intestinal en la que rara vez aparece la bacteria. La hipoclorhidria también puede crear un ambiente hostil para el *Helicobacter pylori* por que en ausencia de ácido otros microorganismos pueden sobrevivir en el estómago y compiten con él. El mecanismo por el cual la lesión de la mucosa gástrica progresa desde la gastritis superficial a la atrofia no está claro y puede ser multifactorial. El factor principal puede ser ambiental, ya que la proporción de la población infectada varía en forma notable en las diferentes áreas geográficas. La velocidad con la que progresa la gastritis crónica superficial hacia la gastritis atrófica del cuerpo y el fundus varía ante las diferentes situaciones clínicas.

Suerbaum y colaboradores comentan que el curso clínico de la infección es muy variable e influenciado por factores microbianos y del huésped. El patrón y distribución de la gastritis se correlaciona enormemente con el riesgo de secuelas clínicas como son úlceras duodenal o gástrica, atrofia de la mucosa, carcinoma gástrico o linfoma gástrico. Los pacientes con gastritis de predominio antral (la forma más común de gastritis por *Helicobacter pylori*) están predispuestos a formar úlceras duodenales, mientras que los pacientes con gastritis de predominio en el cuerpo y con atrofia multifocal tienen principalmente úlceras gástricas, atrofia gástrica, metaplasia intestinal y finalmente carcinoma gástrico (3).

La infección por *Helicobacter pylori* incrementa significativamente el riesgo de presentar linfoma MALT (mucosa associated lymphoid tissue). Del 72 al 98% de los pacientes que lo padecen están infectados con *Helicobacter pylori* (3).

Hansson y colaboradores reportaron en Suiza que el *Helicobacter pylori* quizás afecta los estadios tempranos de la carcinogénesis gástrica induciendo gastritis crónica, en la cual hay formación de radicales libres por las células inflamatorias, producción de óxido nítrico, nitratos y nitrosaminas por los macrófagos, e intensa renovación celular (6). Además que la infección por *Helicobacter pylori* relacionada con atrofia gástrica es más pronunciada en pacientes que presentan úlcera gástrica. Esta atrofia en la cual hay pérdida de la acidez gástrica contribuye a que la flora gástrica bacteriana promueva la formación endógena de compuestos nitrogenados. Además la infiltración de leucocitos en la mucosa gástrica, combinado con un Ph alcalino en el jugo gástrico genera niveles bajos de ácido ascórbico y una disminución en el bloqueo de la nitrosaminación.

Estos resultados sugieren, que las úlceras gástricas y el cáncer gástrico tienen factores etiológicos en común (6).

CÁNCER GÁSTRICO:

EPIDEMIOLOGÍA:

El adenocarcinoma gástrico ha sido una de las principales causas de mortalidad por cáncer en el mundo, en 1996 todavía era la segunda causa de muerte por cáncer con 628.000 defunciones por año (7).

Existe una definida variabilidad geográfica para el cáncer gástrico y las mayores tasas se encuentran en Oriente. Japón ocupa el primer lugar en incidencia en el mundo y el cuarto lugar en mortalidad seguido por Corea del Sur, Costa Rica y la ex Unión Soviética. Áreas con baja incidencia son América del Norte, Australia, Europa occidental y África (7).

En 1930, era la principal causa de muerte por cáncer en el hombre y la tercera en la mujer en los Estados Unidos y para 1997 era la octava causa de muerte por cáncer con una cantidad estimada de 22.800 nuevos casos diagnosticados con un resultado de 14.000 muertes y un costo aproximado de 61.8 millones de dólares en cuidados sanitarios (7).

En los Estados Unidos la mayor parte de los afectados tienen de 65 a 74 años y una edad media al momento del diagnóstico de 70 años para el hombre y 74 años para la mujer (7). Cuando el cáncer gástrico afecta a pacientes más jóvenes la relación hombre-mujer se acerca a 1, existe alta preponderancia de sangre tipo A, se asocia a antecedentes familiares de cáncer y hay mayor proporción de la forma difusa por sobre la forma intestinal. Desde la década de 1960 la población negra americana ha tenido una tasa de mortalidad por cáncer gástrico de casi el doble que la población blanca. Los aborígenes americanos y los hispanoamericanos también poseen un riesgo en dos veces mayor de desarrollar esta neoplasia que la población blanca. En términos de sexo, tanto los hombres de raza negra como los de raza blanca poseen una tasa de cáncer gástrico que duplica la de las mujeres y así se registra en todo el mundo. La distribución por área del estómago afectado es de 39% para el tercio proximal, 17% en el tercio medio, 32% en el tercio distal y 12% que compromete la totalidad del estómago.

ETIOPATOGENIA:

Dentro de los factores de riesgo se encuentran los antecedentes familiares, causas ambientales como la infección por *Helicobacter pylori*, dieta, tabaquismo, alcohol y bajo nivel socioeconómico.

Algunos estudios prospectivos en los Estados Unidos e Inglaterra han mostrado un aumento de 3 a 8 veces en las tasas de cáncer gástrico en los pacientes con infección por *Helicobacter pylori* en comparación con controles de la misma edad sin esta infección (7).

Se han propuesto numerosos mecanismos para la inducción del cáncer gástrico por *Helicobacter pylori*. Uno de ellos parece ser la inflamación crónica, causada por la infección que acarrea numerosas consecuencias. Conlleva al aumento del estrés oxidativo con la formación de radicales libres de oxígeno capaces de dañar al DNA e incrementar la producción de citocinas dando como resultado el aumento de la renovación celular y la reparación inadecuada del DNA (7). En general se ha visto que la inducción de respuesta a la citosina TH1 está fuertemente ligada con el aumento de las tasas de cáncer gástrico. La combinación de la infección por esta bacteria y la respuesta inflamatoria resultante lleva al incremento de la proliferación celular y de los índices de apoptosis in vivo. Mientras que el aumento de la apoptosis puede deberse a la inflamación y quizás a la interacción bacteriana directa, el aumento de la proliferación celular podría ser secundario a la hipergastrinemia inducida por *Helicobacter pylori* y a la inducción de la vía de la proteína cinasa activadora de la mitosis (MAPK). El incremento en la proliferación gástrica se ha asociado con índices elevados de metástasis ganglionares y peor pronóstico. Otro efecto posible de la infección por *Helicobacter pylori* que mediaría el desarrollo de cáncer gástrico es la menor regulación de la catenina alfa y de la cadherina E. Esta última sirve como un mediador de la adhesión intercelular dentro de las uniones adherentes en la zonula. Se ha descrito la pérdida de su regulación en las biopsias de antro de pacientes infectados con *Helicobacter pylori*. Los dominios citoplásmicos de la E-cadherina interactúan con las cateninas alfa y beta, por lo que las alteraciones en este sistema desempeñan un importante rol en la iniciación tumoral y progresión (8).

La pérdida de la expresión de la E-cadherina en las células epiteliales se asocia con la adquisición del fenotipo mesenquimal. La transición al epitelio mesenquimal ocurre durante las fases cruciales del desarrollo y progresión tumoral. El factor envuelto en esta transición está representado por el factor de crecimiento del hepatocito o factor dispersante que activa al receptor c- Met y promueve el crecimiento de las células epiteliales y su supervivencia además de la dispersión celular que estimula la disociación y dispersa las colonias de células epiteliales adquiriendo una morfología fibroblástica (8).

Un estudio reciente realizado en pacientes infectados de Escocia y Polonia sugiere que ciertos genotipos específicos de IL-1 aumentan el riesgo de desarrollar tanto gastritis atrófica como cáncer gástrico. Se cree que estos genotipos incrementan la producción de interleucina-1-beta, la cual es una citosina proinflamatoria importante e inhibidora de la secreción ácida (7).

La supresión a largo plazo de la secreción ácida por inhibidores de la bomba de protones en individuos infectados por *Helicobacter pylori* también incrementa el riesgo de infección del cuerpo gástrico y de atrofia de la mucosa.

Los trastornos premalignos incluyen la gastritis crónica atrófica, la metaplasia intestinal, la displasia gástrica y los pólipos gástricos. La gastritis crónica atrófica es definida como la pérdida de tejido glandular especializado de su región gástrica correspondiente y ha sido asociada con un aumento de casi 6 veces del riesgo relativo de desarrollo de la forma intestinal del cáncer gástrico. El aumento de la severidad de la gastritis se correlaciona con mayor incidencia de cáncer gástrico. Hay dos formas de gastritis atrófica, la más común es la multifocal, usualmente secundaria a la infección por *Helicobacter pylori* y asociada con metaplasia. La atrofia gástrica provoca disminución en la producción de ácido (aclorhidria), la cual predispone al sobrecrecimiento bacteriano de microorganismos diferentes al *Helicobacter*, al aumento en la formación de nitrosaminas y al aumento de la secreción de ascorbato hacia la luz gástrica. A su vez, los bajos niveles de ácido observados dan como resultado niveles aumentados de gastrina, factor de crecimiento conocido y posible riesgo para el cáncer gástrico.

HISTOLOGÍA:

El adenocarcinoma gástrico es generalmente subdividido en dos tipos histológicos basados en la clasificación de Lauren (1965). Reconoce dos categorías: el tipo intestinal (bien diferenciado) y el tipo difuso. El tipo intestinal es más común, ocurre en pacientes ancianos y está más ligado a factores ambientales y dietéticos. Histológicamente se caracteriza por estructuras tubulares parecidas a glándulas intestinales. En contraste, el tipo difuso es menos común, afecta a pacientes jóvenes y tiene peor pronóstico. Casos ocasionales de este tipo histológico tienen origen genético primario, asociados con mutaciones en el gen cadherina-E. El tipo difuso es más pobremente diferenciado, carece de estructuras glandulares y es más agresivo.

Houghton y colaboradores en estudios recientes mostraron que ambos tipos de cáncer gástrico intestinal y difuso están fuertemente asociados con la infección por *Helicobacter pylori* (9).

Uemura y colaboradores en Japón sugieren en sus investigaciones que los pacientes con infección por *Helicobacter pylori* y gastritis atrófica severa, gastritis de predominio en cuerpo, o ambas, junto con metaplasia intestinal tienen un alto riesgo para cáncer gástrico de tipo intestinal (1).

Hay datos que confirman la hipótesis de Correa el cual propone que la gastritis atrófica severa acompañada de metaplasia intestinal causada por infección persistente por *Helicobacter pylori* está estrechamente relacionada con el desarrollo de cáncer gástrico de tipo intestinal (9).

Estudios epidemiológicos e histopatológicos han mostrado que el desarrollo de cáncer gástrico tipo difuso también está asociado con la infección por *Helicobacter pylori*. El estudio de Uemura y colaboradores también apoya la hipótesis de Sipponen y Solcia, donde el cáncer gástrico tipo difuso se desarrolla durante la progresión de gastritis atrófica en pacientes con infección por esta bacteria y está particularmente asociada con gastritis activa (1). En conclusión encontraron que la infección por *Helicobacter pylori* está asociada con el desarrollo de ambos tipos intestinal y difuso de cáncer gástrico y que entre los pacientes infectados, aquellos con atrofia severa acompañada de metaplasia intestinal, gastritis de predominio en el cuerpo o ambas están particularmente en alto riesgo.

CLAUDINAS:

En el trabajo de investigación de Chiba et al del año 2007, se realiza una descripción detallada de las proteínas transmembranales de las uniones estrechas (UE). En dicho trabajo se comenta que las uniones estrechas constituyen uno de los principales complejos intercelulares que contribuyen por un lado a la función de barrera paracelular semipermeable para el transporte de iones, solutos y agua y por otro a la función de cerca, dividiendo los dominios apical y basolateral y evitando el flujo de fosfolípidos y proteínas de membrana de la región apical a la región basal y viceversa. La función de estas uniones también es muy importante en la transducción de señales ya que actúa a través de un complejo proteico multifuncional tanto en células epiteliales como en células endoteliales de vertebrados. Numerosos estudios han revelado que las UE están constituidas por varios componentes moleculares incluyendo proteínas integrales de membrana como ocludina, claudinas, moléculas de adhesión celular y tricelulina, así como un número cada vez más extenso de proteínas de andamiaje celular (10). La identificación y caracterización de estas proteínas ha conducido a revelaciones de la naturaleza molecular de estas

uniones. También se observan en las células del endotelio vascular y mesoteliales así como en varios otros tipos de células. Por microscopía electrónica, las uniones estrechas aparecen como series de uniones de membrana muy cerradas entre células adyacentes. Además como otras uniones célula-célula y célula-matriz extracelular, las uniones estrechas funcionan como un complejo multifuncional coordinando una variedad de moléculas de señalamiento y tráfico vesicular para regular procesos como la diferenciación celular, proliferación y polaridad celular. Estas funciones son críticas para las células ya que gracias a éstas se establecen distintos compartimientos tisulares dentro del cuerpo y se mantiene la homeostasis. Se sabe también que las alteraciones en las funciones de las uniones estrechas son muy probablemente la causa y/o contribuyen a una variedad de condiciones patológicas como la enfermedad inflamatoria intestinal, infecciones y cánceres así como edema vasogénico y metástasis vía hematógena.

Estructura y distribución de las claudinas:

Se describe que las claudinas son proteínas de 18 a 27 kDa con un amino terminal (N-terminal) citoplásmico corto, dos asas extracelulares y un carboxilo terminal (C-terminal) citoplásmico. La familia de claudinas consiste de 24 miembros reportados en ratón y seres humanos y exhiben distintos patrones de expresión en los tejidos y tipos celulares específicos. El grupo carboxilo terminal es capaz de unirse, por medio de dominios PDZ a proteínas membranales como la ZO-1, ZO-2, ZO-3 PATJ y MUPP1, las cuales modulan el ensamble y el correcto funcionamiento de las UE.

Generalmente, más de dos tipos de claudinas son expresadas en diversos tipos de epitelios. Claudina-2, claudina-3, claudina-4, claudina-7, claudina-8, claudina-12 y claudina-15 se expresan abundantemente en el duodeno, yeyuno, ileon y/o colon con marcadas variaciones en los niveles de expresión en todos los segmentos del tracto gastrointestinal mostrando distintas localizaciones subcelulares en el epitelio intestinal. Claudina-2, claudina-4 y claudina-15 son expresadas a lo largo de las criptas de las vellosidades intestinales. Claudina-7 se expresa en las membranas celulares de las glándulas de Brunner del duodeno pero en menor cantidad que en el epitelio de las criptas. La expresión de las diferentes claudinas también se ha reportado en otros epitelios tisulares incluyendo lóbulo hepático, neurona y oído interno.

Otro punto que se debe mencionar es la localización de las claudinas en el epitelio basolateral, por ejemplo claudina-7 que se expresa más intensamente en la superficie basolateral del epitelio intestinal aunque su significado fisiológico todavía no está determinado (10).

Funciones fisiológicas de las claudinas:

Se ha encontrado que las claudinas contribuyen a la actividad de adhesión celular independiente de calcio y son el principal determinante de la función de barrera de las uniones estrechas incluyendo la discriminación en el paso de moléculas con diferente carga y su selectividad por tamaño. En su estructura las claudinas poseen dos asas extracelulares. La primera asa tiene una amplia variación en la posición y número de aminoácidos cargados dependiendo de cada claudina, por ejemplo: claudina-15 que tiene dos residuos cargados negativamente (posición 53 y 64), la sustitución de estos por otros positivos la convierte de ser selectiva para cationes a selectiva para aniones. Se asume que la combinación y proporción de las diferentes especies de claudinas contribuye a las propiedades de barrera de las uniones estrechas en un tipo celular (tejido) dado. Varias líneas de evidencia han sugerido que claudina-16 juega un papel clave en la reabsorción de magnesio y calcio. Por otro lado, claudina-2 se sabe que actúa como un canal paracelular para el sodio en las células del epitelio renal sin alterar la conducción del cloro. Se ha descubierto recientemente que claudina-2 y claudina-12 facilitan la absorción paracelular de calcio en las células de epitelio intestinal (10).

Por otro lado, se ha reportado que la región carboxilo terminal de las claudinas puede ser fosforilada en residuos de serina y/o treonina, regulando su interacción con otras proteínas, su localización y su vida media. Los cambios en la fosforilación de las claudinas se han asociado con cambios en la permeabilidad paracelular y resistencia transepitelial de las células (medidas empleadas para evaluar la función de las uniones estrechas) (11).

Claudinas y enfermedades humanas:

Chiba y colaboradores reportan que mutaciones en los genes de 4 claudinas son causa de enfermedades hereditarias humanas. Primero, varias mutaciones en el gen de la claudina-16 fueron identificadas en pacientes con hipomagnasemia familiar con hipercalcemia y nefrocalcinosis. Segundo,

mutaciones en el gen de la claudina-14, la cual es altamente expresada en las células de las vellosidades externas de la coclea, causan sordera autonómica recesiva. Tercero, mutaciones en el gen de la claudina-1 que se han reportado en colangitis esclerosante neonatal con ictiosis. Cuarto, mutaciones en el gen de la claudina-19 cuya expresión es altamente detectada en los túbulos renales y en la retina, han sido identificadas recientemente en familiares afectados con hipomagnasemia severa debido a pérdida renal, nefrocalcinosis, falla renal progresiva y anomalías oculares severas (10).

A diferencia con otras moléculas de unión, la expresión de claudinas está frecuentemente incrementada en varios cánceres, por ejemplo claudina-3, claudina-4 y claudina-7 están frecuentemente sobreexpresadas en una variedad de cánceres como los originados de ovario, trompas de Falopio, mama, útero, próstata, tiroides, páncreas, estómago, colon y vejiga. El papel exacto de la sobreexpresión de las claudinas en el cáncer no está todavía claro, sin embargo se ha propuesto que la expresión de algunas claudinas en las células epiteliales promueve la invasión celular, la movilidad y/o supervivencia sugiriendo funciones potenciales de las claudinas en tumorigénesis y metástasis.

La expresión y/o distribución de las claudinas también están alteradas en otras condiciones patológicas y esos cambios se ha propuesto que juegan un papel importante en la fisiopatología de tales enfermedades.

Recientemente claudina-1 se ha identificado como un co-receptor para el virus de hepatitis C y se mostró que es requerida para que dicho virus entre a las células del huésped. También se ha reportado que la expresión ectópica de claudina-1 en células no hepáticas les confiere susceptibilidad para la infección por este virus. Además, la región c-terminal desde la primer asa extracelular es crítica para la susceptibilidad al virus de la hepatitis C (10).

Proteínas de las uniones estrechas y cáncer:

En el trabajo realizado por Cerejido y colaboradores se investiga sobre las nuevas enfermedades derivadas o asociadas con las uniones estrechas y se comenta que en diversos tipos de cáncer hay suficiente información que muestra que aún cuando hay una expresión alterada de proteínas específicas de las uniones estrechas, su papel específico es aún complejo y controversial. Por ejemplo mientras

claudina-7 se ha encontrado disminuida en carcinomas invasivos ductales de mama, en otros tejidos como en ovario, colon, cerviz y cáncer gástrico está sobreexpresada.

Por otro lado, las claudinas-3, -4 y -7, están elevadas en varios cánceres incluyendo mama, ovario, colon, estómago y próstata.

La expresión de claudina-3 y claudina-4 en la superficie epitelial de las células del ovario humano incrementa la supervivencia celular, la actividad de metaloproteinasa-2 de la matriz extracelular, la invasión celular y la movilidad. Hay una alta especificidad de expresión de claudina-3 en cáncer, sugiriendo que quizás constituya un marcador molecular altamente utilizable. El rompimiento de las uniones estrechas quizás sea la etapa inicial en el crecimiento tumoral local, invasión y metástasis a sitios distantes. La pérdida de la integridad de las uniones estrechas es particularmente importante ya que pudiera permitir la difusión de nutrientes y otros factores necesarios para la supervivencia y crecimiento de las células tumorales (12).

Claudinas y *Helicobacter pylori*.

En la investigación de Fedwick y colaboradores se relaciona al *Helicobacter pylori* con el incremento en la permeabilidad epitelial haciendo un estudio de dicha bacteria y sus métodos de lesión. Se sabe que *Helicobacter pylori* coloniza el estómago en más de la mitad de la población humana. Mientras que en la mayoría de los casos la infección crónica causa solo gastritis, sus interacciones con el huésped pueden llevar a la aparición de úlceras gastroduodenales, adenocarcinoma gástrico y linfomas de la mucosa. A pesar de un estudio intensivo, las interacciones huésped-microbio que determinan el resultado clínico de la infección permanecen desconocidas. Se ha hipotetizado que *Helicobacter pylori* posee factores de virulencia capaces de romper la función de la barrera epitelial, un proceso que quizás incremente la probabilidad de desarrollar una enfermedad seria.

El epitelio gastrointestinal entre otras funciones actúa como una barrera selectiva y previene contra agentes lumbinales potencialmente dañinos como productos microbianos, antígenos del alimento o toxinas, mientras que permite el intercambio de iones y pequeñas moléculas. Las uniones estrechas entre células epiteliales juegan un papel clave en esta función de barrera y consisten en una interacción compleja entre varias familias de proteínas. Se ha establecido que la permeabilidad paracelular ofrecida

por las uniones estrechas puede alterarse en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos y por una variedad de microbios entéricos, lo que se sospecha contribuye a los síntomas de la enfermedad. *Helicobacter pylori* produce la citotoxina vacuolante (vacA) que tiene la habilidad de modular la integridad del epitelio incrementando la permeabilidad de las uniones estrechas para pequeñas moléculas e iones. *Helicobacter pylori* se adhiere preferentemente al lado de las uniones estrechas de las células de la mucosa gástrica. Las cepas que poseen la isla de patogenicidad Cag transfieren la proteína CagA a la célula huésped vía sistema de secreción tipo IV. Resultados de estudios recientes utilizando células de riñón canino o células de adenocarcinoma gástrico indican que la proteína CagA transferida incrementa la permeabilidad paracelular por reclutamiento de la ZO-1 y la molécula de adhesión tisular a los sitios de acoplamiento bacteriano. Hallazgos recientes muestran que *Helicobacter pylori* tiene la habilidad de incrementar el pasaje de antígenos alimenticios a través de biopsias gástricas humanas. Sin embargo los mecanismos epiteliales que llevan a la inducción de defectos en la permeabilidad causados por *Helicobacter pylori* permanecen oscuros y la significancia clínica de estas anomalías justifican mayor investigación.

En este estudio realizado por Fedwick, *Helicobacter pylori* rompe la claudina-4 y la claudina-5 a nivel de la unión estrecha y reduce los niveles de estas proteínas en el epitelio intestinal y en células de adenocarcinoma gástrico, cambios que correlacionan con el incremento en la permeabilidad epitelial.

Helicobacter pylori es considerado como un carcinógeno tipo 1, un riesgo asociado con la habilidad de ciertas cepas de inyectar CagA en la célula, causando una respuesta parecida al factor de crecimiento. Nuevas investigaciones son necesarias para evaluar si la pérdida de las proteínas de las uniones estrechas claudina-4 y claudina-5 contribuye a este cambio fenotípico e incrementa el potencial metastático de las células cancerígenas gástricas. En efecto, un reporte reciente sugiere que la expresión reducida de claudina-4 se correlaciona con la pobre diferenciación en el adenocarcinoma gástrico.

Nuestras observaciones indican que los mecanismos fisiopatológicos de *Helicobacter pylori* para inducir cambios en la permeabilidad requieren interacciones directas entre el microbio y el huésped. El presente estudio también identifica un efecto directo específico de la bacteria en la función de barrera del epitelio. Investigaciones preliminares sugieren que *Helicobacter pylori* quizás expresa una proteína de membrana externa que una vez en contacto con una superficie celular apical no identificada activa reacciones de

fosforilación rompiendo ocludina, claudina-4 y claudina-5 y finalmente incrementa la permeabilidad paracelular. Estos hallazgos describen un novedoso mecanismo según el cual patógenos gástricos corrompen senderos de señales del huésped para romper las proteínas epiteliales (claudinas), un cambio con identificación reciente de potencial carcinogénico (13).

En nuestra investigación trataremos de relacionar la infección por *Helicobacter pylori* con los cambios tempranos en la expresión de claudinas que nos advierta sobre el posible desarrollo de cáncer gástrico.

JUSTIFICACIÓN

Al descubrir la existencia de un marcador epitelial temprano para el desarrollo de cáncer gástrico en los pacientes infectados con *Helicobacter pylori* del servicio de Gastroenterología de nuestra unidad hospitalaria se favorecería el diagnóstico precoz así como la prevención de esta neoplasia además de que se podrían desarrollar medidas terapéuticas oportunas para mejorar la evolución, la calidad de vida y el pronóstico de nuestros pacientes evitando complicaciones graves que elevan con mucho la morbimortalidad de nuestra población.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cuestionamiento específico que dio origen a nuestro trabajo es:

¿Existe un marcador epitelial temprano para el desarrollo de cáncer gástrico en los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* del servicio de Gastroenterología del Hospital Adolfo López Mateos?

HIPÓTESIS

Las hipótesis que formulamos para el desarrollo del presente trabajo incluyen:

* De Investigación:

Si en los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* del servicio de Gastroenterología del Hospital Adolfo López Mateos hay predisposición al desarrollo de cáncer gástrico entonces debe existir un marcador epitelial temprano que pueda ser demostrado.

- Nula:

No existe un marcador epitelial temprano para el desarrollo de cáncer gástrico en los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* del servicio de Gastroenterología del Hospital Adolfo López Mateos.

OBJETIVOS

Los objetivos de nuestro trabajo de investigación son los siguientes:

- 1.-Determinar el predominio por edad de la infección por *Helicobacter pylori* en los pacientes del servicio de Gastroenterología del Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos.
- 2.-Determinar el predominio por sexo de la infección por *Helicobacter pylori* en los pacientes del servicio de Gastroenterología del Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos.
- 3.-Definir la sintomatología clínica principal en los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* del servicio de Gastroenterología del Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos.
- 4.-Definir las manifestaciones endoscópicas más comunes en los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* del servicio de Gastroenterología del Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos.
- 5.-Definir las principales manifestaciones histológicas en los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* del servicio de Gastroenterología del Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos.
- 6.-Determinar si existen alteraciones en la expresión de las proteínas llamadas claudinas en los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* mediante los estudios inmunohistoquímicos correspondientes.
- 7.-Definir si existe un marcador epitelial temprano para el desarrollo de cáncer gástrico resultante de nuestra investigación.

METODOLOGÍA

Se diseñó un protocolo de investigación observacional, transversal, prospectivo, exploratorio, abierto, aplicado, tecnológico y clínico en el que se incluyeron 30 pacientes infectados por *Helicobacter pylori* de la consulta externa del servicio de Gastroenterología del Hospital Regional “Licenciado Adolfo López Mateos”, que aceptaron participar en el proyecto y dieron su consentimiento por escrito (anexo II).

De los 30 pacientes ya comentados, 3 tuvieron posteriormente que ser dados de baja (1 por defunción debido a patología respiratoria y 2 por causas personales) ya que esto impidió la realización de las endoscopías correspondientes y por lo tanto la obtención de resultados.

Se excluyeron aquellos pacientes que no dieron su consentimiento para participar en el proyecto, que refirieran tabaquismo, ingesta frecuente (mayor de 3 veces por semana) de alimentos ahumados o enlatados, pacientes con familiares de primer grado con cáncer gástrico, pacientes no derechohabientes del hospital y pacientes pediátricos.

Cada paciente fue sometido a una entrevista y llenado de un cuestionario de contenido sencillo y de fácil comprensión (anexo I).

La captura de los pacientes se llevó a cabo durante los meses de Septiembre a Diciembre del 2007. Una vez realizada la entrevista y habiendo firmado el consentimiento informado los pacientes fueron programados para el estudio endoscópico con toma de biopsia en el servicio de endoscopia de nuestra unidad, estando presentes además del personal médico de dicho servicio el personal de la Facultad de Medicina de la UNAM para la toma y transporte de las muestras en los medios necesarios para su posterior procesamiento con obtención de fracciones subcelulares, el cual implicó lo siguiente:

1. Cada una de las biopsias se colocó inmediatamente después de su toma en criotubos que contenían amortiguador A (20 mM Tris pH 7.5, 0.25 M sacarosa, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA), inhibidores de proteasas y fosfatasa. Dichos tubos se mantuvieron en hielo.
2. Posteriormente, los tubos con las muestras se congelaron a -70°C hasta su procesamiento.
3. Para obtener las fracciones subcelulares, se descongelaron los tubos y se lisaron los tejidos por sonicación durante 1-2 minutos en hielo. Los tubos siempre se mantuvieron en hielo.
4. Cada uno de los tubos se centrifugaron a 39,000 rpm durante 45 minutos a 4°C. De cada centrifugación se obtendrán un sobrenadante y un precipitado. El sobrenadante resultado de esta

centrifugación fue la “fracción citosólica”, la cual fue separada a otros tubos previamente etiquetados.

5. El precipitado se resuspendió en 150 μ l de amortiguador A más 1% de Tritón X-100 más inhibidores de proteasas y de fosfatasas y se incubó 1 hora a 4°C con agitación suave.
6. Posterior a la incubación, las muestras se centrifugaron nuevamente a 39,000 rpm durante 45 minutos a 4°C. La fracción citosólica, llamada “fracción membranal” se colocó en tubos nuevos etiquetados y mantenidos en frío.
7. El precipitado se resuspendió en amortiguador de lisis más 1% de NP-40 más 0.1% de SDS más 0.1% de desoxicolato de sodio más inhibidores de proteasas y de fosfatasas y se incubó durante 1 hora a 4°C con agitación suave.
8. Las muestras se centrifugaron a 39,000 rpm durante 45 minutos a 4°C. La fracción resultante fue etiquetada como “fracción de citoesqueleto”.
9. Para la determinación de la concentración de proteína se tomó una alícuota de cada fracción y se realizó el ensayo con el kit comercial de BioRad.

Análisis de la expresión de proteínas por ensayos de Western Blot.

1. Para la realización de esta metodología se prepararon geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes.
2. El análisis de la expresión de claudinas se realizó colocando 25 μ g de proteína a los geles y se aplicó una corriente de 150 Ma durante 45 minutos a temperatura ambiente.
3. Una vez terminada la corrida, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 5 % de leche libre de grasas para bloquear los sitios inespecíficos que puedan reaccionar con los anticuerpos correspondientes.
4. Posterior al bloqueo, cada membrana se incubó toda la noche a 4°C y agitación suave con los anticuerpos correspondientes.
5. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:
 - Rabbit-anti-claudina-1 (ZYMED), 2 μ g/ml
 - Rabbit-anti-claudina-2 (ZYMED), 2 μ g/ml

Rabbit-anti-claudina-3 (ZYMED), 2 µg/ml

Mouse-anti-claudina-4 (ZYMED), 2 µg/ml

Mouse-anti-claudina-7 (ZYMED), 2 µg/ml

Rabbit-anti-claudina-9 (GEN WAY), 2 µg/ml

Rabbit-anti-claudina-10 (ZYMED), 2 µg/ml

Mouse-actina- 1:1000

6. Al día siguiente, se lavaron las membranas tres veces con amortiguador de fosfatos y 0.3 % de Tween 20 a temperatura ambiente y agitación suave para eliminar el exceso de anticuerpos.
7. Posteriormente las membranas se incubaron 2 horas con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a peroxidasa.
8. La señal correspondiente a cada proteína fue evidenciada en placas Kodak utilizando el método de quemiluminiscencia (GE-Amersham).

El procedimiento antes descrito se está llevando a cabo con cada una de las muestras obtenidas de los pacientes incluidos en el estudio.

Se reportarán los resultados obtenidos.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente trabajo de investigación se realizó en base a las normas internacionales de investigación clínica y para la elaboración de estudios en humanos según la convención de Helsinki.

Se solicitó a cada paciente o sus familiares su autorización por escrito para participar en nuestro estudio además de ser autorizado también por el comité de ética e investigación clínica de nuestra unidad.

Se anexa la hoja de consentimiento informado (anexo II).

RESULTADOS

Se incluyeron 27 pacientes infectados por *Helicobacter pylori* de la consulta externa del servicio de Gastroenterología del Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos, 6 hombres y 21 mujeres (Tabla 1) entre 17 y 77 años de edad, con una media de 51.1 años. La mayoría (88%) se encontraba entre los 31 a 70 años de edad (Tabla 2).

El nivel de escolaridad de nuestros pacientes correspondió a nivel primaria (14.81%), nivel secundaria (14.81%), nivel preparatoria (7.40%), nivel licenciatura (37.03%), nivel maestría (3.70%) y carrera técnica (22.22%) (Tabla 3).

El número de pacientes con un primer evento de infección por *Helicobacter pylori* fue de 15 (55.55%) y con más de uno de 12 (44.44%) (Tabla 4).

Habían recibido tratamiento 12 de ellos (44.44%) coincidiendo con los que tenían ya dos eventos infecciosos por dicha bacteria y por otro lado no tenían tratamiento 15 (55.55%) que cursaban con su primera infección (Tabla 5).

Los principales síntomas manifestados por los pacientes infectados fueron pirosis (18.51%), dolor en epigastrio (25.92%), náusea (11.11%), distensión abdominal (18.51%) y regurgitación (7.40%) (Tabla 6).

Existieron otros síntomas menos comunes como plenitud posprandial inmediata, sensación de vacío en epigastrio, eructos, flatulencia o incluso con un curso asintomático.

Los principales resultados endoscópicos obtenidos en los pacientes son presencia de hernia hiatal (59.25%), gastritis aguda (44.44%), hiato flojo (22.22%), gastritis erosiva (40.74%), gastritis folicular (25.92%), esofagitis crónica (22.22%) (Tabla 7). Otros datos manifestados en los reportes endoscópicos menos comunes fueron várices esofágicas, gastropatía portal leve, gastritis astral, una lesión tumoral a nivel de bulbo duodenal, bulboduodenitis aguda, gastropatía crónica inespecífica, úlceras gástricas Forrest III, entre otros.

A nivel histológico los reportes más comunes de las biopsias arrojaron además de la positividad para *Helicobacter pylori* los siguientes datos: gastritis crónica intensa activa folicular (22.22%), gastritis crónica moderada activa folicular (70.3%), metaplasia intestinal incompleta (11.11%), metaplasia intestinal completa (7.40%) y sangrado (7.40%) (Tabla 8). Otros datos reportados fueron gastritis crónica

leve activa, un tumor carcinoide bien diferenciado en bulbo duodenal, eosinofilia, congestión de capilares superficiales y atrofia leve con hiperplasia foveolar.

Expresión de claudinas en biopsias de pacientes positivos a *Helicobacter pylori*.

Diversos grupos de investigación han reportado la alteración en la expresión de las claudinas en diferentes tipos de cáncer. Esta alteración se ve traducida en un aumento o disminución de estas proteínas y en muchos casos a una localización subcelular alterada. En previas investigaciones, analizando biopsias de tejido gástrico (antro) sin alteración y de tumor, hemos encontrado la expresión de claudinas 1, 3 y 4 en ambos tejidos y la expresión de claudina 2 únicamente en los tejidos alterados. Por otro lado, las claudinas 6, 7 y 9 no se observan en los tejidos control pero si, y en gran proporción en biopsias provenientes de adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal. Considerando la presencia de la infección por *Helicobacter pylori* un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico, el estudio se realizó con la idea de encontrar un marcador molecular temprano, traducido como una alteración en la expresión de estas proteínas, en muestras de epitelio gástrico obtenido de pacientes infectados por esta bacteria. Los posibles cambios en los niveles de expresión nos hablarán de los cambios tempranos durante los procesos de inflamación.

Para analizar los patrones de expresión de las diferentes claudinas en las biopsias de epitelio gástrico obtenido por endoscopia, se realizaron ensayos de Western blot analizando fracciones subcelulares (citosol, membrana y citoesqueleto) a partir de las biopsias en cuestión. En estos se utilizaron anticuerpos específicos dirigidos contra claudina 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 y 10. Los resultados obtenidos (Fig. X) mostraron la localización, en mayor o menor cantidad, en el citosol de todas las claudinas analizadas. Es de hacer notar que tanto la claudina 7 como la 9 se encuentran en mayor proporción en esta fracción. Estos resultados ya se han reportado anteriormente por diferentes grupos de investigación en muestras de pacientes con padecimientos diversos. Si las claudinas que se encuentran en el citosol están inactivas o modificadas de alguna forma para evitar su localización en la membrana no se sabe, sin embargo será importante investigarlo ya que de su correcta localización dependerá su función.

La fracción membranal dio positividad para todas las claudinas probadas excepto para la claudina 7 y la 10. Se ha reportado que la claudina 7 se encuentra en el citosol de biopsias con displasia y esta señal es

más fuerte en adenocarcinomas de tipo intestinal, sin embargo en estos trabajos no refieren si los pacientes son positivos a *Helicobacter pylori*. Interesantemente también encontramos la presencia de claudina 1, 3 y 4 en la fracción de citoesqueleto.

A la fecha, no se sabe cual es el papel fisiológico de las claudinas 6, 9 y 10. Se ha reportado que las claudinas 6 y 9 participan en la entrada del virus de la hepatitis C a las células huésped, sin embargo no se conoce por que están aumentadas en este tipo de tejido.

Este estudio está abierto a continuar el análisis de un número mayor de muestras a partir de pacientes infectados con *Helicobacter pylori* para poder demostrar que los cambios en la expresión de las claudinas 6, 7 y 9, de las que ya se tiene evidencia de su aumento en adenocarcinoma gástrico, son provocados como una respuesta a la infección por esta bacteria y puedan ser considerados como un marcador molecular del avance a cáncer.

DISCUSIÓN

Está bien descrito en la literatura que *Helicobacter pylori* afecta a más del 50% de la población del mundo con una prevalencia mayor en los países en vías de desarrollo, siendo además bien conocida su importancia como factor etiológico para el cáncer gástrico.

Se ha referido, que la presencia de esta bacteria en individuos sanos varía con la edad, la clase socioeconómica y el país de origen (2); en el caso de un país como el nuestro, en claras vías de desarrollo encontramos en nuestra investigación un predominio de la infección en el sexo femenino (77.77%), con la mayor edad de afección entre los 41 a 50 años (33.33%), lo que concuerda con los reportes de aparición del proceso infeccioso en adultos de mediana edad de países en desarrollo aunque no se describe un predominio de sexo en particular (3). Por otro lado, el nivel de escolaridad predominante en los pacientes de nuestra investigación fue la licenciatura (37.03%), siendo seguido de la carrera técnica (22.22%), nivel primaria (14.81%) y nivel secundaria (14.81%), llamando la atención este reporte, pues como sabemos dicha infección está relacionada a estratos socioeconómicos bajos y carentes de recursos, podrían existir entonces factores ambientales y genéticos involucrados que conlleven a estos resultados y a la afección de este grupo. Se hizo evidente también que además de existir pacientes con un primer evento infeccioso (55.55%), existe otro grupo con un segundo evento de infección a pesar de haber recibido tratamiento (44.44%), lo que apoya lo referido en la literatura de que la infección es adquirida por ingestión oral de la bacteria, transmisión directa de persona a persona y transmisión por agua contaminada, situaciones facilitadas por las condiciones ambientales y cotidianas en las que vivimos actualmente y que son persistentes.

La sintomatología más común referida por nuestros pacientes infectados fue dolor en epigastrio (25.92%), pirosis (18.51%), distensión abdominal (18.51%), náusea (11.11%) y regurgitación (7.40%), datos claros de dispepsia o enfermedad ácido péptica que llevan a la búsqueda de atención médica y tratamiento, lo que favorece la erradicación del *Helicobacter pylori* y disminución de sus futuras complicaciones.

Los principales hallazgos endoscópicos de nuestros pacientes investigados fueron la presencia de hernia hiatal (59.25%), gastritis aguda (44.44%), gastritis erosiva (40.74%), gastritis folicular (25.92%), hiato flojo (22.22%) y esofagitis crónica (22.22%) entre otros, que podrían representar otro motivo de

investigación para tratar de correlacionar la endoscopia y la presencia de infección por *Helicobacter pylori*. Nosotros solo reportamos los hallazgos encontrados, ya que no fue motivo de nuestra investigación el profundizar en este rubro.

Las manifestaciones histológicas más comunes encontradas en nuestros pacientes infectados fueron gastritis crónica moderada activa folicular (70.3%), gastritis crónica intensa activa folicular (22.22%), metaplasia intestinal incompleta (11.11%), metaplasia intestinal completa (7.40%) y sangrado (7.40%); lo que concuerda con lo reportado por Suerbaum y colaboradores (3) y Hansson y colaboradores (6) acerca del desarrollo de gastritis crónica y su posible papel como estadio temprano de la carcinogénesis gástrica que conlleva la formación de radicales libres por las células inflamatorias, producción de óxido nítrico, nitratos y nitrosaminas por los macrófagos, e intensa renovación celular.

Papel de las claudinas en el cáncer gástrico.

A la fecha, diversos trabajos han reportado que la estructura y función de las Uniones Estrechas se encuentran alteradas en los carcinomas humanos donde la pérdida en la integridad de estas uniones contribuye junto con otros mecanismos bien descritos a los procesos de transformación celular. Se ha propuesto que la alteración en la expresión de las claudinas así como su deslocalización contribuyen al desarrollo del tumor favoreciendo el desensamble de estas uniones y la pérdida de la adhesión célula-célula, proceso que puede jugar un papel muy importante en la pérdida de la diferenciación, de la cohesión celular, la proliferación incontrolada y en la invasividad (14, 15).

Existen diversos reportes que muestran una expresión alterada en diversos tipos de cáncer, por ejemplo las claudinas 1, 2, 3 y 4 que se han detectado sobreexpresadas en cáncer de colon y de estómago (16). Las claudinas 3 y 4 están también aumentadas en cáncer de próstata, páncreas, ovario y mama; la claudina 1 se ha detectado disminuida en cáncer de mama y de esófago y las claudinas 1 y 7 están aumentadas en cáncer de cérvix.

Así como se ha reportado anteriormente por Resnick (16), en la presente investigación se detectó la expresión de las claudinas 1, 2, 3 y 4 en las biopsias. Sin embargo a este respecto hay que enfatizar que los trabajos publicados refieren esta expresión en muestras con adenocarcinoma gástrico tipo intestinal incluidas en parafina. En nuestra investigación las biopsias estudiadas fueron obtenidas a partir

del antro gástrico por vía endoscópica y fueron analizadas por Western Blot. Un punto importante que hay que enfatizar es que las biopsias no mostraron cambios significativos en la integridad del epitelio por lo que el encontrar cambios en la expresión de estas proteínas podría traducirse en cambios tempranos de la integridad celular que posteriormente favorecerían a la transformación del epitelio.

En lo que se refiere a la claudina 6, se ha reportado su expresión en cáncer de mama (17) y que su expresión es de vital importancia para el mantenimiento de la permeabilidad del epitelio (18) y muy importantemente junto con la claudina 9 como coreceptor indispensable para la entrada del virus de la Hepatitis C a la célula blanco (19). Nuestro trabajo mostró la expresión de estas claudinas en las biopsias analizadas. El papel fisiológico que estas pudieran tener en este epitelio todavía es desconocido, sin embargo se sabe que tanto la claudina 6 como la 9 son muy parecidas a las claudinas 3 y 4. Se conoce que las asas extracelulares de estas últimas funcionan como receptores para la toxina de *Clostridium perfringens* (15) por lo que pudiera pensarse que las claudinas 6 y 9 pudieran estar reguladas de alguna manera por alguna de las toxinas de *Helicobacter pylori*.

CONCLUSIONES

1.-El predominio por edad de la infección por *Helicobacter pylori* de los pacientes de nuestra investigación fue de 41 a 50 años.

2.-El sexo femenino fue el más afectado por este proceso infeccioso.

3.-Los síntomas clínicos principales que padecen nuestros pacientes fueron pirosis, dolor en epigastrio, náusea, distensión abdominal y regurgitación lo que es coincidente con el cuadro clínico de dispepsia referido en la literatura.

4.-Los principales hallazgos endoscópicos en nuestros pacientes fueron la presencia de hernia hiatal, gastritis aguda, hiato flojo, gastritis erosiva, gastritis folicular y esofagitis crónica.

5.-Los hallazgos histológicos más frecuentes en las biopsias de estos pacientes fueron gastritis crónica intensa activa folicular, gastritis crónica moderada activa folicular, metaplasia intestinal incompleta, metaplasia intestinal completa y sangrado, concordando todo esto con lo referido en la literatura sobre los cambios histológicos provocados por este agente y su alta capacidad inflamatoria.

6.-En lo que se refiere al análisis molecular, de las claudinas probadas se detectó la expresión de claudinas 1, 2, 3, 4, 7 y 10. La expresión de estas proteínas se localizó predominantemente en la fracción de membrana.

7.-Las claudinas 1, 3 y 4 se observaron también en las fracciones de citoesqueleto y las claudinas 2, 7 y 9 en la fracción de citosol. Estos últimos hallazgos concuerdan con diversos reportes en los que se muestra la deslocalización de claudinas en citosol.

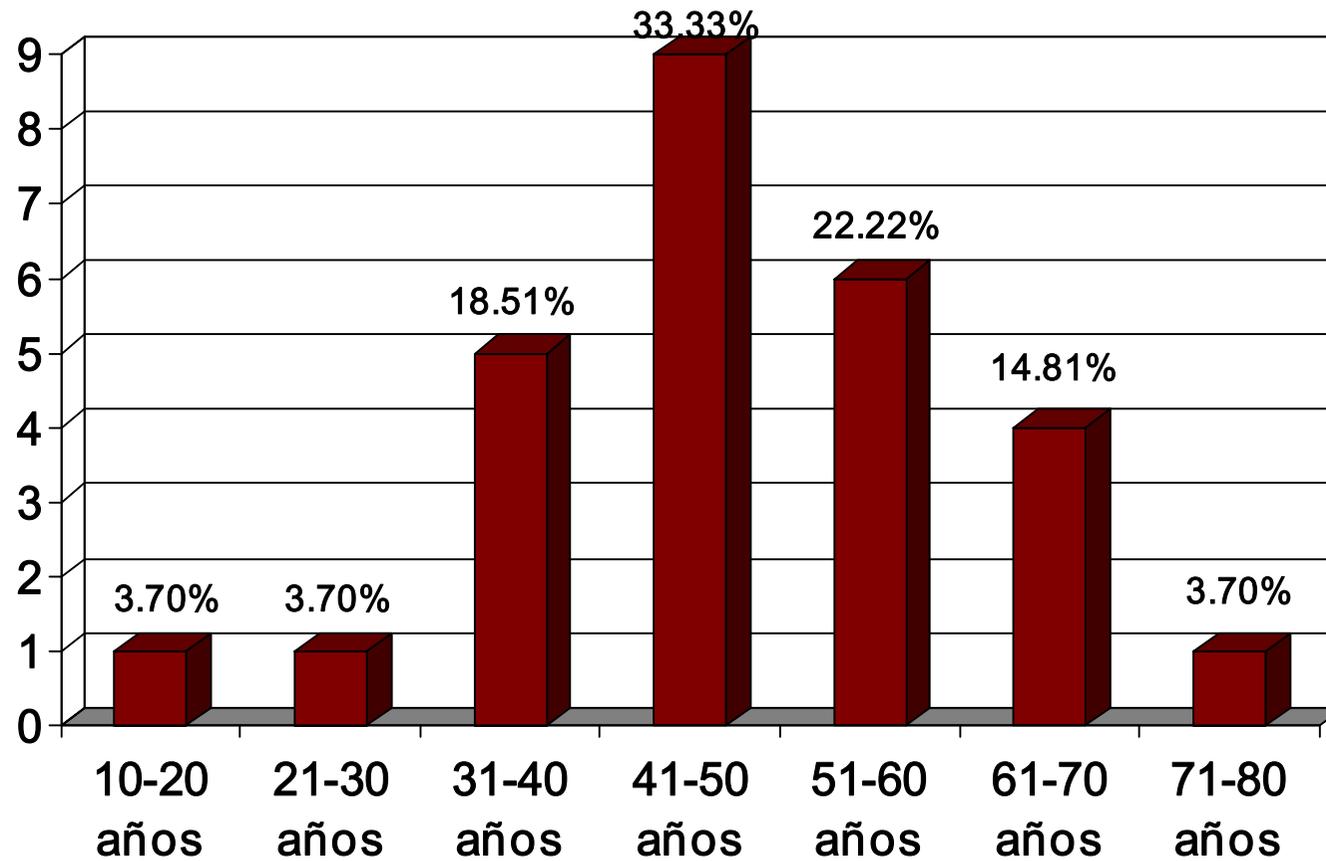
BIBLIOGRAFÍA:

- 1.-Uemura N MD, Okamoto S MD, Yamamoto S MD et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*, Vol. 345, No. 11, Septiembre 13, 2001. Pág. 784 – 89.
- 2.-Sleisenger MH MD. *Enfermedades Gastrointestinales y Hepáticas. Helicobacter Pylori*. Panamericana, Madrid España, 2004. Pág. 775 – 90.
- 3.-Suerbaum S MD, Michetti P MD. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*, Vol. 347, No. 15, Octubre 10, 2002. Pág. 1175 – 86.
- 4.-Lax JA. Perspectives, Bacterial toxins and cancer – a case to answer? *Nature Reviews Microbiology* Vol. 3, Abril 2005. Pág. 343 – 49.
- 5.-Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nature Reviews Microbiology*, Marzo 10, 2005. Pág. 2 – 14.
- 6.-Hansson LE MD, Nyren O MD, Hsing AW MD et al. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N Engl J Med*, Vol. 335, No. 4, Julio 25, 1996. Pág. 242 – 49.
- 7.-Sleisenger MH MD. *Enfermedades Gastrointestinales y Hepáticas. Cáncer gástrico*. Panamericana, Madrid España, 2004. Pág. 876 – 903.
- 8.-Naumann M, Crabtree JE. *Helicobacter pylori* – induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. *Trends in Microbiology*, Vol. 12, No. 1, Enero 2004. Pág. 29 - 36.
- 9.-Houghton JM, Wang TC. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: A new paradigm for inflammation-associated epithelial cancers. *Gastroenterology*, Vol. 128, No. 6, 2005. Pág. 1567 – 78.
- 10.-H. Chiba et al. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim. Biophys. Acta* (2007).
- 11.-Zavala VE, Rendón EP. Alteración de la integridad de las uniones estrechas en el desarrollo del cáncer. El papel de las claudinas. *Bioquímica*, Vol. 33, No. 1, 2008. Pág. 19 – 29.
- 12.-Cerejido M, Contreras RG, Flores-Benítez D, et al. New diseases derived or associated with the tight junction. *Archives of Medical Research*, 2007. Pág. 465 – 78.
- 13.-Fedwick JP, Lapointe TK, Meddings JB, et al. *Helicobacter pylori* activates myosin light chain kinase to disrupt Claudin-4 and Claudin-5 and increase epithelial permeability. *Infection and Immunity*, Vol. 73, No. 12, December 2005. Pág. 7844 – 52.
- 14.-Oliveira SS, Morgado-Díaz JA. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Celular and Molecular Life Sciences*. 2006. Pág. 1 – 12.
- 15.-Morin JP. Claudins proteins in Human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res*, Vol. 65, No. 21, Noviembre 2005. Pág. 9603 - 6.
- 16.-Resnick MB, Gavilanes M, Newton E, et al. Claudin Expression in gastric adenocarcinoma: a tissue microarray study with prognostic correlation. *Pathol*, Vol. 36, No. 8, Agosto 2005. Pág. 886 – 92.
- 17.-Osanai M, Murata M, Chiba H, et al. Epigenetic silencing of claudin 6 promotes anchorage-independent growth of breast carcinoma cells. *Cancer Sci*, Vol. 98, No. 10, 2007. Pág. 1557 – 62.
- 18.-Turksen K, Troy TC. Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development*, Vol. 129, No. 7, 2002. Pág. 1775 – 84.

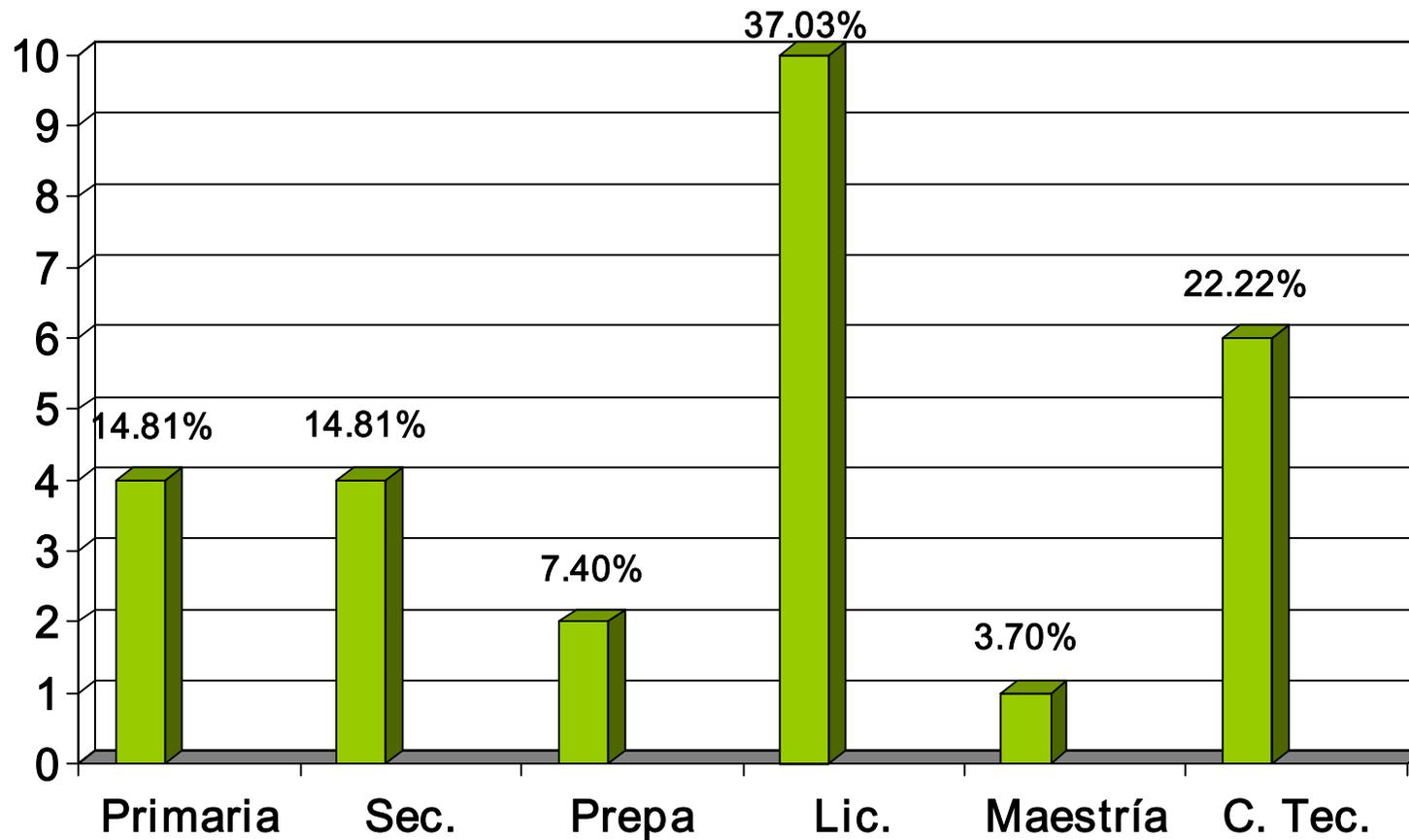
19.-Zheng A, Yuan F, Li Y, et al. Claudin-6 and Claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J. Virol*, Vol. 81, No. 22, Noviembre 2007. Pág. 12465 – 71.

ANEXOS Y TABLAS

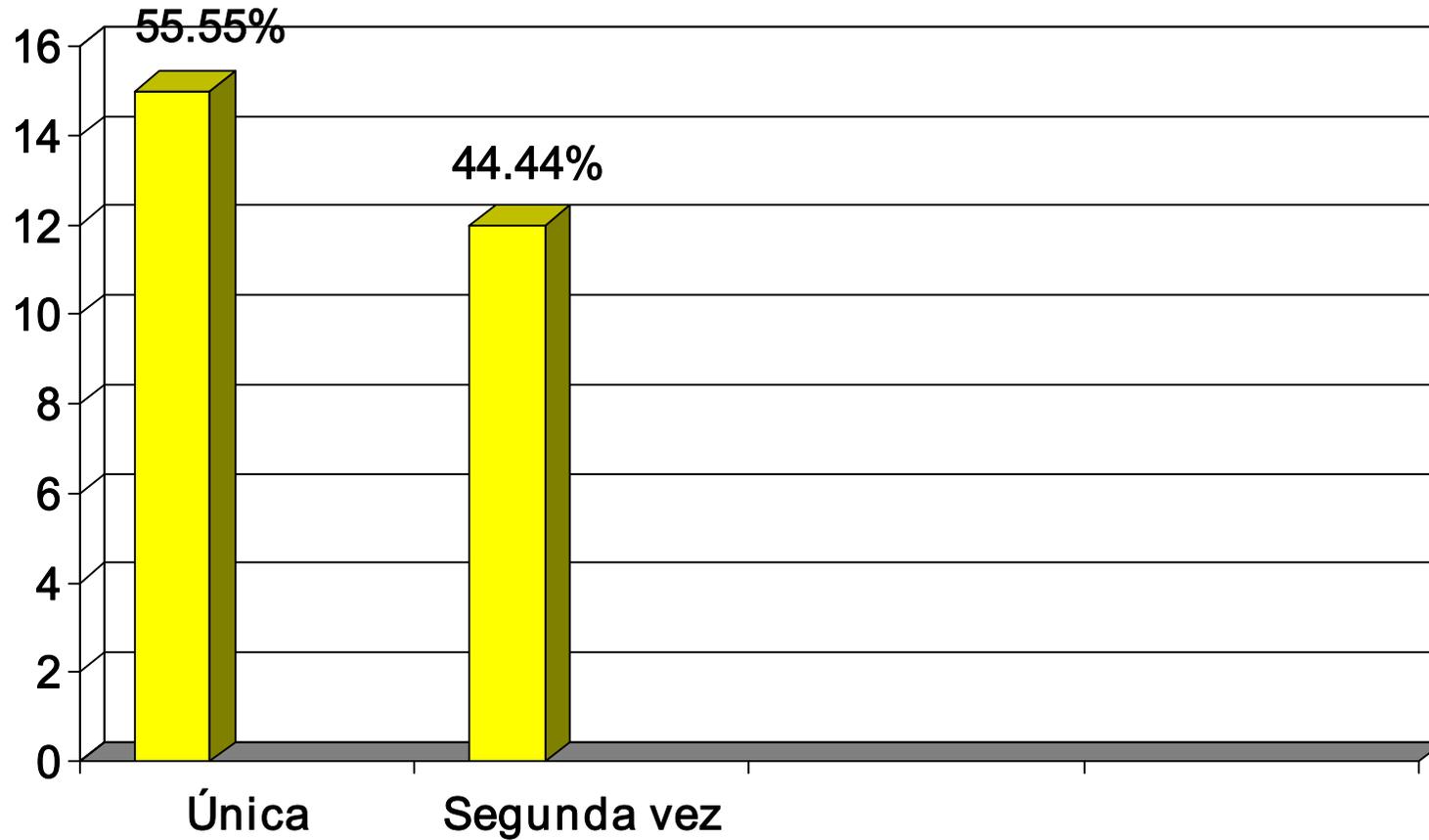
Distribución por edad de la infección por *Helicobacter pylori*



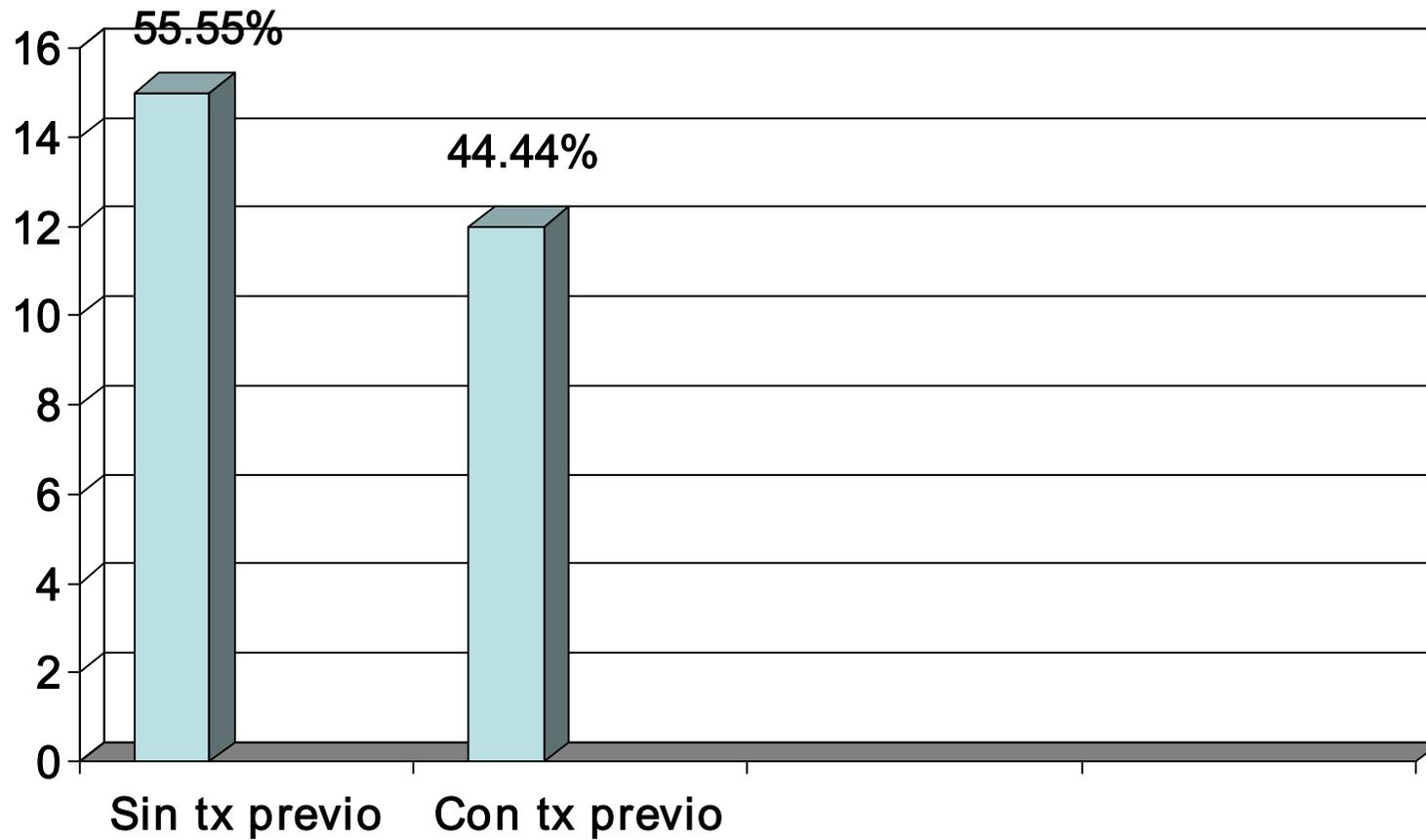
Escolaridad de los pacientes infectados por *Helicobacter pylori*



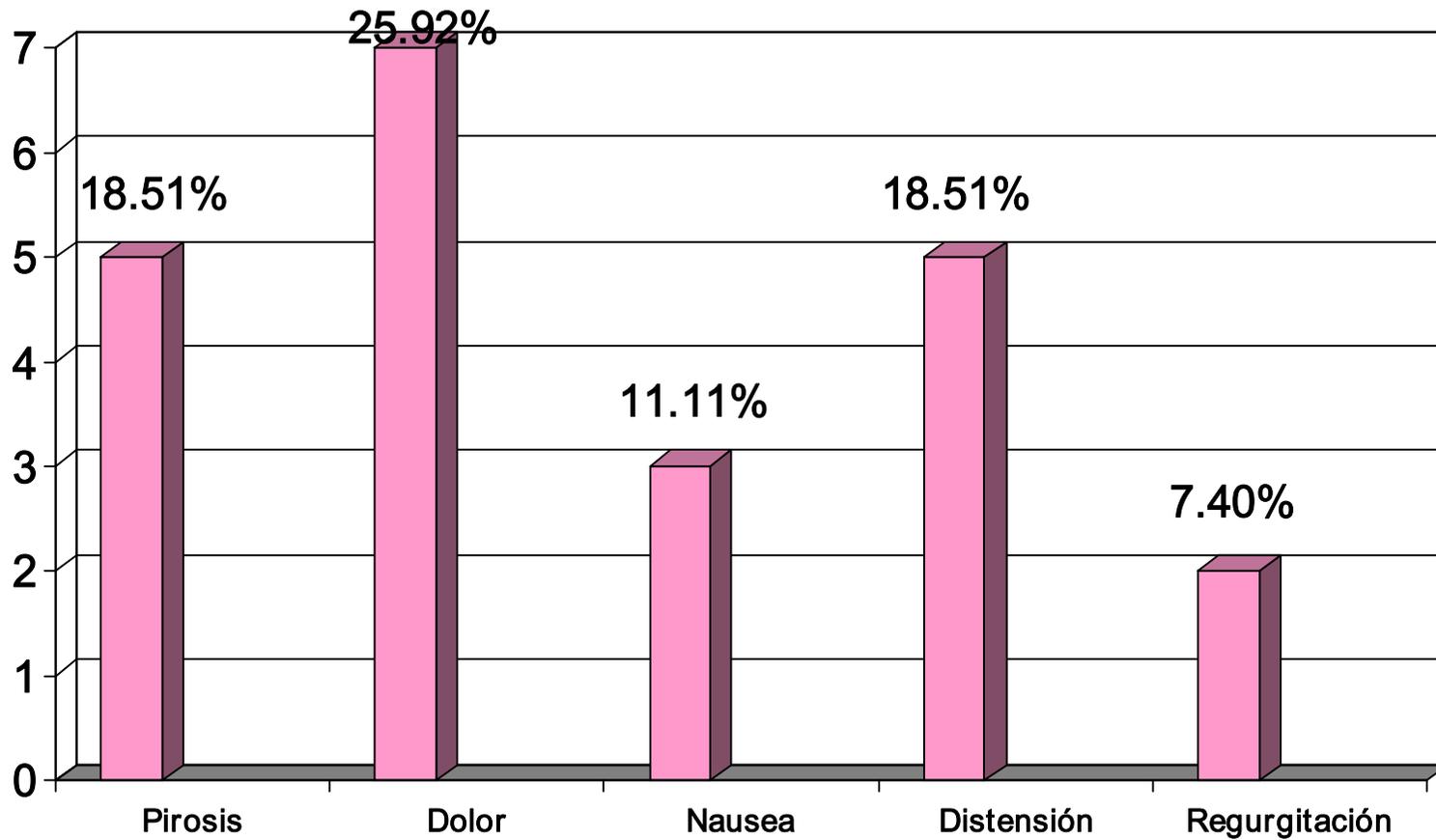
Eventos de infección por *Helicobacter pylori* en los pacientes



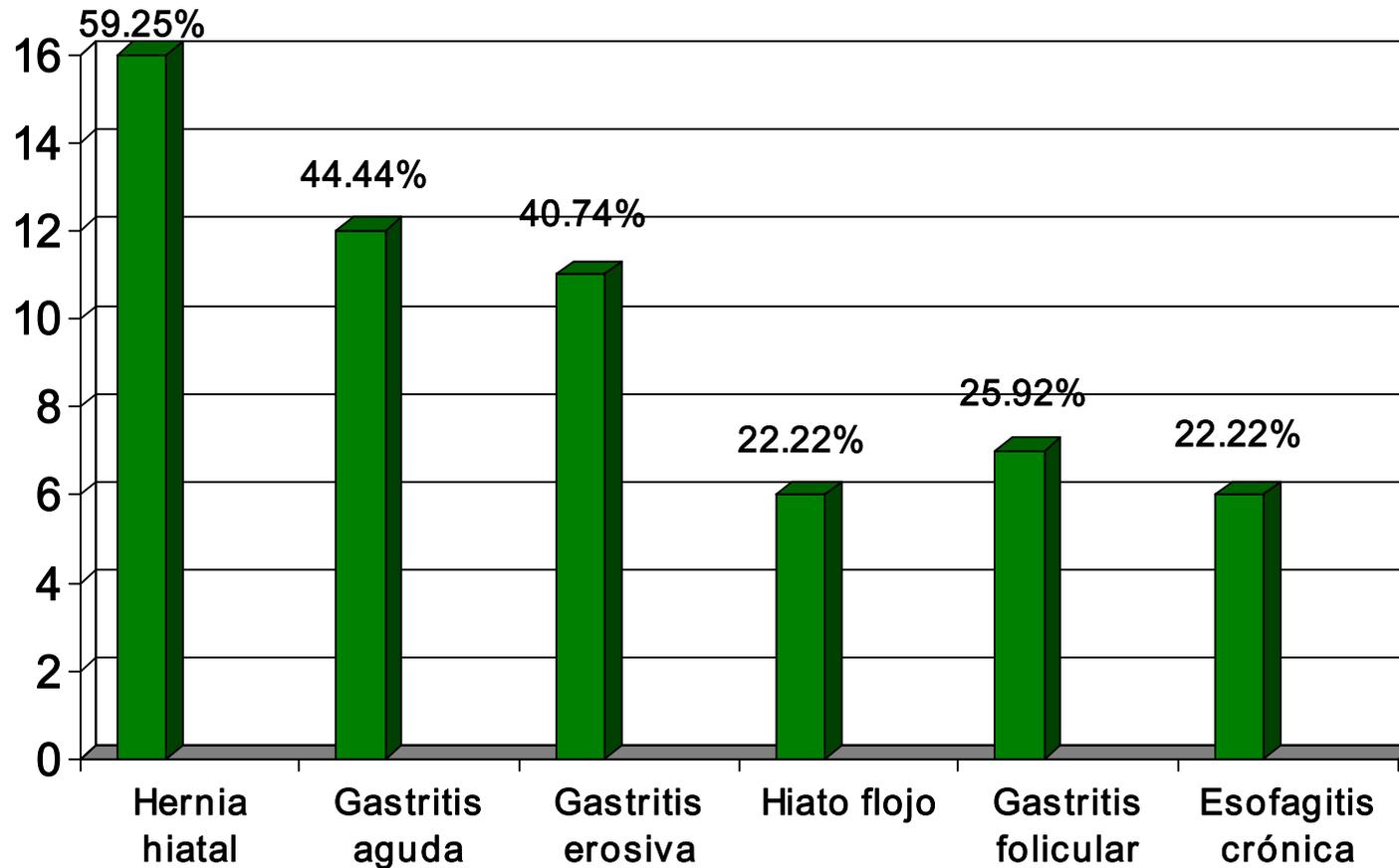
Situación del tratamiento para *Helicobacter pylori* en los pacientes



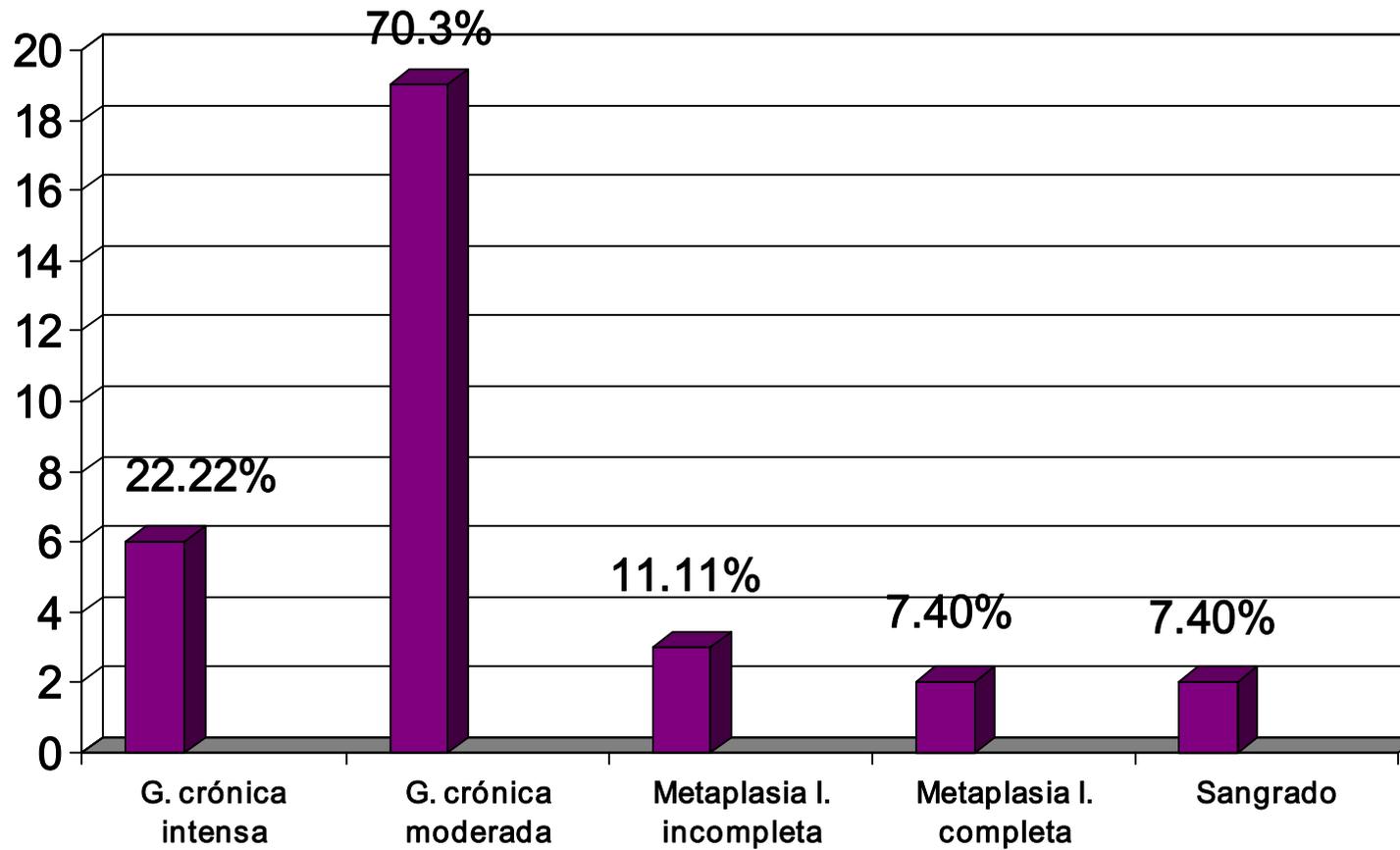
Cinco principales síntomas de la infección por *Helicobacter pylori*



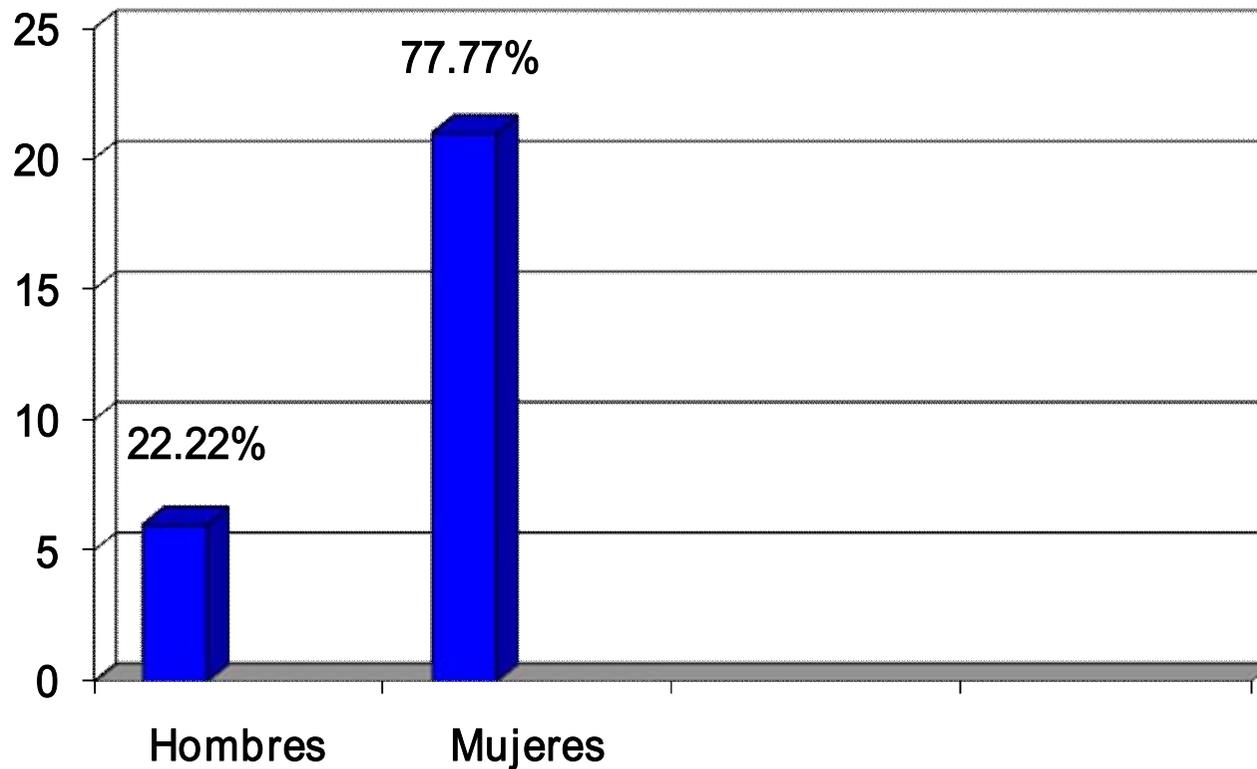
Principales resultados endoscópicos en los pacientes infectados por *Hp*.



Principales resultados anatomopatológicos en los pacientes infectados por *Hp*.



Distribución por sexo de la infección por *Helicobacter pylori*



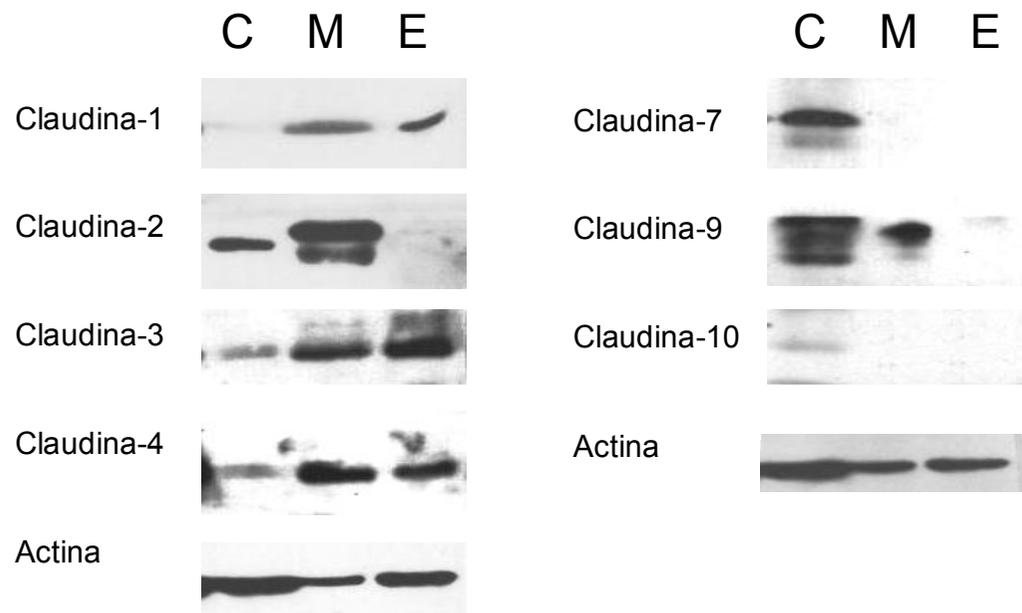


Figura X: Resultados representativos del análisis por Western blot de la expresión de claudinas en fracciones subcelulares (citósol (C), membrana (M) y citoesqueleto (E)) obtenidas a partir de biopsias de tejido gástrico de pacientes positivos a infección por *Helicobacter pylori*.

Anexo I.- CUESTIONARIO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

Fecha: _____ No. de cuestionario: _____.
Número de paciente en el protocolo: _____.
Identificación: Nombre: _____.
Número de expediente: _____.
Teléfono particular: _____.

Origen del paciente: Consulta externa Hospitalizado

OBJETIVO:

Determinar si la infección en sus vías digestivas (debida a una bacteria llamada *Helicobacter pylori* relacionada con la gastritis), ha provocado cambios tempranos en los tejidos, que puedan predisponerlo (a) a padecer en un futuro cáncer del estómago.

PREGUNTAS:

A) ¿Cuál es su sexo?

Femenino Masculino

B) ¿Cuál es su edad?

18 – 30 años	<input type="checkbox"/>	31 – 40 años	<input type="checkbox"/>
41 – 50 años	<input type="checkbox"/>	51 – 60 años	<input type="checkbox"/>
+ 61 años	<input type="checkbox"/>		

C) ¿Cuál es su grado de escolaridad?

Nula Primaria grado _____
Secundaria grado _____
Preparatoria grado _____
Licenciatura grado _____
Maestría Otra ¿Cuál? _____

D) ¿Recibió usted tratamiento para esta infección del estómago cuando se le encontró?

Sí No

E) ¿Continúa con las molestias después de haber terminado el tratamiento que se le dio para esta infección?

Sí No

F) ¿Cuáles fueron las molestias que le produjo la enfermedad?

Anexo II.- CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

El servicio de Gastroenterología del hospital Regional “Licenciado Adolfo López Mateos” del ISSSTE, solicita su autorización para participar en el estudio de investigación: “Búsqueda de un marcador epitelial temprano para el desarrollo de cáncer gástrico en pacientes infectados por *Helicobacter pylori*”, el cual tiene como objetivos el determinar la presencia de un marcador temprano en los tejidos del estómago de los pacientes con infección por una bacteria llamada *Helicobacter pylori* que nos indique la predisposición al desarrollo de cáncer en el estómago en el futuro.

El estudio consiste en el llenado de un cuestionario por parte del paciente, con preguntas muy sencillas. Se le realizará una endoscopia con toma de biopsia para revisar mediante técnicas especiales de laboratorio las muestras del tejido del estómago infectado con la bacteria y así determinar si existen o no cambios que indiquen la posibilidad de aparición de cáncer gástrico a futuro.

Este estudio ha sido elaborado en base a las normas internacionales de investigación clínica además de ser autorizado por el comité de investigación y ética de nuestro hospital.

Si no desea participar en el estudio, no existirá ningún inconveniente.

Yo _____, paciente o familiar del paciente hospitalizado o de la consulta externa del servicio de Gastroenterología de este hospital, manifiesto que se me ha explicado de manera clara, amable y oportuna las condiciones en que se llevará a cabo el presente estudio de investigación, su finalidad y requerimientos.

Acepto ser incluido en dicho protocolo por mi voluntad y sin presiones de ningún tipo, además de que se han resuelto todas las dudas que tenía al respecto.

Fecha de firma de consentimiento:

México, D.F. a _____ de _____ del 200__.

Nombre del paciente o familiar _____.

Dirección: _____.

Teléfono: _____.

Firma: _____.