



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TRANSDUCCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE *HELICOBACTER***  
***PYLORI* A CÉLULAS HOSPEDERO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ANA KAREN GAYTÁN JIMÉNEZ**



**Ciudad de México**

**2018**



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:**      **Profesor: Alejandro Camacho Cruz**

**VOCAL:**            **Profesor: Luciano Hernández Gómez**

**SECRETARIO:**    **Profesor: Ezequiel Moisés Fuentes Pananá**

**1er. SUPLENTE:**   **Profesor: Gabriela López Herrera**

**2° SUPLENTE:**    **Profesor: Sara Margarita Garza Aguilar**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN VIROLOGÍA Y CÁNCER, HOSPITAL INFANTIL  
DE MÉXICO “FEDERICO GÓMEZ”**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**Dr. Ezequiel M. Fuentes Pananá**

**SUSTENTANTE:**

---

**Ana Karen Gaytán Jiménez**

## **AGRADECIMIENTOS**

**AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT), POR EL APOYO ECONÓMICO QUE ME FUE OTORGADO GRACIAS AL FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO CON CLAVE CB-2012-C01-SSA-176880.**

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Epidemiología .....	1
1.1.1. Epidemiología Nacional .....	2
1.2. Generalidades del cáncer .....	2
1.3. Cánceres de etiología infecciosa .....	7
1.4. Cáncer gástrico .....	11
1.4.1. Factores de riesgo de CG .....	14
1.5. Asociación de <i>H. pylori</i> y CG .....	15
1.6. Factores de virulencia de <i>H. pylori</i> .....	19
1.7. cagPAI Y T4SS .....	21
1.8. La oncoproteína CagA .....	23
1.9. Modelo de transformación mediado por oncogenes virales...27	
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	28
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	29
4.1. Objetivos particulares .....	29
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	30
<b>6. RESULTADOS</b> .....	37
6.1. Infección de células AGS y eliminación de <i>H. pylori</i> .....	37
6.2. Ensayo en suspensión de células MCF-10A infectadas con <i>H. pylori</i> .....	39
6.3. Ensayo de quimiorresistencia de células AGS infectadas con <i>H. pylori</i> .....	41
6.4. Ensayo de invasión de células AGS infectadas con <i>H. pylori</i> .....	43
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	47
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	51
<b>9. PERSPECTIVAS</b> .....	52
<b>10. REFERENCIAS</b> .....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Incidencia mundial del cáncer .....	1
<b>Figura 2.</b> Tipos de cáncer gástrico .....	12
<b>Figura 3.</b> Clasificación histológica del cáncer gástrico.....	13
<b>Figura 4.</b> Señalización intracelular de la oncoproteína cagA.....	26
<b>Figura 5.</b> Representación general de la metodología realizada.....	30
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática de la localización de los primers para la amplificación del C-terminal de CagA .....	35
<b>Figura 7.</b> Análisis de la transducción del gen cagA en células AGS infectadas con <i>H. pylori</i> cepas CagA positivas y negativas.....	38
<b>Figura 8.</b> Análisis de la transducción del gen cagA en células MCF-10A infectadas con <i>H. pylori</i> cepas CagA positivas y negativas, y además resistentes a anoikis .....	41
<b>Figura 9.</b> Búsqueda de la transducción del gen cagA en células células AGS infectadas con <i>H. pylori</i> cepas CagA positivas y negativas quimioresistentes a etopósido.....	43
<b>FIGURA 10</b> Análisis de la capacidad invasora de células células AGS infectadas con <i>H. pylori</i> cepas CagA positivas y negativas y búsqueda del gen cagA.....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Agentes infecciosos clasificados como carcinógenos tipo I.....8

**Tabla 2.** Condiciones utilizadas para cada reacción de PCR punto final...35

## ABREVIATURAS

MALT, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa

*H. pylori, Helicobacter pylori*

EBV, Virus de Epstein Barr

CG, Cáncer gástrico

TEM, Transición Epitelio Mesénquima

ROS, Sustancias reactivas de oxígeno

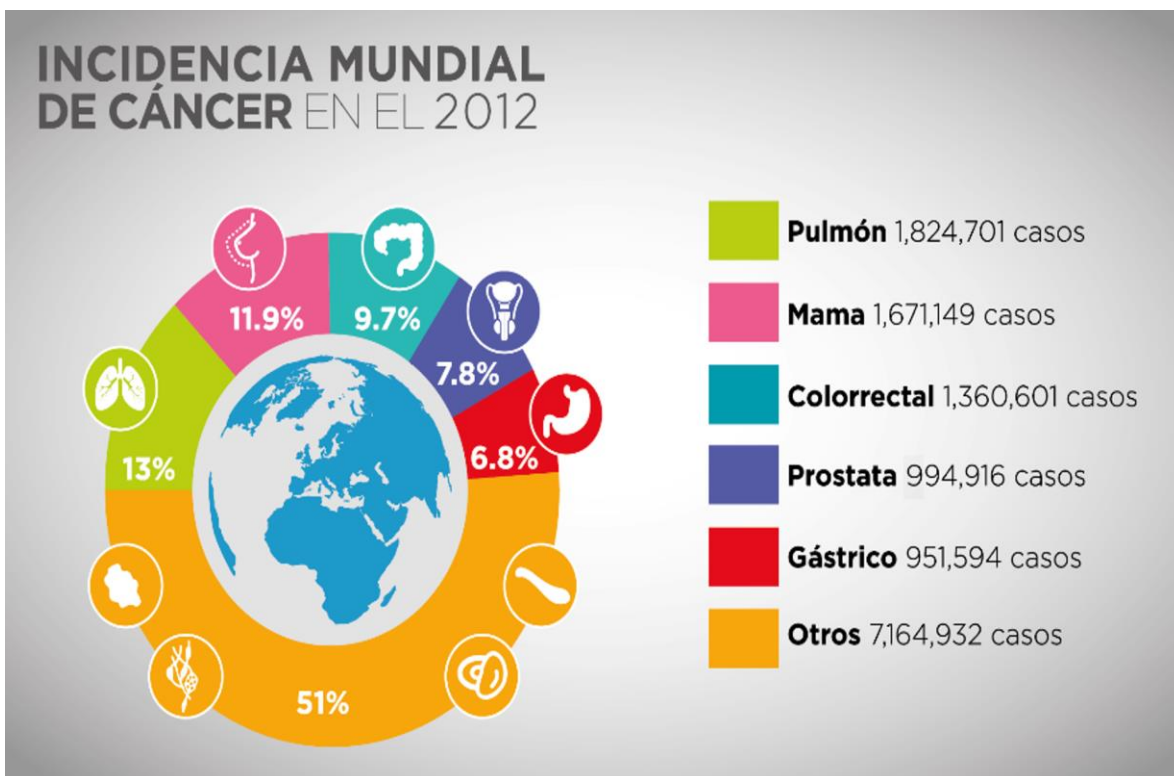
T4SS, Sistema de secreción tipo IV

IARC, Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cá

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Epidemiología

El cáncer es considerado un problema de salud mundial. En 2012, según datos registrados por GLOBOCAN, se registraron 14.1 millones de casos nuevos y 8.2 millones de muertes por cáncer. Dentro de ellos el cáncer gástrico (CG) ocupa el quinto lugar en incidencia con alrededor de un millón de casos nuevos (951,594 casos, 6.8% de todos los cánceres) después del cáncer de pulmón, mama, colorrectal y prostático (Figura 1); y el tercer lugar en mortalidad (723,073 casos, 8.8% de todas las muertes por cáncer) detrás de pulmón (1,589,925 casos, 19.4%) e hígado (745,533 casos, 9.1%) a nivel mundial.(1)



**Figura 1. Incidencia mundial del cáncer.** Se muestran los datos más recientes acerca de la incidencia mundial del cáncer.



La distribución geográfica del cáncer gástrico es irregular. En el 2012 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que más del 70% de los casos de CG ocurrieron en países en vías de desarrollo. Las tasas más altas de incidencia se dan en el este y el sudeste de Asia, Europa del Este, y en partes de América Central y del Sur. Más del 73% de los casos de CG se presentan en Asia, con casi la mitad del total mundial (47%) en China. Europa aporta casi el 15% de la carga mundial, mientras que América Central y del Sur aportan un 7% más (1). Por otro lado, la tasa de incidencia masculina tienden a ser casi del doble que la femenina (2).

### **1.1.1 Epidemiología Nacional**

En el 2010, el INEGI reportó 74,685 muertes por cáncer en la población nacional (13% de las muertes en México). De acuerdo con los datos registrados en GLOBOCAN-2012, el cáncer gástrico en México ocupa el sexto lugar en incidencia (7,680 casos, 5.2% de todos los cánceres); después de cáncer de mama (20,444 casos, 13.8%); próstata (14,016 casos, 9.5%); cérvico uterino (13,960 casos, 9.4%); colorrectal (8,651 casos, 5.8%); y pulmón (8,439 casos, 5.7%). Asimismo, el CG ocupa el tercer lugar en mortalidad (6,068 casos, 8.0% de todos los cánceres) después de cáncer de pulmón (7,608 casos, 9.7%) y próstata (6,367 casos, 8.1%). En cuanto a la mortalidad entre distintos sexos, en México el CG representa la tercera causa de muerte por cáncer entre varones y la cuarta entre mujeres. Los estados con una tasa más alta de mortalidad son la Ciudad de México, Oaxaca, Chiapas y Campeche (3).

## **1.2 Generalidades del cáncer**

El cáncer es un conjunto de enfermedades, (ya que existen más de 100 tipos de cáncer clasificados) que se caracterizan por la desregulación de funciones celulares críticas, como son entre otras, proliferación,

diferenciación y apoptosis. Sin el control apropiado de estos procesos, las células neoplásicas se reproducen en gran número lo cual conlleva a la formación de masas tumorales capaces de migrar del sitio de origen a otros sitios en el cuerpo, invadiendo estructuras adyacentes y formando colonias metastásicas en órganos distantes (4).

El tejido de origen da las características distintivas del cáncer. Aproximadamente el 85% de los cánceres se producen en las células epiteliales y son clasificados como carcinomas (4). Cuando este epitelio es epitelio glandular (por ejemplo, mama y estómago) son llamados adenocarcinomas. Los cánceres derivados de células del mesodermo (por ejemplo, hueso y músculo) se denominan sarcomas (4). Las neoplasias derivadas de células hematopoyéticas reciben diferentes nombres de acuerdo a la célula de origen y si es una célula inmadura o diferenciada.

Hanahan y Weinberg definieron en el año 2000 seis características que comparten los cánceres, también llamados "Hallmarks of cancer", las cuales son esenciales para la carcinogénesis. Posteriormente en el año 2011 se añadieron otras cuatro características promotoras como son la inestabilidad del genoma y la inflamación, y emergentes como la reprogramación del metabolismo energético y la evasión del sistema inmune. A continuación se describen de forma general cada una de estas características (5).

- Señales sostenidas de proliferación: Las células cancerosas no necesitan de señales externas provenientes de factores de crecimiento para su división, ya que son independientes de la señalización de éstos al adquirir mutaciones que permiten un crecimiento desregulado.
- Evasión de supresores de crecimiento: Las células cancerosas adquieren mutaciones que pueden silenciar a los genes supresores de

tumores, los cuales mantienen la homeostasis de la división celular por medio de señales inhibitorias de proliferación.

- Evasión de la respuesta inmune: Por medio de diferentes señales la célula cancerosa interfiere en el reconocimiento de células transformadas por el sistema inmune y evita que éste las elimine.
- Replicación infinita: Las células normales tienen un mecanismo autónomo que define un número finito de duplicaciones celulares después de lo cual se convierten en senescentes. Este mecanismo se basa en el acortamiento de los telómeros, que se produce durante cada replicación del DNA. En contraste, las células cancerosas adquieren la capacidad de mantener la longitud de sus telómeros para así obtener un sistema de replicación celular infinito.
- Inflamación: Prácticamente todos los tumores contienen células inmunes inflamatorias, las cuales pueden liberar especies reactivas de oxígeno (ROS) que son mutagénicas promoviendo las mutaciones en las células. También las células inflamatorias pueden secretar y proporcionar a la célula cancerosa factores de crecimiento y enzimas, entre otros, que facilitan procesos como proliferación, sobrevida, invasión, etc. Por lo tanto, la inflamación facilita la capacidad de adquirir las características principales del cáncer.
- Invasión y metástasis: En condiciones normales las células mantienen su ubicación en el tejido de origen como parte de un órgano y con excepción de las células hematopoyéticas, no son migratorias, sin embargo las células cancerosas adquieren la capacidad de migrar a otras partes del cuerpo dando origen a tumores secundarios. Ésta habilidad de invadir y colonizar órganos distantes es una causa importante de muerte por cáncer.
- La angiogénesis: Las células cancerosas inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos para proveerse de nutrientes y oxígeno, los cuales son necesarios para la supervivencia y expansión del tumor.

Además esta vascularización facilita la salida de la célula neoplásica hacia otros tejidos en el evento de metástasis.

- Inestabilidad genómica: La adquisición de las características principales del cáncer por lo general depende de alteraciones genómicas y la acumulación de mutaciones, al mismo tiempo cuando estas mutaciones inciden en las proteínas efectoras de las vías de reparación del DNA haciéndolas no funcionales, éstas pueden contribuir a la inestabilidad genómica.
- Resistencia a la muerte celular: Las células normales tienen una vida media al final de la cual son eliminadas mediante apoptosis. Las células también tienen mecanismos que sensan su integridad genética y activan mecanismos de apoptosis en respuesta al daño del DNA. Las células cancerosas evaden las señales de apoptosis para evadir la muerte celular.
- Reprogramación del metabolismo: Debido a la división celular incontrolada, existe un aumento en la demanda de energía y precursores del metabolismo. A diferencia de las células normales, las células cancerosas llevan a cabo la glicolisis, incluso en presencia de oxígeno para utilizar los intermediarios de la glucólisis en rutas biosintéticas.

Además de las mutaciones genéticas las alteraciones epigenéticas tienen un papel esencial en la carcinogénesis. Las modificaciones epigenéticas por lo general se producen en una etapa temprana del desarrollo del tumor (6). La expresión epigenética se refiere a los cambios heredables en el genoma que no implican un cambio en la secuencia de DNA y que pueden regular la expresión de los genes (4). Los cambios epigenéticos que se producen incluyen la metilación del DNA, modificaciones de la cromatina, y alteraciones en los perfiles de ARN no codificantes, principalmente microRNAs (miRNAs) (6).

Una gran cantidad de evidencia indica que el DNA de las células tumorales contiene muchas alteraciones que van desde mutaciones puntuales hasta grandes aberraciones cromosómicas, tales como deleciones, amplificaciones y translocaciones cromosómicas. La acumulación de mutaciones en las células lleva un largo tiempo y representa un proceso de múltiples pasos que preceden a la formación del cáncer, lo cual explica por qué existe un mayor riesgo de cáncer con la edad y por qué el cáncer se encuentra con mayor prevalencia en las últimas décadas ahora que la esperanza de vida humana ha aumentado. La acumulación de mutaciones se produce en paralelo con la evasión de los mecanismos de reparación del DNA. Cualquier alteración del DNA que no es reparada antes de la siguiente división celular se transmite a las células hijas y se mantiene en las siguientes divisiones. Si este cambio genético confiere alguna ventaja a la célula ésta formará una clona dominante que en presencia de otros *hallmarks* del cáncer puede llegar a ser una clona cancerosa.

Existen dos tipos principales de genes donde caen recaen las mutaciones que contribuyen a la carcinogénesis: oncogenes y genes supresores de tumor. Un oncogén codifica para proteínas que confieren potencial transformante, por ejemplo si inducen proliferación. Cuando un oncogén muta, la proteína que codifica se produce en cantidades más altas, o se incrementa su actividad. Una mutación en un solo alelo es suficiente para este efecto. Por otro lado los genes supresores de tumores codifican para proteínas cuya función es la de inhibición; usando el mismo ejemplo de proliferación, un incremento en proliferación se produce cuando las mutaciones causan una pérdida en la expresión o la función de la proteína supresora de tumores. Las mutaciones en genes supresores de tumor son principalmente recesivas y para observar su efecto en cáncer tienen que perderse en ambos alelos (4).

### **1.3 Cánceres de etiología infecciosa**

A comienzos del siglo XX se encontró que algunas infecciones pueden tener un papel etiológico en el cáncer (7). Una de las primeras observaciones la describió Payton Rous en 1911, al observar que extractos tumorales filtrados (eliminando células y bacterias) inducían la formación de tumores en aves, sugiriendo una etiología viral (8,7). A mediados de siglo se descubrió el primer virus oncogénico en humanos, el virus de Epstein Barr (EBV), el cual se encontró en células de linfoma de Burkitt pediátrico (9).

A nivel mundial, el 20% de todos los casos de cáncer están causados por agentes infecciosos, los cuales pueden ser bacterias, parásitos y principalmente virus (10). Algunos de estos cánceres pueden tener una gran variación geográfica (11). Dicha variación puede deberse a factores endémicos de la región o debida a factores del estilo de vida de los habitantes. Importantes en el contexto de las infecciones es el caso de la higiene y la accesibilidad a tratamientos eficaces para erradicar o controlar las infecciones. Es por ello que en países en desarrollo la tasa de incidencia de cánceres de origen infeccioso es mayor que en los países desarrollados (12,13).

Actualmente el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha clasificado como carcinógenos tipo I, los más fuertemente asociados a cáncer en humanos, a los patógenos los cuales se mencionan en la Tabla 1(14):

**TABLA 1.** Agentes infecciosos clasificados como carcinógenos tipo I.

<b>Agente infeccioso</b>	<b>Cáncer asociado</b>
<b>Virus de Epstein-Barr (EBV)</b>	Linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, carcinoma gástrico y carcinoma nasofaríngeo
<b>Virus del sarcoma de Kaposi (KSV)</b>	Sarcoma de Kaposi
<b>Virus del papiloma humano (VPH)</b>	Carcinoma cervical
<b>Poliomavirus de células de Merkel (MCPV)</b>	Carcinoma de células de Merkel
<b>Virus de la hepatitis B (HBV)</b>	Carcinoma hepatocelular
<b>Virus de la hepatitis C (HCV)</b>	Carcinoma hepatocelular, linfoma no Hodgkin
<b>Virus linfotrópico de células T humanas (HTLV1)</b>	Linfoma de células T
<b><i>Helicobacter pylori (H. pylori)</i></b>	Carcinoma gástrico, linfoma MALT
<b><i>Schistosoma haematobium</i></b>	Carcinoma de vejiga
<b><i>Clonorchis sinensis</i></b>	Cáncer del conducto biliar y cáncer de hígado
<b><i>Opistorchis viverrini</i></b>	Cáncer del conducto biliar y cáncer de hígado

Algunos de los mecanismos que utilizan estos agentes infecciosos que están implicados en la carcinogénesis han evolucionado con ellos como mecanismos de persistencia, y sus efectos varían dependiendo de las condiciones del huésped, siendo el cáncer una consecuencia secundaria y accidental a esta persistencia y no el objetivo de dichos patógenos (13). Esto puede explicar porque un agente infeccioso altamente prevalente

como EBV, que infecta aproximadamente al 95% de la población mundial, sólo en una mínima parte de ésta se asocia con cáncer.

La participación de distintos patógenos en el origen del cáncer es a través de diversos mecanismos los cuales pueden ser de forma directa o indirecta, por lo tanto el agente infeccioso puede encontrarse en la célula transformada o no necesariamente. Cuando los agentes infecciosos carcinogénicos transforman de forma directa generalmente se encuentran en el tumor de forma monoclonal (15). Con el fin de persistir dichos patógenos utilizan un mecanismo directo el cual les permite integrar el genoma infeccioso en la célula hospedero, ya sea que éste se integre al genoma celular o persista de manera extracromosomal. Esto da la opción de que por medio de la expresión de los oncogenes del patógeno o de proto-oncogenes celulares se desregulen diferentes vías de señalización que controlan procesos como la apoptosis, proliferación, mecanismos de reparación del DNA y cambios epigenéticos que en conjunto convergen en la formación del tumor (16).

Varios mecanismos pueden actuar en la transformación indirecta, donde no necesariamente el agente infeccioso se encuentra en la célula tumoral (17). Éstos pueden ser por medio de la inducción de inmunosupresión en el huésped, la estimulación antigénica crónica y la inflamación crónica (18,15). La inflamación, ya comentada anteriormente como un *hallmark* del cáncer es una característica crucial en los cánceres de etiología infecciosa. En las infecciones crónicas infecciosas mediante el reconocimiento de los patógenos por los receptores tipo Toll (TLRs) se induce la activación de factores de transcripción (como NF- $\kappa$ B) que desencadenan la respuesta inflamatoria. Por lo tanto se produce un microambiente inflamatorio donde diferentes mediadores como citocinas promueven la supervivencia y la proliferación de las células, mientras que



las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducen inestabilidad genética, lo cual contribuye a la formación y persistencia del tumor. El ejemplo mejor caracterizado de transformación a partir de inflamación crónica es la infección con *H. pylori* (19).

Un ejemplo del mecanismo directo es el virus del papiloma humano (VPH), el cual está asociado al cáncer cervical. VPH es mantenido de forma extracromosomal pero en algunos pacientes se integra por accidente en el genoma celular, perdiendo secuencias genéticas de la proteína E2, la cual regula negativamente la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7. La expresión incontrolada de E6 conduce a la evasión de apoptosis y E7 aumenta la proliferación celular, por lo tanto E6 y E7 contribuyen en el fenotipo maligno de la célula (11,15).




EBV es otro ejemplo de agente infeccioso oncogénico directo ya que transforma a partir de la expresión de oncogenes virales en la célula infectada, por ejemplo LMP-1 y LMP-2A interfieren con la proliferación, diferenciación y supervivencia de los linfocitos B. Algunos de los cánceres asociados a la infección por EBV son varios linfomas de células B, pero también el cáncer gástrico y el carcinoma nasofaríngeo (15). Algunos patógenos pueden contar con ambos mecanismos (directo e indirecto) para la transformación oncogénica, por ejemplo el virus de la hepatitis B (HVB). La infección crónica con HVB produce una necroinflamación crónica y proliferación compensatoria de hepatocitos, provocando un gran daño hepático crónico que conduce al desarrollo de fibrosis, cirrosis y carcinoma hepatocelular (HCC).(20) Al mismo tiempo, además de producir necroinflamación, el HVB cuenta con un mecanismo directo oncogénico, en el cual HVB integra su genoma en el hepatocito del hospedero en el 86.4% de los casos; dicha integración del genoma viral frecuentemente lleva a la producción de deleciones, translocaciones e inestabilidad

genómica que promueve la hepatocarcinogénesis. (21) Este proceso dual es muy dinámico, ya que hay casos en los que se desarrolla el carcinoma sin presentar inflamación crónica o por el contrario sólo la inflamación crónica y el microambiente de estrés oxidativo son capaces de promover la carcinogénesis. Esto nos muestra que probablemente estos mecanismos son independientes pero no necesariamente excluyentes, por lo que ambos pueden sumarse en la promoción del cáncer como una consecuencia accidental de su lucha por persistir en el hospedero.

#### **1.4 Cáncer gástrico**

El CG es la neoplasia más frecuente del tubo digestivo en todo el mundo. El 95% del total de CG son adenocarcinomas, cáncer del epitelio secretor o glandular. Otros tipos de cáncer en el estómago son el linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT), el tumor del estroma gastrointestinal, el tumor de tipo carcinoide, entre otros (Figura 2) (22).

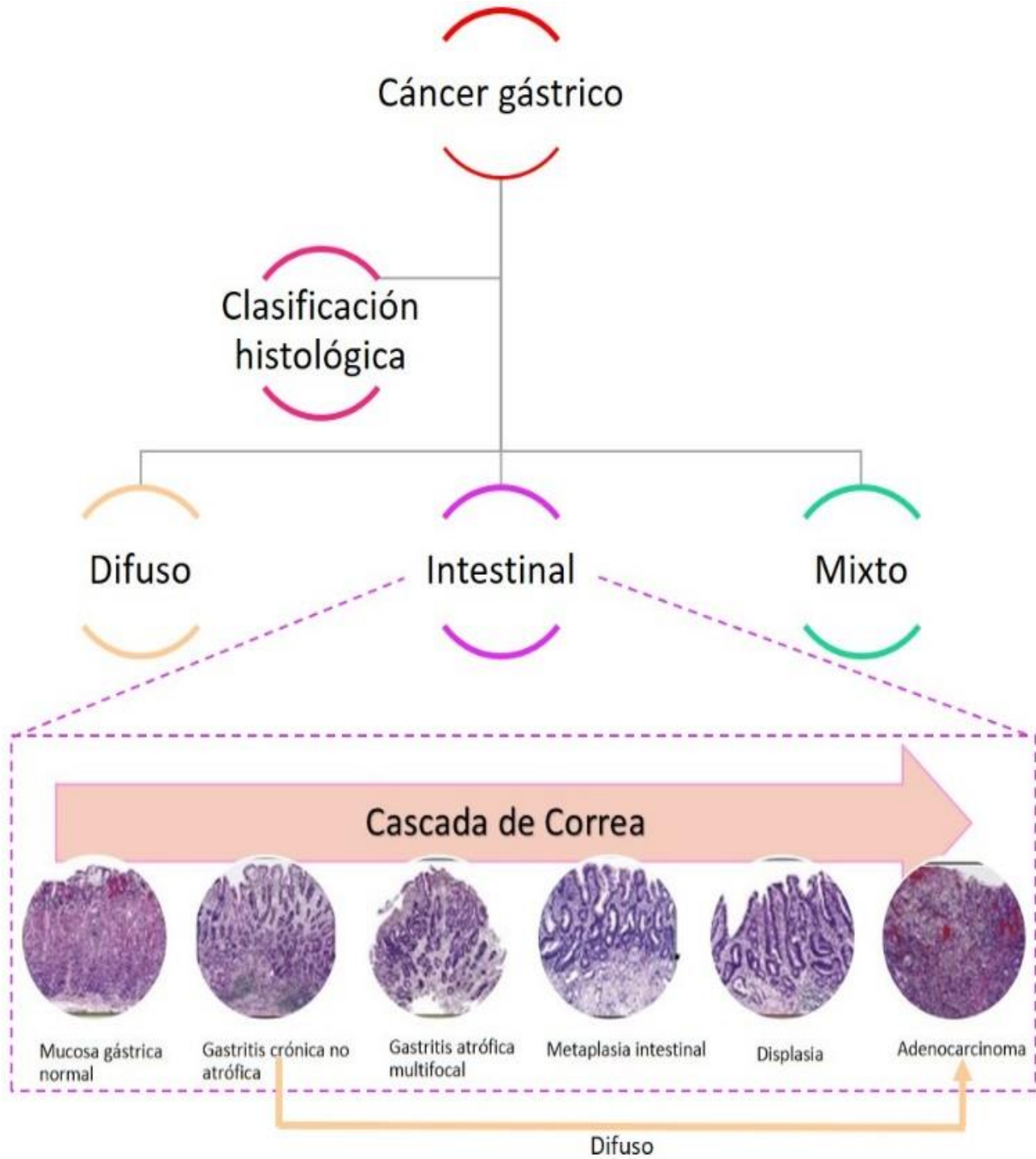
En este texto CG se refiere al adenocarcinoma gástrico. Anatómicamente el CG se clasifica de acuerdo a la región del estómago afectada en proximal (cardial) y distales, que abarca el cuerpo (región media) y el antro (región cercana al duodeno) (Figura 2). Los CGs proximal y distal tienen diferentes características epidemiológicas y clínicas. Los factores de riesgo para el cáncer gástrico proximal incluyen la obesidad, enfermedad de reflujo gastroesofágico y el esófago de Barrett (24-23); por otro lado el riesgo de cáncer gástrico distal se incrementa por la presencia de la infección con *H. pylori*, antecedentes familiares, bajo nivel socioeconómico, tabaquismo y una dieta rica en alimentos salados y un bajo consumo de frutas y vegetales (23).

<b>Cáncer gástrico</b> 	<b>Adenocarcinomas</b> <b>95%</b>	Proximal (cardial) 
		Distal (cuerpo y antro) 
	<b>Otros 5%</b>	MALT Tumor del estroma gastrointestinal Tumor de tipo carcinoide

**Figura 2. Tipos de cáncer gástrico.**

El desarrollo del CG es un proceso multifactorial, complejo y de larga duración. El adenocarcinoma gástrico es una enfermedad heterogénea. Histológicamente, según Lauren se divide en los tipos: intestinal, difuso y mixto (Figura 3)(24). En la cascada o secuencia de Correa, propuesta por el Dr. Pelayo Correa *et al* en 1975, se propone la relación del CG y la presencia de cambios histológicos progresivos en la mucosa gástrica, lo que lleva a CG a través de la progresión de las siguientes lesiones: mucosa gástrica normal, gastritis crónica activa no atrófica, gastritis atrófica multifocal, metaplasia intestinal, displasia y adenocarcinoma (Figura 3). Esta secuencia de lesiones conduce específicamente al cáncer gástrico de tipo intestinal. A las lesiones intermedias desde gastritis atrófica hasta displasia se les reconoce como lesiones pre-neoplásicas porque ya confieren un riesgo incrementado de desarrollar CG. Por su

parte el CG de tipo difuso surge de la gastritis no atrófica y no tiene lesiones pre-neoplásicas intermedias (25,26).



**Figura 3. Clasificación histológica del cáncer gástrico.**

### **1.4.1 Factores de riesgo de CG**

Existen diferentes estudios que han permitido asociar varios factores de riesgo con la carcinogénesis y desarrollo del CG. Dentro de ellos encontramos a agentes infecciosos, a otros agentes ambientales y factores genéticos del hospedero.

#### Agentes infecciosos

Entre los factores infecciosos se han asociado dos agentes importantes. El primero de ellos es la infección por la bacteria *H. pylori*, la cual se considera el principal factor de riesgo para el desarrollo del CG. La infección persistente con *H. pylori* se ha relacionado con un microambiente inflamatorio crónico que conlleva al desarrollo de lesiones gastrointestinales y precancerosas como gastritis no atrófica, úlcera duodenal, gastritis atrófica y metaplasia (27).

El otro agente infeccioso es el virus de Epstein-Barr (EBV). La infección por EBV se asocia causalmente con aproximadamente el 10% de los CGs. El CG asociado a EBV se define como la proliferación de las células tumorales del CG con infección monoclonal y latente por EBV (28,29). El CG asociado a EBV (EBVaCG) se ha relacionado a diferentes funciones de los genes de latencia viral, cambios epigenéticos en el genoma de la célula tumoral y la sobre-expresión de miRNAs virales, entre otras características (30,29).

#### Agentes ambientales asociados al estilo de vida

Una dieta alta en sales y alimentos conservados en sal están relacionados con un aumento del riesgo de CG, sobre todos en países asiáticos en los cuales el CG es endémico. El tabaquismo y el consumo de alcohol parecen ser factores de riesgo moderados. Estudios de casos y controles

relacionan la ingesta adecuada de frutas y verduras frescas con un efecto protector contra el CG, gracias a los micronutrientes y anti-oxidantes que proporcionan (27,17). Por otro lado, se ha observado que los países en vías de desarrollo muestran una incidencia de CG mayor que los países más desarrollados, en donde el CG ha disminuido gracias a la erradicación de *H. pylori* y mejores condiciones de vida e higiene. Por lo tanto, el nivel socioeconómico se asocia de forma inversa al cáncer gástrico distal (27).

#### Factores genéticos del hospedero

Aproximadamente de 1 a 3% de los CG son hereditarios. Entre ellos, uno de los más comunes es el cáncer gástrico difuso hereditario que se debe a mutaciones inactivantes en línea germinal en el gen que codifica para E-cadherina (*CDH1*). Otros factores de riesgo genéticos que se han identificado son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en diferentes genes que participan en la respuesta inmune inflamatoria, por ejemplo en los genes de citocinas pro- y anti-inflamatorias como interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-10, IL-8 y el factor de necrosis de tumores (TNF) $\alpha$  (31).

### **1.5 Asociación de *H. pylori* y CG**

*H. pylori* es un bacilo con forma espiral Gram negativo y microaerofílico. Mide aproximadamente 2.5-4.0  $\mu\text{m}$  de largo por 0.5 – 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho y tiene de dos a seis flagelos unipolares, fundamentales para su movilidad en el moco del estómago, constituidos principalmente por la proteína flagelina. La bacteria tiene una envoltura doble lipídica en la cual abundan las proteínas de adhesión que la bacteria utiliza para interactuar con el epitelio del estómago (32).

En 1982, *H. pylori* fue aislada por Barry Marshall y Robin Warren a partir de tejido de la mucosa gástrica en pacientes con gastritis sintomática y úlceras, por lo que dichos investigadores propusieron que *H. pylori* podría ser el agente causal de estas lesiones gástricas inflamatorias (33). Desde ese momento la asociación de la infección con *H. pylori* y el CG se comenzó a estudiar. Países asiáticos (por ejemplo Japón, China, Corea, Nepal, Bután y Mongolia) tienen una alta prevalencia de infección con *H. pylori* y de las variantes más patogénicas, y son los países que presentan la mayor incidencia de CG. Por su parte, una baja incidencia de CG y de infección por *H. pylori* se observa en países como Estados Unidos y Alemania. Esta relación epidemiológica apoya la relación causal, misma que fue reforzada en estudios en los cuales se observó que individuos en los que se eliminó farmacológicamente a la bacteria presentaban una menor tasa de evolución a CG que aquellos que no fueron tratados (2).

En el estudio de Uemura *et al* que incluyó a 1246 pacientes infectados con *H. pylori* y 280 pacientes no infectados, los cuales fueron evaluados por endoscopia y biopsia realizadas al inicio del estudio y durante un seguimiento de duración media de 7.8 años, se encontró que el 2,9% (36) pacientes desarrolló CG en el grupo infectado con *H. pylori*, en comparación con los individuos que no estaban infectados y donde ninguno presentó CG (34).

Mundialmente se estima que *H. pylori* coloniza el estómago del 50% de la población, generalmente la infección ocurre durante la infancia, principalmente en países en vías de desarrollo como es el caso de México. La asociación del CG con *H. pylori* fue mucho más estrecha cuando se detectaron serológicamente anticuerpos anti-*H. pylori* en sueros recolectados años anteriores al diagnóstico del CG (35). Se observó un aumento gradual en el título de anticuerpos anti-*H. pylori* a medida que

las lesiones pre-neoplásicas progresaban; por ejemplo, los títulos fueron menores en gastritis no atrófica y significativamente mayores en metaplasia. Mientras que aun en zonas endémicas para CG, individuos con títulos bajos de anticuerpos no presentaban lesiones inflamatorias gástricas severas y tenían un riesgo disminuido de progresión a CG. Estos datos apoyan que la infección crónica de *H. pylori* en la mucosa gástrica es fundamental para el inicio del CG (36,37).

En México, el estudio de Camorlinga *et al* analizó la prevalencia de seropositividad en 618 pacientes, los cuales presentaban gastritis no atrófica (368 casos), gastritis atrófica (14 casos), metaplasia intestinal (110 casos), CG (65 casos) y ulcera duodenal (59 casos). Los resultados del estudio mostraron seropositividad en 73%, 85%, 82%, 66% y 88% de los casos, respectivamente; mientras que la detección de la infección confirmada histológicamente fue en 63%, 78.6%, 69%, 41% y 81%, en cada grupo, respectivamente. El análisis permitió establecer que la prevalencia de la infección, tanto serológica como histológica, es mayor en casos con gastritis y metaplasia intestinal y es menor en casos con cáncer gástrico (38). La interpretación que se le dio a estos resultados es que el papel de *H. pylori* es muy importante en las primeras etapas de la evolución a CG.

Éstos y otros estudios epidemiológicos muestran que la infección con *H. pylori* está íntimamente asociada a un mayor riesgo de CG. Es por ello que en 1994, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer y la Organización Mundial de la Salud (IARC/OMS) define a *H. pylori* como un carcinógeno tipo 1, afirmando que existe la evidencia necesaria para considerar que *H. pylori* tiene una relación causal con la carcinogénesis gástrica en los seres humanos (39).



Para obtener evidencia directa y mecánica de la relación causal entre la infección con *H. pylori* y la carcinogénesis gástrica se realizaron diversas investigaciones en modelos animales, así como también en estudios experimentales *in vitro*. Dentro de los modelos animales más estudiados se encuentran: el mono japonés, los jerbos de Mongolia y la adaptación de cepas de *H. pylori* a crecer en cepas de ratón. En estos modelos se ha logrado reproducir la infección persistente de la mucosa gástrica con *H. pylori* similar a la de los humanos. En 1996, Hirayama encontró que en un modelo de jervo de Mongolia se puede inducir gastritis a las 12 semanas posteriores a la inoculación con *H. pylori*, úlcera gástrica a las 24 semanas y metaplasia intestinal de 24 a 48 semanas; acompañados de infiltración extensa de neutrófilos y linfocitos (40). Watanabe *et al* reportó que la infección con *H. pylori* puede inducir CG a las 62 semanas de la inoculación con *H. pylori* en un modelo de jerbos de Mongolia. En este caso se infectaron 27 jerbos con una cepa de *H. pylori* aislada de un paciente con úlcera gástrica, de los jerbos infectados 10 (37%) desarrollaron CG, principalmente de tipo intestinal (41). Los modelos *in vitro* se han realizado en células epiteliales gástricas en cultivo, estos estudios han ayudado a identificar a factores de virulencia bacterianos, por ejemplo la proteína CagA, que pueden interactuar con moléculas de diferentes vías de señalización para favorecer los procesos de carcinogénesis (42). Esto se describirá más a detalle en la siguiente sección.

Como se mencionó anteriormente, campañas de erradicación de *H. pylori* con antibioticoterapia han permitido combatir la aparición de CG. En un estudio donde se erradicó *H. pylori* en 253 pacientes infectados no se observó el desarrollo de CG en una duración media del seguimiento de 7.8 años (34). De igual forma, en pacientes que se les detectó CG en una etapa temprana y fueron tratados quirúrgicamente de forma exitosa, la

erradicación de *H. pylori* evitó una nueva incidencia de CG (43). En general, las políticas públicas de erradicación de *H. pylori* han permitido la disminución en la incidencia y mortalidad del CG. Sin embargo el diagnóstico del CG sigue siendo muy tardío en muchas partes del mundo.

### **1.6 Factores de virulencia de *H. pylori***

*H. pylori* posee varios factores de virulencia, los cuales contribuyen a su patogenicidad, facilitando la colonización y prevalencia en la mucosa gástrica, estableciendo un microambiente inflamatorio productor de sustancias reactivas de oxígeno (ROS) altamente mutagénicas, así como la disrupción de varias vías de señalización críticas de la integridad del epitelio gástrico del hospedero (44). Un paso crítico para la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* es la supervivencia a las condiciones ácidas del estómago. *H. pylori*, a pesar de no ser una bacteria acidófila, cuenta con mecanismos para protegerse del pH ácido. Éste se basa en la producción de una enzima llamada ureasa. La ureasa es la enzima más abundante producida por *H. pylori*. Ésta cataliza la hidrólisis de la urea en amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y dióxido de carbono. Los protones del medio ácido se acoplan al amoníaco produciendo al ion amonio que neutraliza el microambiente ácido, manteniendo un pH de 6 a 7 en torno a la bacteria, lo que le permite alcanzar la superficie de las células de la mucosa (23). Su actividad está regulada por un gradiente de protones dependiente del pH del medio, el cual regula el cierre o apertura del canal que transporta la urea dentro de la bacteria (45).

Como una medida también para no exponerse al pH ácido del estómago, *H. pylori* se mueve hacia las células del epitelio. Su motilidad es proporcionada por varios flagelos y la proteína flagelina que le permiten desplazarse entre la viscosidad del moco gástrico y llegar a la superficie de la célula en la cara apical del epitelio. La forma en espiral también

facilita su movimiento (46). Una vez que *H. pylori* alcanza la superficie del epitelio gástrico, necesita adherirse a la célula para evitar su excreción por el peristaltismo o el vaciado gástrico. Para esto, cuenta con proteínas de membrana externa con funciones de adhesinas (45). Las más estudiadas son BabA y Saba, las cuales se unen al antígeno A del grupo sanguíneo y a ácido siálico, respectivamente. Hay otras proteínas de adherencia como AlpA y AlpB, HopZ y OipA. También gracias a la adhesión *H. pylori* puede alterar funciones de la célula hospedero, obteniendo sustratos metabólicos y nutrientes que le permiten replicarse (47). Una de las proteínas que le permite realizar lo anterior es la proteína vacuolizante VacA. VacA es secretada por la bacteria en la proximidad de la célula epitelial gástrica a la cual se integra en la membrana lipídica formando un canal selectivo de aniones (48). Posteriormente se produce un gradiente de pH que atrae sustancias alcalinas al interior. En ensayos *in vitro* este efecto correlaciona con la captación de agua por ósmosis originando la vacuolización y muerte celular (49). También VacA induce la autofagia y apoptosis mediante la liberación del citocromo c por la activación de proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak (50). Existe una variación del gen que codifica para VacA, donde la variante s1m1 se asocia a un mayor riesgo de desarrollar lesiones precancerosas (48).

La siguiente toxina es CagA. CagA es una proteína que es exportada a las células hospedero mediante un sistema de secreción tipo IV (T4SS). Una vez inyectada, CagA puede ser o no fosforilada e interactuar con proteínas efectoras de distintas vías de señalización alterando funciones esenciales de la célula. De forma general CagA participa en los cambios morfológicos en el citoesqueleto, proliferación celular, supervivencia, interrupción de las uniones inter-celulares y la polaridad (48).

## 1.7 cagPAI Y T4SS

*H. pylori* es de las bacterias más diversas en su genoma y con una alta tasa de recombinación (27). Esta evolución a través del tiempo le ha permitido adquirir factores de virulencia que favorecen su patogénesis. Un ejemplo es la isla de patogenicidad de CagA (cagPAI), la cual fue descubierta en 1996 y se cree que fue adquirida hace unos 60,000 años por medio de transferencia horizontal de genes (conjugación) de otras bacterias ancestrales (51,52). Su subsistencia actual sugiere que la cagPAI proporcionó muchas ventajas evolutivas a *H. pylori*. Las cepas de *H. pylori* cagPAI positivas se asocian a un mayor riesgo de desarrollar CG. La cagPAI es un segmento de DNA de aproximadamente 40 kilobases que contiene cerca de 31 genes. Entre estos genes, el gen que da nombre a la isla es el que codifica a CagA, y los restantes en conjunto codifican los componentes que forman el sistema de secreción tipo IV (T4SS) (53). Los T4SS han evolucionado de los mecanismos de conjugación de DNA en distintas bacterias. Éstos han sido explotados por las bacterias para también utilizarlos como un medio de transporte de factores de virulencia, y así poder intervenir en funciones bioquímicas de la célula hospedero que les beneficie (54). Actualmente se sabe que los T4SSs son utilizados para transducir diferentes tipos de sustratos como proteínas efectoras o material genético a otras bacterias y a células eucariotas (como células de mamífero, células vegetales u hongos) (55).

La comprensión de los T4SSs está basada en el T4SS de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), ya que éste ha sido el más caracterizado hasta ahora, convirtiéndose en el prototipo. Algunas otras bacterias que cuentan con T4SS son bacterias de los géneros, *Bartonella*, *Bordetella*, *Brucella*, *Helicobacter* y *Legionella* (55). El modelo del T4SS de *A. tumefaciens* consta de 11 proteínas canónicas codificadas por VirB (virB1-

virB11 genes), la proteína de acoplamiento VirD4 y la NTPasa, de los cuales *H. pylori* cuenta con las proteínas ortólogas VirB, VirD4 y una NTPasa. También cuenta con otros componentes esenciales que no tienen similitud con proteínas conocidas como CagL, CagI, y CagH, que no son homólogas a los componentes del T4SSs en otras especies bacterianas, pero se sabe que son esenciales para la actividad del T4SS del cagPAI (56).

La composición del T4SS de *H. pylori* puede clasificarse en tres grupos:

- 1) Proteínas básicas que se ensamblan para formar el canal del complejo: CagH, CagM, CagN, CagT(VirB7), CagU, CagV(VirB8), CagW(VirB6), CagX(VirB9), CagY(VirB10) y Cag $\delta$
- 2) Componentes o subunidades asociadas al pili: CagC(VirB2), CagH, CagI, CagL y CagY(VirB1)
- 3) Componentes de conversión de energía: CagE(VirB3/VirB4), Cag $\alpha$ (VirB11) y Cag $\beta$ (VirD4) (57,56,53).

El T4SS forma una especie de jeringa molecular, y su ensamblaje depende de múltiples interacciones proteína-proteína que forman el complejo macromolecular y varios factores asociados al pili que se unen a integrinas (como CagL que se une a la integrina  $\alpha_5\beta_1$ ) que actúan como receptores en la célula hospedero (58). La formación del pili es inducida por el contacto de la bacteria con la célula hospedero, pero también puede ser modulada por condiciones ambientales. Por ejemplo, una baja disponibilidad de hierro induce una mayor producción de pili para translocar CagA, mientras que un agotamiento de zinc puede disminuir la biogénesis del pili del T4SS y por lo tanto inhibe la translocación de CagA (59). Además de la translocación de CagA, la actividad del T4SS puede contribuir a la respuesta inflamatoria estimulando la sobreexpresión de IL-8. Cuando *H. pylori* hace contacto con el epitelio gástrico, el sistema

de jeringa del T4SS exporta también peptidoglicano (dipéptidos de muramilo) al citoplasma de la célula hospedero. Los dipéptidos de muramilo se unen a la proteína Nod1, la cual activa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B que induce la expresión de varios genes como IL-8 que favorecen la respuesta inflamatoria (56).

### **1.8 La oncoproteína CagA**

La proteína CagA es la cuarta proteína más abundante en *H. pylori*, sin embargo no todas las cepas la producen. Por lo tanto, las cepas de *H. pylori* pueden clasificarse en las que contienen el gen *cagA* (CagA positivas) y las que no lo tienen (CagA negativas) (60). En la población occidental, las cepas CagA positivas son las que se asocian más significativamente con lesiones precancerosas como gastritis atrófica y adenocarcinoma gástrico, en comparación con las cepas CagA negativas. Por otro lado, en países asiáticos en los que CG es endémico, casi todas las cepas son CagA positivas, lo que correlaciona con el mayor número de casos de CG que presentan.

Actualmente CagA es clasificada como una oncoproteína debido a su asociación al CG. CagA es traslocada a la célula hospedero por el T4SS; tiene un peso molecular de 120-145 kDa y una vida media de aproximadamente 200 minutos (61). La infección de los jerbos con cepas *H. pylori* *cagPAI* negativas resultó en una inflamación gástrica significativamente menor y menos úlceras gástricas en comparación con los infectados con cepas CagA positivas. En el mismo modelo, si se eliminaba experimentalmente CagA (cepas isogénicas CagA negativas) también se eliminaba la carcinogénesis gástrica asociada con *H. pylori* (62). Otro estudio importante es el de Ohnishi *et al*, quienes encontraron evidencia directa de la oncogenicidad de CagA *in vivo*. La expresión transgénica de CagA en ratones condujo al desarrollo de hiperplasia

epitelial gástrica y adenocarcinoma gástrico (25). Es por estos datos que CagA se considera la única oncoproteína bacteriana de la que se tiene conocimiento y cuyo mecanismo molecular pareciera semejar al de un oncogen viral, como se verá más adelante.

La secuencia de CagA cuenta con una región repetida llamada "motivos EPIYA" por los aminoácidos que la forman (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala), presente en la región carboxilo-terminal de CagA. Hay cuatro motivos EPIYA distintos (A, B, C, o D). La diferencia entre ellos es la secuencia de aminoácidos que rodean al motivo EPIYA. Los motivos EPIYA-A y EPIYA-B se encuentran presentes en las cepas *cagA* positivas de todo el mundo. El EPIYA-C se observa generalmente sólo en las cepas de los países occidentales, las cuales pueden tener una CagA con EPIYAs ABC, ABCC y ABCCC, donde un número mayor de EPIYA-C confiere un mayor riesgo a desarrollar CG (23). En contraste, el motivo EPIYA-D es casi exclusivo de las cepas asiáticas.

CagA puede alterar la señalización en la célula hospedero de manera fosforilación dependiente e independiente a la fosforilación (Figura 4). Una vez que CagA es translocada a la célula hospedero, se ancla a la membrana interna donde es fosforilada en la tirosina de los motivos EPIYA por cinasas de la familia Src y Abl. CagA fosforilada activa a la fosfatasa SHP2, y a su vez SHP2 desfosforila a la cinasa de adhesión focal (FAK), lo que da lugar a una motilidad celular elevada y a la reorganización del citoesqueleto en una forma alargada, llamada fenotipo colibrí. Además CagA activa la vía de señalización de Ras-ERK, la cual regula procesos de proliferación, migración y adherencia. También CagA participa en la alteración de la polaridad celular apical y basolateral por medio de PAR1/MARK lo que se traduce en la pérdida de la arquitectura del epitelio gástrico (63).

Otra de las vías que activa CagA es la vía de PI3K/AKT la cual participa en la regulación negativa de proteínas como p21, p27, resistencia a anoikis y en la inducción de la vía Wnt /  $\beta$ -catenina (64). Por otro lado, CagA no fosforilada interactúa con distintas proteínas como E-cadherina (asociada a  $\beta$ -catenina), c-Met, Grb2 y PAR1. Estas interacciones independientes de la fosforilación inducen la interrupción de las uniones estrechas y las adherentes, pérdida de la polaridad celular y respuestas proinflamatorias y mitogénicas, todo lo cual contribuye a la carcinogénesis gástrica (64).



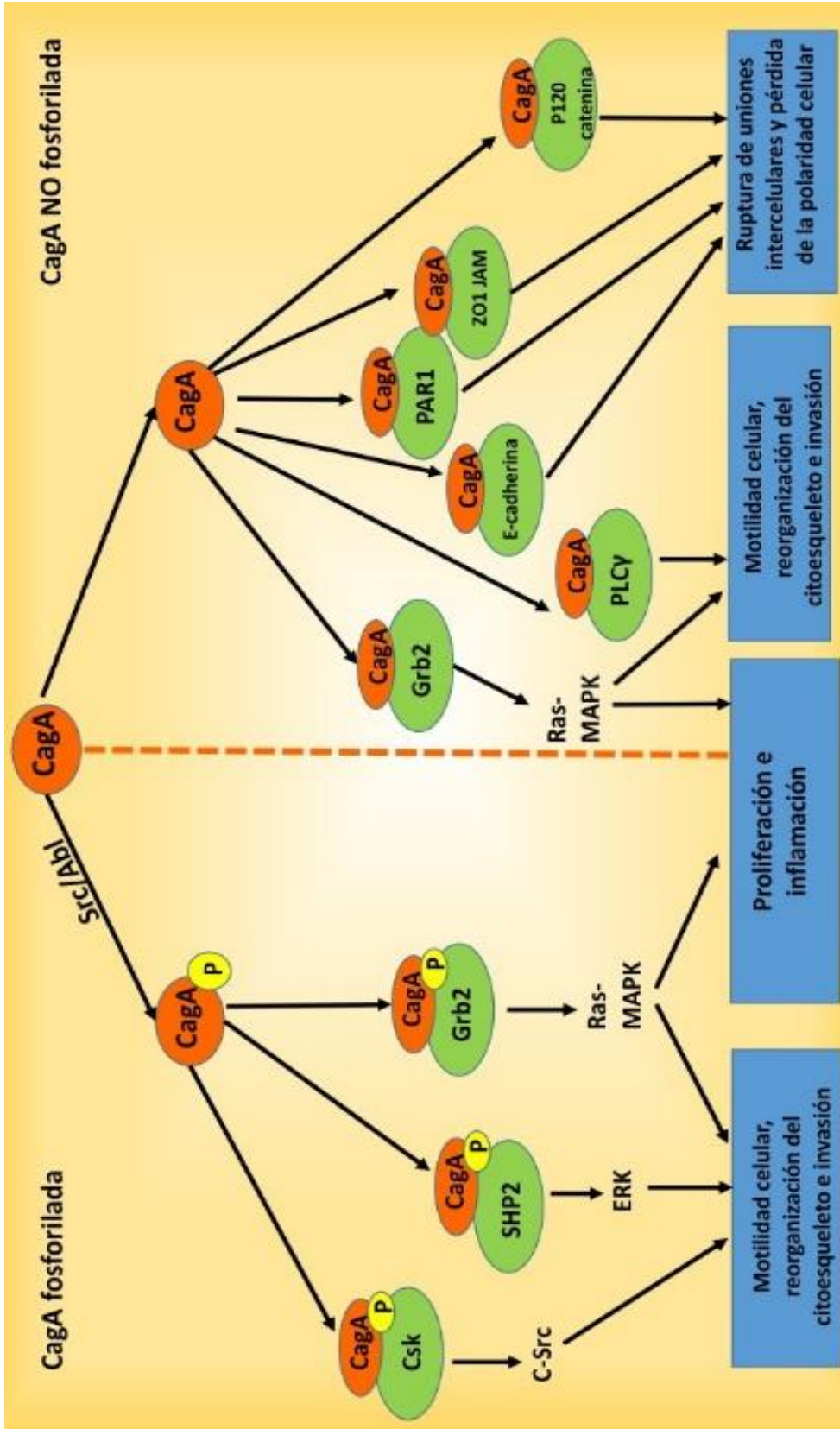


Figura 4. Señalización intracelular de la oncoproteína cagA.

## **1.9 Modelo de transformación mediado por oncogenes virales**

Como ya se ha mencionado el sistema de secreción tipo IV (T4SS) es un conjunto de proteínas que puede ensamblarse en la membrana y pueden transportar diferentes sustratos como proteínas o complejos de DNA/proteína a células bacterianas, vegetales o de mamífero.

La transferencia de DNA por medio del T4SS a células eucariotas se ha observado en *Agrobacterium tumefaciens*, además de ser el sistema de secreción tipo IV de referencia. *A. tumefaciens* codifica el plásmido Ti el cual se transporta a las células vegetales, donde se integra en una región del DNA genómico, transformando genéticamente a la célula. El DNA insertado codifica a las enzimas que catalizan la síntesis de hormonas vegetales y su transducción resulta en el desarrollo de tumores en la planta infectada (65).

Este mecanismo de transferencia de DNA se ha encontrado recientemente también en *Bartonella henselae*, la cual moviliza un plásmido a las células endoteliales vasculares humanas (66,11). Por lo tanto, así como *A. tumefaciens* y *B. henselae* pueden transferir DNA a la célula hospedero eucariota, otras bacterias que cuentan con el T4SS, como *H. pylori* podrían tener la misma capacidad, de modo que la transferencia de material genético bacteriano confiera un riesgo incrementado para la transformación de la célula hospedero. Aunque la capacidad transformante de CagA ha sido demostrada en modelos animales, resulta a partir de manipulación genética y expresión ectópica constitutiva. En la infección natural de la bacteria no se entiende de qué manera una proteína de vida media corta puede participar en la carcinogénesis del epitelio gástrico.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es un problema de salud pública mundial y una de las causas de mayor mortalidad en el mundo. A nivel mundial y nacional, el cáncer gástrico es el tercero con mayor mortalidad. El principal factor de riesgo determinante para el desarrollo de cáncer gástrico es la infección con la bacteria *H. pylori*. En la infección por *H. pylori*, ésta hace uso de varios factores de virulencia, entre ellos la oncoproteína CagA. CagA es traslocada a la célula hospedero por medio de un sistema de secreción tipo IV. CagA modula distintas vías de señalización celular asociadas a varios procesos de carcinogénesis. Homologando a los oncogenes virales, CagA debiera encontrarse crónicamente en las células blanco para promover la transformación oncogénica irreversible, sin embargo CagA tiene una vida media en el interior de la célula de aproximadamente 200 minutos. En este estudio se propone que el gen de cagA pudiera también ser introducido a la célula epitelial hospedero, igualmente homologando a los T4SS de *A. tumefaciens* y *B. Henselae*. Por lo tanto en este trabajo se propone realizar por medio de PCR en un modelo de infección de células AGS con *H. pylori*, la búsqueda de DNA codificante para CagA en células epiteliales infectadas, ya que no se sabe cómo es que CagA puede mantenerse crónicamente en las células epiteliales gástricas para transformarlas a un fenotipo maligno y producir el tumor.

### **3. HIPÓTESIS**

*H. pylori* puede translocar DNA que codifica para la oncoproteína CagA a células epiteliales gástricas, lo cual favorecerá al fenotipo maligno de la célula epitelial hospedera.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

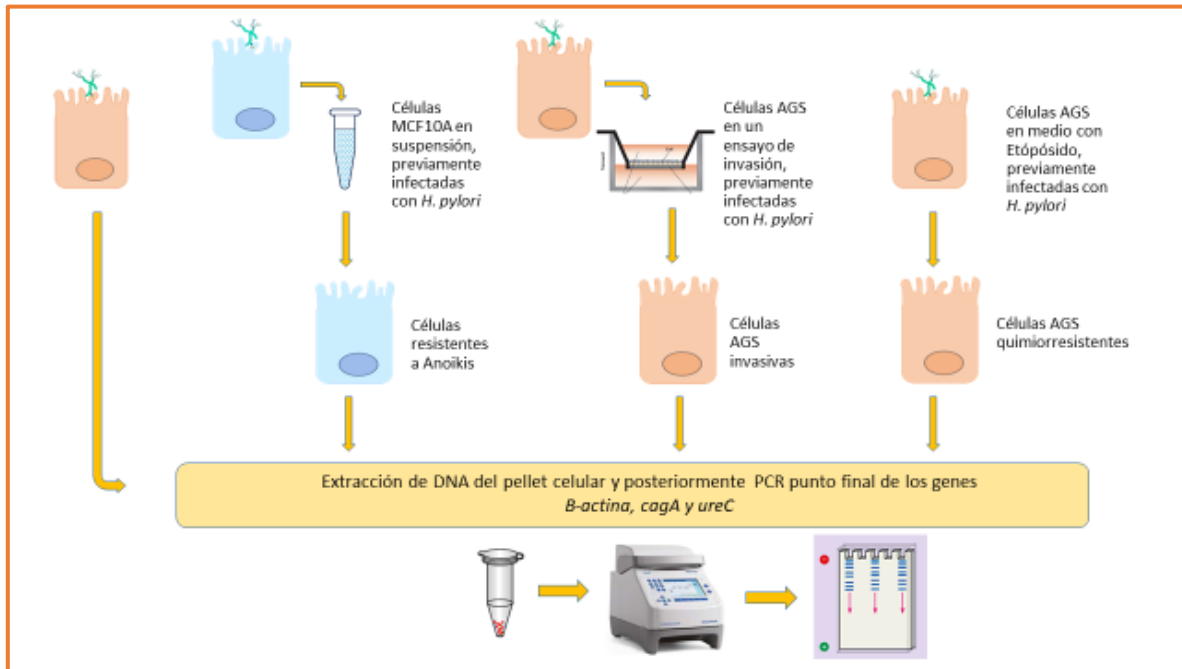
Evaluar si existe una transducción selectiva del DNA de *H. pylori* que codifica para la oncoproteína CagA en las células hospedero que explique la asociación que tiene dicha proteína con cáncer gástrico.

#### **4.1 Objetivos particulares**

- Evaluar si existe una transducción selectiva del DNA de *H. pylori* que codifica para la oncoproteína CagA en la línea celular AGS la cual proviene de epitelio gástrico y es permisiva a la infección.
- Analizar las condiciones como el crecimiento celular ante mecanismos de inducción de muerte por apoptosis, quimiorresistencia e invasión, que pudieran favorecer la translocación de material genético al conferir ventajas en la célula infectada.

## 5. METODOLOGÍA

En la Figura 5 se ilustra un diagrama de flujo general de la metodología, la cual es posteriormente detallada en cada apartado.



**Figura 5. Representación general de la metodología realizada.**

### Cepas y cultivo de *Helicobacter pylori*

Las cepas de *H. pylori* que se utilizaron en este estudio son dos, una CagA positiva y otra CagA negativa. La primera es una cepa que contiene una CagA de tipo occidental, es decir con un motivo EPIYA ABCCC, la cual fue comprada a *American Type culture collection* (ATCC, Manassas, VA, USA) e identificada con el número 43504. La segunda cepa se obtuvo de un aislado clínico de nuestro grupo de trabajo, la cual se identificó como 365A3 y cuenta con una CagPAI incompleta ya que carece del gen de *cagA*.

Para crecer a *H. pylori* se preparó agar sangre utilizando Agar base sangre (BD, Bioscience, San Jose, CA, USA No. 211037) suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 5%. Se realizó la siembra con un hisopo estéril y se incubó a 9% de CO<sub>2</sub> y 37°C por 48 horas hasta que se formó un cesped en la placa.

### Líneas celulares

Se utilizó a las células AGS de epitelio glandular derivado de cáncer gástrico debido a que es el modelo de infección con *H. pylori* más estudiado. Por otro lado, se utilizó también a las células MCF-10A, epitelio glandular de mama, como modelo de células no transformadas. Las células AGS se cultivaron en medio F12 (GIBCO No. 11765) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, GIBCO No. 12483-020). Las células MCF-10A adquiridas de la ATCC (CRL-10317), se crecieron en medio DMEM suplementado con suero de caballo (GIBCO-16050-114), con factor de crecimiento epidermal (EGF-PREPROTECH No. AF-100-15), hidrocortisona (SIGMA No. H-0888), toxina del cólera (SIGMA No. C-8052) e insulina (Sigma No. I-1882), como se ha descrito previamente.(67) Las células se mantuvieron a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### Ensayos de infección de células AGS y MCF-10A con *H. pylori*

Para realizar la infección con *H. pylori*, primero se cultivan las células que se van a infectar en una placa de seis pozos. Se siembran 800 000 células (aprox. 80% de confluencia) en 1 mL de medio no suplementado en cada pozo. Al momento de realizar la infección *H. pylori* debe de encontrarse en la fase logarítmica de crecimiento (aproximadamente 24 horas en cultivo).

Para realizar los ensayos se utilizó un MOI (multiplicidad de infección, se refiere al número de bacterias por cada célula infectada) = 50 de *H. pylori*, el cual se cuantificó de la siguiente manera. Se tomó el césped de *H. pylori* con un hisopo estéril y en campana de flujo laminar y se re-suspendió en 1 mL de PBS 1X en un tubo de 1.5 mL. Se centrifugó a 4,000 rpm por 5 minutos, se decantó y se adicionó nuevamente 1 mL de PBS para volver a re-suspender la bacteria (suspensión inicial). A partir de esta suspensión, se tomaron 100  $\mu$ L que se llevaron a 1 mL en otro tubo de 1.5 mL (dilución 1:10). De la suspensión diluida 1:10 se cuantificó la bacteria por espectrofotometría a 550 nm. A partir de la absorbancia se calculó la cantidad de bacteria total, en una relación de una Abs = 1 es equivalente a  $1 \times 10^9$  de bacterias totales en la suspensión inicial. Después se calculó el volumen requerido de la suspensión bacteriana para infectar, dependiendo del MOI y del número de células que se van a infectar. En este estudio se utilizó un MOI de 50, al menos que se especifique de otra manera.

Con el fin de mantener el volumen del medio de crecimiento de las células constante en todas las condiciones, antes de agregar la suspensión bacteriana se retiró un volumen de medio no suplementado igual al volumen de suspensión bacteriana requerida. Las infecciones se incubaron por 24 horas en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Para eliminar la bacteria después de la infección, las células fueron lavadas 3 veces exhaustivamente con PBS 1x y azida de sodio 0.1%. Después se agregó medio suplementado con gentamicina (1.5 mg/mL) incubando por una hora. Pasado el tiempo se lavaron nuevamente las células y se observaron con el microscopio para verificar que la bacteria se hubiera eliminado. Posteriormente las células infectadas se utilizaron para los diferentes ensayos.

### Ensayo de células en suspensión

Las células MCF-10A fueron infectadas por 24 horas con las cepas de *H. pylori*. Después las células fueron despegadas del plástico con tripsina 0.25% / 0.53 mM de EDTA y se incubaron en suspensión durante 8 horas a 37°C y con agitación baja. Transcurrido el tiempo se colocó la suspensión celular en una placa; las células vivas que se pegaron al plástico se incubaron hasta confluencia. Finalmente se despegaron con tripsina al 0.25%/0.53 mM para extraer el DNA y realizar el análisis por PCR de los genes bacterianos.

### Ensayo de quimioresistencia.

Células AGS se cultivaron al 70% de sub-confluencia en una placa de 6 pozos, se infectaron durante 6 horas con las cepas de *H. pylori*, en medio F12 libre de SFB. Después del tiempo de infección se eliminó la bacteria como se mencionó antes y se cultivaron las células en medio suplementado y con el fármaco quimioterapéutico etopósido a una concentración de 8  $\mu$ M y 16  $\mu$ M.

Después de 7 días con etopósido, se dejó proliferar el cultivo con medio fresco suplementado y sin etopósido. Posteriormente se despegaron con tripsina al 0.25%/0.53 mM, de donde se tomó la mitad de las células para el análisis por PCR (denominado pase cero) y la otra mitad se volvió a sembrar en un nuevo pozo (pase uno). El pase uno se mantuvo con medio suplementado para su proliferación y más tarde se despegaron de la misma forma para el posterior análisis por PCR de los genes bacterianos.

### Ensayo de invasión.

Se cultivaron células AGS al 80% de sub-confluencia en una placa de 6 pozos y se infectaron durante 24 horas con un MOI de 50 con las cepas



de *H. pylori*. Después de 24 horas de infección, se observó en el microscopio de campo claro el fenotipo celular alargado característico de la infección, denominado fenotipo colibrí. A continuación se tripsinizaron las células y se contaron con azul tripano utilizando la cámara de Neubauer.

Al mismo tiempo, el matrigel fue diluido 1:4 para utilizar 50  $\mu\text{L}$  por pozo en los Insertos Transwell (Corning–Costar catalogo 3422). Se dejó polimerizar durante 30 minutos a 37°C. Después de polimerizar, las células se suspendieron en 180  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo sin SFB agregándose a la parte superior del inserto (sobre el matrigel),  $4 \times 10^5$  células AGS por cada condición,  $2 \times 10^5$  de células MDA-MB-231 altamente invasivas que se utilizaron como control positivo y  $2 \times 10^5$  de células MCF-10A como control negativo. En la parte inferior del inserto se colocó 1 mL de medio de cultivo adicionado con 10% de SFB como agente quimioatrayente. Se incubó a 37°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se retiró la parte superior del inserto y las células invasoras que atravesaron al otro lado del transwell se fijaron con PFA al 4% se tiñeron con cristal violeta y después se contaron 10 campos aleatorios en el objetivo 10x.

Las células que atravesaron y se pegaron a la placa, se incubaron y crecieron hasta confluencia. Después se lavaron las células con PBS 1x y se despegaron con tripsina 0.25%/0.53 mM de EDTA, para posteriormente hacer el análisis por PCR de los genes bacterianos.

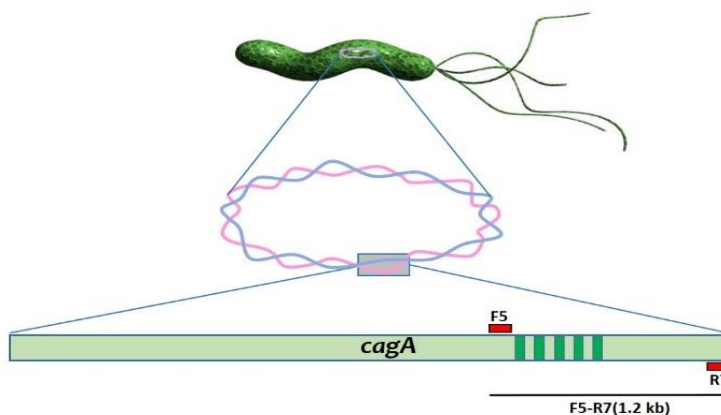
#### Extracción de DNA.

Se extrajo el DNA de las células infectadas de cada ensayo por medio de columnas de sílice siguiendo el protocolo del kit (Favorgen). El DNA purificado se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 de

Thermo Fisher Scientific. La calidad del DNA se comprobó mediante la relación 260/280, y su integridad en un gel de agarosa al 1% y mediante la amplificación del gen endógeno de  $\beta$ -actina.

### PCR punto final.

Para el PCR punto final de los genes *cagA*, *ureC* y  $\beta$ -actina se preparó una mezcla de reacción de volumen final de 50  $\mu$ L, conteniendo 100 ng de DNA, una concentración final de 1  $\mu$ M de cada primer, 2.5 mM de  $MgCl_2$  y 200  $\mu$ M de dNTPs. En la figura 6 se puede observar la posición de los primers para el PCR del gen *cagA*.



**Figura 6. Representación esquemática de la localización de los primers para la amplificación del C terminal de CagA.**

Para cada PCR se utilizaron las siguientes condiciones y primers, previamente estandarizadas por el laboratorio.

**Tabla 2.** Condiciones utilizadas para cada reacción de PCR punto final.

Gen	Condiciones	Secuencia de primers dirección 5' - 3'	Tamaño de amplicon
<i>cagA</i> (C-terminal)	<p>Temperatura de activación: 95°C por 1 minuto.</p> <p>30 ciclos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 95°C por 1 min</li> <li>• 55°C por 1 min</li> <li>• 72°C por 1:30 min</li> </ul> <p>Temperatura de elongación final: 72°C por 10 minutos.</p>	<p>CCCTAGTCGGTAATGGGTTATC</p> <p>TTAAGATTTTTGGAAACCAC</p>	1.2 Kb

<i>ureC</i> ( <i>glmM</i> )	Temperatura de activación: 94°C por 5 minutos. 35 ciclos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 94°C por 1 min</li> <li>• 59°C por 1 min</li> <li>• 72°C por 1 min</li> </ul> Temperatura de elongación final: 72°C por 7 minutos.	GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGG G GCTTACTTTCTAACACTAACGCGC	194 pb
<i>β-actina</i>	Temperatura de activación: 94°C por 5 minutos. 30 ciclos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 94°C por 1 min</li> <li>• 59°C por 1 min</li> <li>• 72°C por 1:45 min</li> </ul> Temperatura de elongación final: 72°C por 10 minutos.	CCTAAGGCCAACCGTGAAAAG TCTTCATGGTGCTAGGAGCCA	670 pb

Posteriormente se corrieron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.2% teñidos con Bromuro de etidio (75 ng para 25 mL), y se utilizó el marcador de peso molecular  $\phi$ 174. Al final de la electroforesis el gel fue revelado con luz UV en el fotodocumentador.

#### Análisis estadístico.

El análisis estadístico entre tres o más variables se determinó mediante la prueba ANOVA, seguida de una prueba Tukey. La diferencia significativa se consideró como de  $p \leq 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

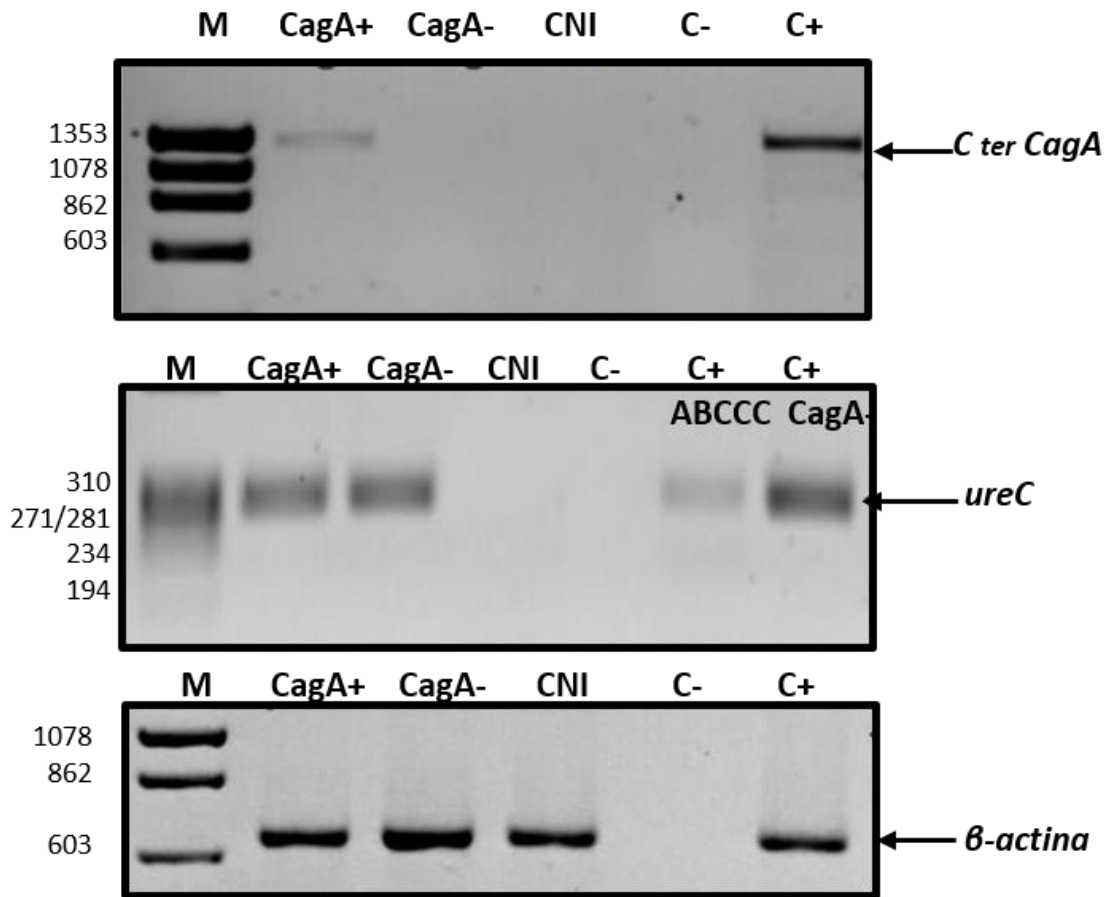
### 6.1 Infección de células AGS y eliminación de *H. pylori*

La infección de las células AGS con *H. pylori* se pudo reproducir de forma exitosa, monitoreando a través del fenotipo colibrí, que es sugerente de la transducción, fosforilación y señalización de CagA en la célula hospedero. Para observar si *H. pylori* transloca DNA codificador de CagA se realizó la infección de células AGS con un MOI 50, el cual se eligió porque al utilizar un MOI más bajo (en la mayoría de los estudios se utiliza un MOI de 100) sería más fácil eliminar la bacteria después de la infección. Se establecieron tres condiciones para el ensayo de infección: células AGS infectadas con la cepa CagA positiva (EPIYA ABCCC), células AGS infectadas con la cepa CagA negativa, y células AGS no infectadas, este último nos sirve como un control de viabilidad de las células.

Después de la infección se extrajo el DNA de las células AGS de cada condición y como primer paso se realizó el PCR punto final del gen endógeno  *$\beta$ -actina*, el cual permite verificar la integridad del DNA extraído del ensayo de infección (Figura 7). Posteriormente, se realizó la búsqueda del gen *cagA* por PCR punto final, utilizando los primers que flanquean la región EPIYA; como control positivo para éste y en todos los ensayos se utilizó DNA bacteriano extraído de la cepa CagA positiva.

Para comprobar que la banda correspondiente a CagA no es debida a DNA contaminante originado por la presencia de bacteria que no se removió del cultivo con los lavados y el tratamiento con gentamicina después de la infección, se realizó la búsqueda por PCR del gen constitutivo *ureC* (glmM) de *H. pylori*, el cual entonces hipotetizamos que nos va a indicar si aún había bacteria remanente. Como control positivo del PCR se usó

DNA extraído directamente del cesped bacteriano de ambas cepas (CagA negativa y CagA positiva).



**Figura 7. Análisis de la transducción del gen *cagA* en células AGS infectadas con *H. pylori*, cepas CagA positivas y negativas.** Se muestra la amplificación por PCR de los genes *cagA* (región variable C-terminal, panel superior), *ureasa C*, (*ureC*, panel de en medio) y  $\beta$ -*actina* (panel inferior) de un ensayo de infección de células AGS con *H. pylori* CagA+ y CagA- (MOI 50) por 24 horas, y un control negativo de células AGS no infectadas (CNI). C- representa el control negativo de la reacción de PCR, en el cual en vez de agregar DNA se agregó agua; por otro lado C+ representa el control positivo, donde se agregó DNA bacteriano de *H. pylori* para observar la amplificación del gen de interés *cagA* o *ureC*, mientras que para el gen  $\beta$ -*actina* se utilizó DNA proveniente de una línea celular CNI =

células no infectadas, M = marcador de peso molecular, C- = control sin DNA, C+ = control con DNA de *H. pylori* o DNA celular en el caso de  $\beta$ -actina.

En la literatura no se encontró algún método en concreto para separar la bacteria adherida a las células hospedero. Por lo tanto como primera técnica además de matar a las bacterias con gentamicina, se implementaron varios lavados exhaustivos con PBS y ázida de sodio al 0.1% para eliminar toda la bacteria después de la infección. Como resultado del análisis por PCR se observó la presencia del gen de *cagA*, pero también se encontró la banda correspondiente al gen constitutivo *ureC*. Éste resultado nos indica que la causa de ambas bandas es probablemente debido a que había bacteria remanente en las células y no debido a la transferencia de DNA codificante de CagA a la célula infectada (Figura 7).

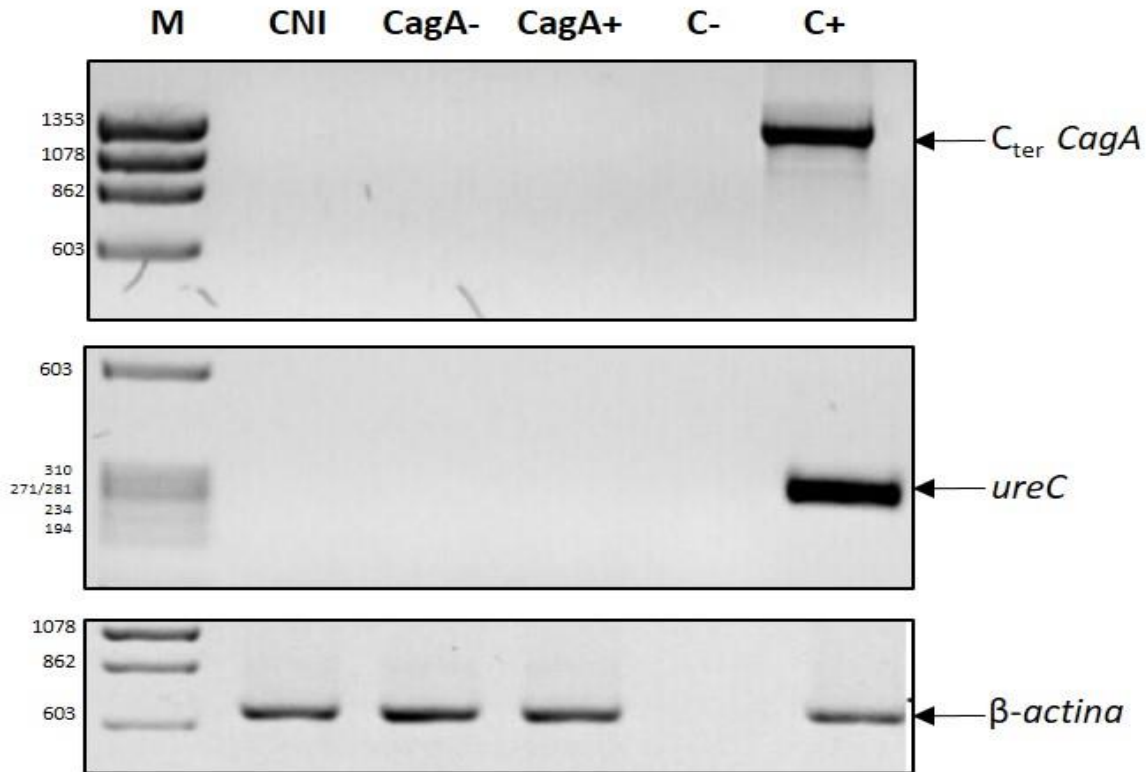
Cabe mencionar que en el PCR del gen *ureC* se observó una banda mucho más intensa en la cepa CagA negativa que en la CagA positiva (Figura 7). No es claro el origen de esta diferencia, pero puede deberse a varias razones, por ejemplo el que ambas cepas de *H. pylori* difieran en número de copias de ese gen. En ensayos subsecuentes se decidió utilizar sólo como control positivo la cepa CagA negativa en todos los siguientes PCRs del gen *ureC*.

## **6.2 Ensayo en suspensión de células MCF-10A infectadas con *H. pylori*.**

Una característica común de los oncogenes virales y los proto-oncogenes celulares es la promoción de la evasión de apoptosis. Nosotros hipotetizamos que si CagA confiere una ventaja de sobrevivida a la célula infectada, esta ventaja sería más útil en condiciones de estrés celular. Las células epiteliales normalmente crecen adheridas a una superficie que en

los tejidos es la membrana basal y en los cultivos *in vitro* es el plástico. El separar a las células de ese soporte desencadena mecanismos de muerte denominado anoikis. En el epitelio gástrico y mamario que son secretores, es así como se forman los ductos de las glándulas, cuando las células del lumen pierden el contacto con la matriz extracelular. En nuestro grupo de trabajo hemos observado que las cepas de *H. pylori* CagA positivas inducen resistencia a anoikis (67). Nosotros nos preguntamos si células crecidas en suspensión en las que se deberían de inducir anoikis, se vería favorecida la transducción de material genético bacteriano que activara mecanismos de resistencia a muerte celular y favoreciera la sobrevivencia de las células no adheridas a substrato. Para este ensayo se utilizó un modelo de células inmortalizadas pero no transformadas de epitelio de mama, las células MCF-10A, ya que las AGS al ser transformadas ya tiene prendidos sus propios mecanismos de resistencia a anoikis y no existen comercialmente células de epitelio gástrico no transformado. En las células MCF-10A ya se había estandarizado y validado en el laboratorio la infección con *H. pylori* (67).

En el PCR de las células resistentes a anoikis no se observó ninguna banda en ninguna de las condiciones que corresponda al gen de *cagA* o *ureC* (Figura 8), esto sugiere que no hubo transferencia de DNA de *H. pylori* a las células que sobrevivieron a la inducción de muerte por falta de pegado a substrato.



**Figura 8. Análisis de la transducción del gen *cagA* en células MCF-10A resistentes a anoikis infectadas con *H. pylori*, cepas CagA positivas y negativas.** Se presenta el gel de la amplificación por PCR de los genes *cagA* (región variable C-terminal), *ureC* y  $\beta$ -actina. Las células MCF-10A se infectaron con *H. pylori* CagA+ y CagA- (MOI 50) por 24 horas, y un control negativo de células no infectadas (CNI). Las tres condiciones se colocaron en suspensión por ocho horas. Las células resistentes a apoptosis se cultivaron hasta proliferar y se extrajo el DNA para el análisis por PCR. CNI = células no infectadas, M = marcador de peso molecular, C- = control sin DNA, C+ = control con DNA de *H. pylori* o DNA celular.

### **6.3 Ensayo de quimiorresistencia de células AGS infectadas con *H. pylori*.**

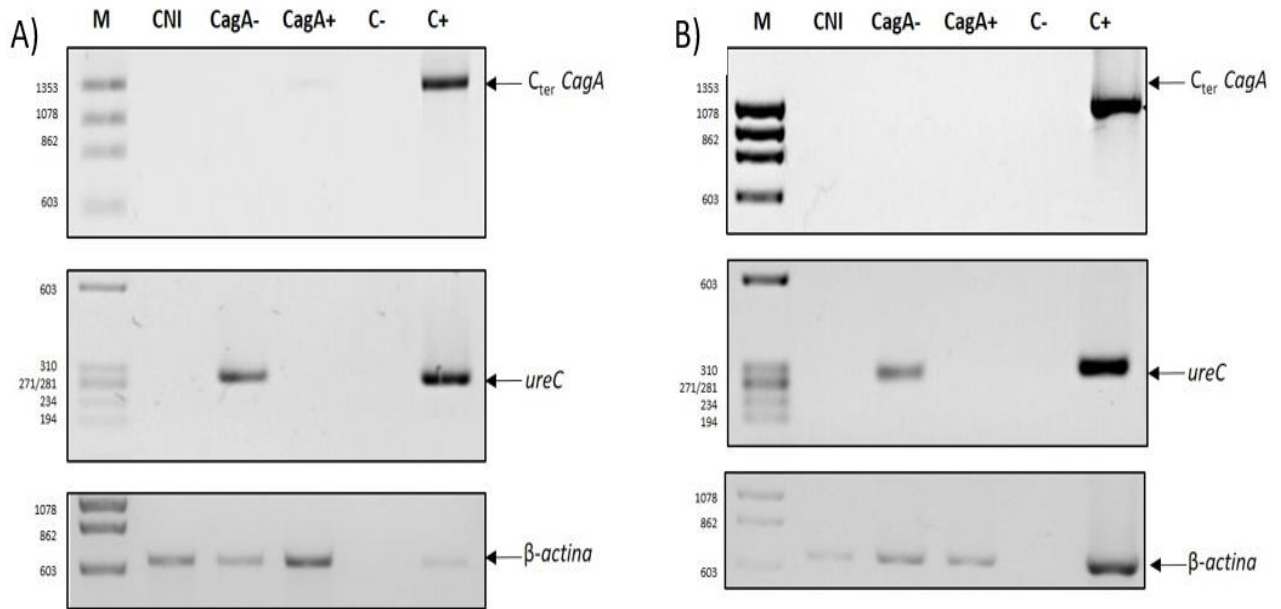
De igual forma se realizó un ensayo de resistencia al fármaco etopósido. El etopósido es utilizado como quimioterapéutico en el tratamiento del cáncer y es un inhibidor de la topoisomerasa II, la cual participa de forma



importante en el ciclo celular (68). Se ha observado que cánceres avanzados tienden a desarrollar resistencia a las quimioterapias, incluida a éste fármaco, y esa quimiorresistencia también es observable en líneas celulares derivadas de tumores agresivos (69).

Es por esto que en el siguiente experimento se evaluó si las células infectadas con *H. pylori* CagA positivas presentan una ventaja de resistencia a etoposido apoyando que esa ventaja es mayor si la bacteria además de transducir proteína es capaz de transducir el gen que codifica a CagA. Para este experimento se mantuvieron las células AGS infectadas con *H. pylori* a diferentes concentraciones de etopósido en el medio (pase cero) y después se les realizó un pase de cultivo (pase uno) y en ambos pases se realizó la búsqueda del gen de *cagA*.

A las células resistentes a etopósido se les extrajo el DNA y se realizó la búsqueda del gen *cagA* y *ureC* por PCR. En el gel de la concentración 16  $\mu$ M de etopósido, se puede apreciar en el pase cero una ligera banda correspondiente a *cagA* en las células infectadas con la cepa CagA positiva, y una banda bien definida en las células infectadas con CagA negativa para el gen de *ureC*, mientras que en el pase uno ya no se observa ninguna banda para CagA pero se mantuvo la correspondiente a *ureC* (Figura 9). Por lo tanto los resultados obtenidos sugieren que no hubo translocación del gen de CagA y la banda de *cagA* observada junto con la de *ureC* se debió a un pequeño remanente de bacteria contaminante en las células infectadas.



**Figura 9. Búsqueda de la transducción del gen *cagA* en células AGS quimiorresistentes a etopósido.** Las células AGS se cultivaron en medio F12 suplementado y con una concentración 16  $\mu$ M de etopósido. Las células fueron previamente infectadas con las cepas *H. pylori* CagA+ y CagA- (MOI 50) por 6 horas, y un control negativo de células no infectadas. Se presenta el gel de la amplificación por PCR de los genes *cagA* (región variable C-terminal), *ureC* y  $\beta$ -actina del pase cero (A) y pase uno (B). CNI = células no infectadas, M = marcador de peso molecular, C- = control sin DNA, C+ = control con DNA de *H. pylori* o DNA celular.

#### 6.4 Ensayo de invasión de células AGS infectadas con *H. pylori*.

Actualmente se sabe que durante el proceso de la Transición Epitelio Mesénquima (TEM), las células epiteliales adquieren propiedades mesenquimales que facilitan la movilidad celular y les induce la capacidad de invadir. Aunque la TEM es un fenómeno fisiológico durante la embriogénesis, se cree que en cáncer es responsable de las metástasis del tumor primario hacia otros órganos. En el laboratorio se ha generado evidencia de que la vía de PI3K/AKT activada por CagA es un inductor de la TEM y como consecuencia de ello las células infectadas se vuelven

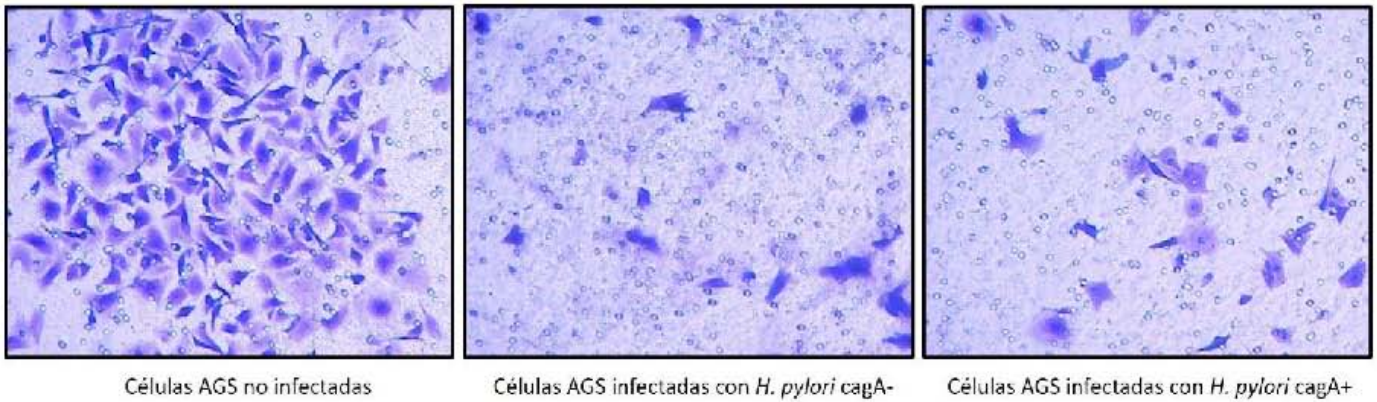
invasivas y quimiorresistentes (67). Nosotros hipotetizamos entonces que células con mayor capacidad invasiva pudieran originarse de la transducción de material genético bacteriano que incluyera al gen de *cagA*. Por lo tanto se realizó un ensayo de invasión con el objetivo de seleccionar las células que podrían tener una ventaja sobre las demás gracias a la infección con *H. pylori* y la transducción de material genético con características de promover procesos que favorecen la invasión como la TEM.

Estudios recientes publicados por Ghoul y Wessler, et al han demostrado que las células AGS tienen una capacidad invasora basal (70), la cual se observa en nuestros resultados en la condición donde las células no están infectadas (Figura 10A). También podemos observar que las células que invadieron en un número significativamente mayor, fueron las infectadas con la cepa CagA positiva en comparación a la cepa CagA negativa (Figura 10A y 10B).

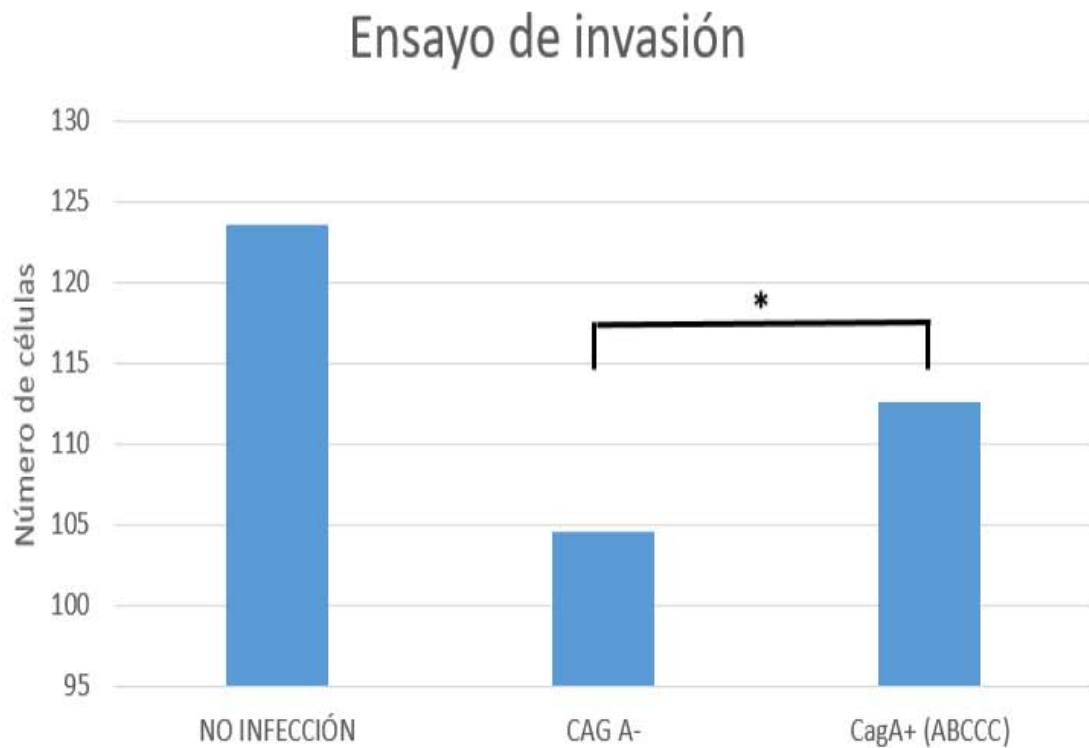
Por otro lado, las células que invadieron y se adhirieron en la placa se dejaron proliferar y se extrajo el DNA para realizar la búsqueda de los genes ya mencionados. En este ensayo se observó una mayor invasión en las células AGS no infectadas, probablemente debido a que estas células presentan una mayor frecuencia de células vivas que las células infectadas por *H. pylori*. Igualmente se observó una mayor invasión en las células infectadas con la cepa CagA positiva que en las infectadas con la cepa negativa. En el resultado de la PCR no se encontró ninguna banda correspondiente al gen de *cagA* o *ureC*, mientras que si se observaron en todas las muestras la banda del gen endógeno (Figura 10C). Dichos resultados sugieren que CagA provee de una mayor capacidad de supervivencia o una mayor capacidad invasora, pero que esto no está

mediado por la translocación de DNA del gen que codifica a *cagA* a la célula hospedero.

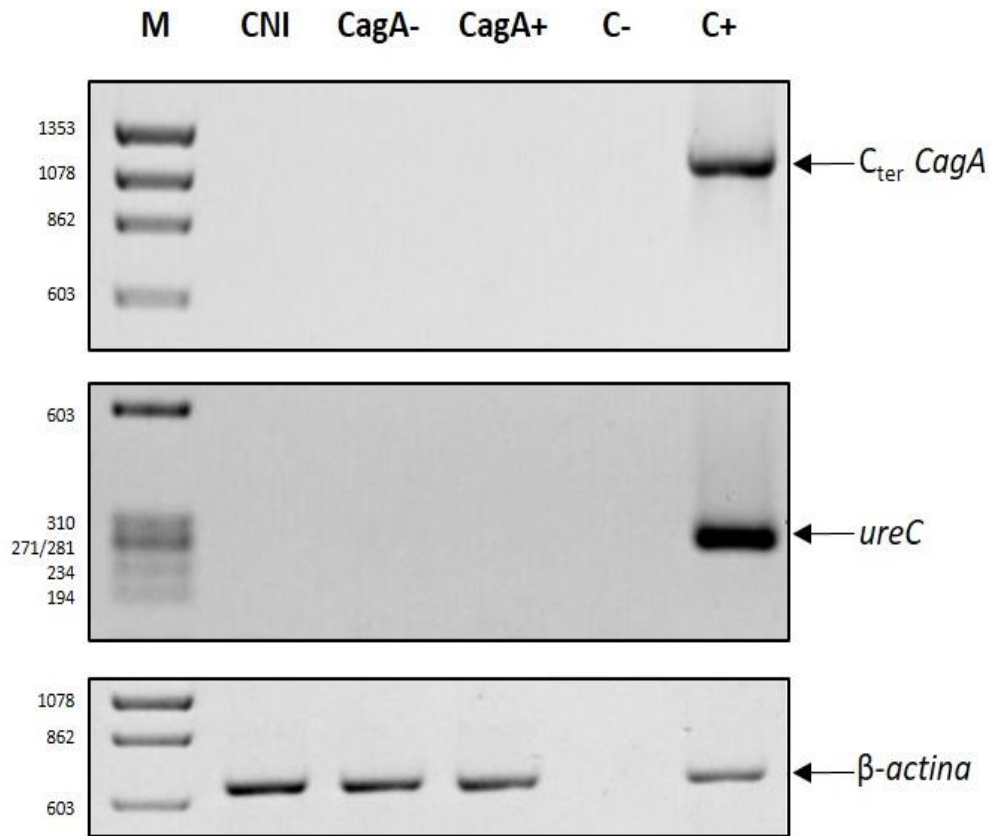
**A)**



**B)**



C)



**Figura 10. Análisis de la capacidad invasora de células AGS infectadas con *H. pylori*, cepas CagA positivas y negativas y búsqueda del gen *cagA*.** Las células utilizadas en el ensayo de invasión fueron previamente infectadas con *H. pylori* CagA+ y CagA- (MOI 50) por 24 horas, y un control negativo de células no infectadas (CNI). A) Se muestra una imagen representativa de las células AGS invasoras que atravesaron al otro lado del transwell con matrigel. B) Gráfica del número de células que invadieron en cada condición. C) Gel del PCR de los genes *cagA* (región variable C-terminal), *ureC* y  $\beta$ -actina. CNI = células no infectadas, M = marcador de peso molecular, C- = control sin DNA, C+ = control con DNA de *H. pylori* o DNA celular.

## 7. DISCUSIÓN

En este trabajo buscamos si *H. pylori* transloca DNA codificante del gen *cagA*. Es importante señalar que el T4SS de *H. pylori* y el T4SS arquetípico de *A. tumefaciens* tienen un alto nivel de homología y el segundo ha servido para modelar funcionalmente al primero, lo que sugiere que *H. pylori* también puede tener la capacidad de translocar DNA en las células que infecta (57).

La transferencia horizontal y la variabilidad genética son eventos importantes para la evolución de los genomas bacterianos, los cuales se pueden dar a través de la ganancia o pérdida génica y reordenamientos genómicos. Estos eventos pueden conferir ventajas para la adquisición de un mayor potencial adaptativo aumentando la patogenicidad del microorganismo (71).

*H. pylori* tiene una amplia variabilidad y diversidad genética y se recombina con frecuencia con otros *H. pylori*. También contiene conjuntos de genes específicos que han sido adquiridos por transferencia horizontal. Uno de ellos es la isla de patogenicidad de *cag* (*cagPAI*), ya mencionada anteriormente, la cual se sabe que se adquirió hace más de 60,000 años, y su presencia en la actualidad sugiere la gran ventaja que la *cagPAI* proporcionó a *H. pylori*, convirtiéndose en su principal factor de virulencia (71).

Por lo tanto, dentro de los factores de virulencia de *H. pylori* el más ligado al cáncer es la *cagPAI*, ya que codifica un T4SS, el cual se ensambla y funciona como una jeringa para trasladar a la oncoproteína *cagA* y peptidoglicano a las células epiteliales.

Dado el alto potencial oncogénico que tiene la oncoproteína *cagA*, su presencia constante en la célula es esencial para dar origen al tumor, lo cual se ha puesto en manifiesto en ratones transgénicos que constitutivamente expresan a esta proteína y que desarrollan carcinomas en el tracto digestivo (25). De acuerdo con esto, CagA activa diferentes vías de señalización confiriendo ventajas a las células infectadas relacionadas con procesos de transformación oncogénica (63,11). Es por ello que si *H. pylori* transloca DNA bacteriano, el gen de *cagA* es el mejor candidato que podría conferir una mayor ventaja en la transformación oncogénica si se expresa de manera persistente, como ocurre con los oncogenes virales o en los animales transgénicos. Como resultado de los primeros experimentos observamos la banda correspondiente al gen *cagA* pero también la de *ureC* lo que nos indica que eliminar a la bacteria totalmente es muy difícil, lo cual es coherente biológicamente ya que *in vivo H. pylori* se adhiere fuertemente para evadir el movimiento peristáltico del estómago y no ser arrastrada por las fuerzas que pasan por el tracto digestivo (72). El gen *ureC* (*glmM*) sirve como indicador de bacteria residual ya que está localizado fuera de la *cagPAI*, lo cual creemos es importante porque el gen de *cagA* pudiera translocarse junto con algún otro(s) gen(es) de la *cagPAI*.

El gen *ureC* codifica para la proteína fosfoglucoSAM mutasa (73) la cual es esencial para la síntesis del peptidoglicano que forma la pared celular en las bacterias gram negativas (74). En nuestros resultados pudimos observar que el amplicón del gen *ureC* en la cepa de *H. pylori* CagA+ es menor que en la cepa CagA-. Esto puede atribuirse a la diversidad numérica y/o de secuencia del gen *ureC* en las distintas cepas de *H. pylori* (75), por ello se utilizó el DNA de la cepa CagA- como control positivo en los PCR.

Ya que en el primer experimento no se observó una translocación de DNA y tomando en cuenta que la capacidad para transferir DNA de bacterias a células eucariotas es un proceso poco frecuente, podrían ser que la transferencia de DNA ocurre en muy pocas células. Por lo tanto decidimos desafiar a las células infectadas con *H. pylori* a diferentes ambientes para forzarlas a utilizar las ventajas que el tener CagA expresado constitutivamente les pudiera proporcionar. La idea es que a través de las ventajas conferidas por CagA pudieramos seleccionar y enriquecer las células en las cuales *H. pylori* pudo haber transferido DNA.

El siguiente experimento que realizamos fue el ensayo de cultivo en suspensión. Ya que las células requieren de contactos con la matriz extracelular, cuando se desprenden de ésta se induce la muerte celular programada llamada Anoikis. La anoikis es un mecanismo que se encarga de inducir la muerte de células que se desprenden del tejido evitando la colonización de órganos distantes (76), Se ha demostrado que células cancerosas pueden resistir anoikis y que ésto se asocia con la transición epitelio mesénquima (MET), un proceso importante durante la metástasis (76). Por esta razón en el ensayo en suspensión se utilizaron células no transformadas MCF-10A las cuales cuando pierden la adherencia a substrato inician mecanismos de muerte (77). Sin embargo, en los resultados del análisis por PCR de las células resistentes a anoikis tampoco se encontró evidencia de la translocación del gen que codifica a CagA.

Estudios de Oliveira y Costa, *et al* han demostrado que *H. pylori* estimula una respuesta invasora gracias al T4SS y CagA. Como siguiente paso se evaluó la capacidad invasora de las células infectadas con *H. pylori*, y en las células que invadieron se realizó la búsqueda del gen *cagA* (78). En el presente estudio mostramos que *H. pylori* CagA+ indujo niveles



significativamente más altos de células invasoras en comparación con *H. pylori* CagA-, lo que indica que CagA tiene un papel importante en la invasión celular, lo cual concuerda con lo reportado anteriormente (78). En cambio si comparamos las células no infectadas que invadieron versus las células infectadas con la cepa CagA+, no hay una diferencia significativa lo cual puede deberse al daño por estrés que le ocurre a las células durante el proceso de infección.

Las células que invadieron se analizaron por PCR y tampoco se encontró evidencia de transferencia específica del DNA que codifica a CagA, lo que sugiere que la respuesta invasora está dada por otras vías de interacción que involucran a CagA pero no la translocación del gen *cagA* a través del T4SS.

Actualmente la resistencia a los quimioterapéuticos sigue siendo un problema clínico para el tratamiento del cáncer. Uno de ellos es el etopósido, el cual es un inhibidor de la topoisomerasa II lo que promueve la formación de complejos de DNA y proteína, induciendo de este modo la apoptosis de células con alto índice proliferativo por daño al DNA.(68,79,80). En este contexto, en este trabajo evaluamos si las células infectadas con *H. pylori* CagA+ y que fueran resistentes a la quimioterapia tienen una mayor probabilidad de estar integrando el gen de *cagA* y no solo proteína. Como resultado del ensayo de quimiorresistencia a concentraciones de etoposido de 8  $\mu$ M y 16  $\mu$ M, sólo encontramos bacteria residual pero no encontramos evidencia de DNA bacteriano que haya sido translocado.

Nuevos estudios interesantes han revelado que si existe una translocación de DNA a las células, sin embargo ellos no averiguan un gen en específico sino que encuentran que *H. pylori* transloca DNA por medio del T4SS y que el DNA translocado activa receptores TLR9. Además el mismo grupo

de trabajo encontró que la activación de los TLR9 modula la respuesta inmune aumentando la respuesta inflamatoria por medio de la IL-17, lo que favorece el proceso de carcinogénesis, sin embargo, también tiene un efecto antiinflamatorio el cual pudiera utilizar *H. pylori* en la fase aguda para favorecer el establecimiento de la infección. (81,82). Cabe mencionar que nuestro grupo de trabajo en un estudio de secuenciación masiva de tumores gástricos no encontró evidencia de la presencia selectiva de DNA bacteriano proveniente de la *cagPAI*, sugiriendo que la translocación de DNA a la célula infectada, de existir, pareciera más un evento azaroso que dirigido a inyectar *cagA* y proveer de ventajas evolutivas a la célula receptora (83).

## **8. CONCLUSIONES**

Nuestros datos en conjunto no apoyan que exista una translocación selectiva del DNA bacteriano que codifica para *cagA* que pudiera conferir ventajas en la célula infectada, y que por lo tanto tuvieran una participación en la transformación del epitelio gástrico.

## 9. PERSPECTIVAS

Por miles de años *H. pylori* ha evolucionado junto con el humano con el único fin de sobrevivir, es por ello que solo del 1 a 3% de la población infectada desarrolla cáncer gástrico, siendo el cáncer gástrico un efecto secundario y no el principal objetivo de *H. pylori*. La carcinogénesis de *H. pylori* depende no sólo de sus factores de virulencia, sino también de la genética del hospedero y factores ambientales.

A pesar de que nuestros resultados no demostraron la translocación de DNA codificante de la proteína CagA a las células gástricas hospedero, estudios posteriores de Varga et al, han demostrado que efectivamente *H. pylori* posee la capacidad para translocar DNA por medio del T4SS, y que éste activa al receptor TLR9 (81,82).

Hasta este momento el T4SS de *H. pylori* es el único capaz de translocar un sustrato proteico (CagA), un sustrato no proteico (peptidoglicano) y DNA. Sin embargo aún hay preguntas por resolver acerca de la patogénesis de *H. pylori* en el cáncer gástrico. Por ejemplo, ¿El DNA introducido a la célula eucarionte es un segmento azaroso o específico del genoma de *H. pylori*?, ¿Podría tener otra función en la célula que favorezca la carcinogénesis, además de activar al receptor TLR9?.

## 10. REFERENCIAS

1. International Agency for Cancer Research. Globocan 2012 <http://globocan.iarc.fr/>
2. Ang TL and Fock KM: Clinical epidemiology of gastric cancer. Singapore Med J 55: 621–628, 2014.
3. Aldaco-Sarvide, F, Pérez-Pérez, P, Cervantes-Sánchez, G T- and Torres, L, Erazo-V A: Mortalidad por cáncer en México 2000-2010: el recuento de los daños., 2012.
4. Pecorino L: Molecular Biology of Cancer Mechanisms, Targets, and Therapeutics University of Greenwich, 3th ed., 2012.
5. Hanahan D, Weinberg RA.: Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 144, 646-74, 2011.
6. Kanwal R, Gupta K and Gupta S: Cancer epigenetics: An introduction. In: Cancer Epigenetics: Risk Assessment, Diagnosis, Treatment, and Prognosis. pp1–25, 2014.
7. Sarid R and Gao S-J: Viruses and human cancer: from detection to causality. Cancer Lett 305: 218–27, 2011.
8. Rous P: A Sarcoma of the Fowl Transmissible By an Agent Separable From the Tumor Cells. J Exp Med 13: 397–411, 1911.
9. Epstein M.A., Achong B.G., Barr Y.M: Virus particles in cultured lymphoblasts from burkitt’s lymphoma. Lancet. 1:702–703, 1964.
10. Howley PM. Gordon Wilson Lecture: Infectious Disease Causes of Cancer: Opportunities for Prevention and Treatment. Transactions of the American Clinical and Climatological Association; 126:117-132, 2015.
11. Pagano JS, Blaser M, Buendia MA, Damania B, Khalili K, Raab-Traub N and Roizman B: Infectious agents and cancer: Criteria for a causal relation. Semin Cancer Biol 14: 453–471, 2004.
12. Parkin DM: The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. Int J Cancer 118: 3030–3044, 2006.
13. Mesri EA, Feitelson MA and Munger K: Human viral oncogenesis: A cancer hallmarks analysis. Cell Host Microbe 15: 266–282, 2014.

14. IARC Working Group: A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 10: 321–322, 2009.
15. Morales-Sánchez A and Fuentes-Pañanán EM: Human viruses and cancer. *Viruses* 6: 4047–4079, 2014.
16. Nillner HH, Wolf H and Minarovits J: Viral hit and run-oncogenesis: Genetic and epigenetic scenarios. *Cancer Lett* 305: 200–217, 2011.
17. Ishaq S and Nunn L: *Helicobacter pylori* and gastric cancer: A state of the art review. *Gastroenterol Hepatol from Bed to Bench* 8: S6–S14, 2015.
18. Hausen H Zur: The search for infectious causes of human cancers: Where and why (Nobel Lecture). *Angew Chemie - Int Ed* 48: 5798–5808, 2009.
19. Porta C, Riboldi E and Sica A: Mechanisms linking pathogens-associated inflammation and cancer. *Cancer Lett* 305: 250–262, 2011.
20. Ringelhan M, Heikenwalder M, Protzer U.: Direct Effects of Hepatitis B Virus-Encoded Proteins and Chronic Infection in Liver Cancer Development. *Dig Dis* 31:138-151, 2013.
21. Ringelhan, M., O'Connor, T., Protzer, U. and Heikenwalder, M.: The direct and indirect roles of HBV in liver cancer: prospective markers for HCC screening and potential therapeutic targets. *J. Pathol.*, 235: 355–367, 2015.
22. American Cancer Society: Stomach cancer. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2016.
23. Sokic-Milutinovic A, Alempijevic T and Milosavljevic T: Role of *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis: Current knowledge and future directions. *World J Gastroenterol* 21: 11654–11672, 2015.
24. Laurén P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 64:31-49, 1965. [Department of Pathological Anatomy, University of Turku. Finland]
25. Correa P and Piazuelo MB: The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis* 13: 2–9, 2012.,
26. Correa P: A Human Model of Gastric Carcinogenesis1. *CANCER Res* 48: 3554–3560, 1988.

27. de Martel C, Forman D and Plummer M: Gastric Cancer. Epidemiology and Risk Factors. *Gastroenterol Clin North Am* 42: 219–240, 2013.
28. Cho J, Kang M-S and Kim K-M: Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma and Specific Features of the Accompanying Immune Response. *J Gastric Cancer* 16: 1–7, 2016.
29. Shinozaki-Ushiku A, Kunita A and Fukayama M: Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (review). *Int J Oncol* 46: 1421–1434, 2015.
30. Fukayama M: Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Pathol Int* 60: 337–350, 2010.
31. Wang TC, Fox JG and Giraud AS: The biology of gastric cancers., 2009. Chapter 1 Overview and Pathology of Gastric Cancer  
Pelayo Correa, M. Constanza Camargo, and M. Blanca Piazuelo
32. Serrano A, Candelaria-Hernández M, De la Garza J and Herrera L: *Helicobacter pylori* y Cáncer Gástrico. *Cancerología* 4: 193–204, 2009.
33. Marshall BJ and Warren JR: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 323: 1311–1315, 1984.
34. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, *et al.*: *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 345: 784–9, 2001.
35. Mbulaiteye SM, Hisada M and El-Omar EM: *Helicobacter Pylori* associated global gastric cancer burden. *Front Biosci* 14: 1490–1504, 2009.
36. Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, Sitas F.: Association between infection of *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* 302:1302, 1991.
37. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ.: *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 325:1132, 1991.
38. Camorlinga-Ponce M, Flores-Luna L, Lazcano-Ponce E, *et al.*: Age and severity of mucosal lesions influence the performance of serologic markers in *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal pathologies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 2498–2504, 2008.

39. IARC: Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. Iarc Monogr Eval Carcinog Risks To Humans 61: 121–162, 1994.
40. Hirayama F, Takagi S, Iwao E, Yokoyama Y, Haga K, Hanada S: Development of poorly differentiated adenocarcinoma and carcinoid due to long-term *Helicobacter pylori* colonization in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol* 34:450, 1999.
41. Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S and Nakao M: *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 115: 642–648, 1998.
42. Sugiyama T: Development of gastric cancer associated with *Helicobacter pylori* infection. In: *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. vol. 54, 2004.
43. Uemura N, Mukai T, Okamoto S, et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on subsequent development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6:639-642, 1997.
44. Handa O, Naito Y and Yoshikawa T: Redox biology and gastric carcinogenesis: the role of *Helicobacter pylori*. *Redox Rep* 16: 1–7, 2011.
45. Kao C-Y, Sheu B-S and Wu J-J: *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J* 39: 14–23, 2016.
46. Sycuro LK, Wyckoff TJ, Biboy J, Born P, Pincus Z, Vollmer W and Salama NR: Multiple peptidoglycan modification networks modulate *Helicobacter pylori*'s cell shape, motility, and colonization potential. *PLoS Pathog* 8, 2012.
47. Backert S, Clyne M and Tegtmeyer N: Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. *Cell Commun Signal* 9: 28, 2011.
48. Hatakeyama M and Brzozowski T: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 11 Suppl 1: 14–20, 2006.
49. Wang TC, Fox JG and Giraud AS: *The biology of gastric cancers.*, 2009.

Chapter 16 The Role of *Helicobacter pylori* Virulence Factors in Rodent and Primate Models of Disease Dawn

50. Yamasaki E, Wada A, Kumatori A, *et al.*: *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation. *J Biol Chem* 281: 11250–11259, 2006.
51. Censini S, Lange C, Xiang Z, *et al.*: *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14648–53, 1996.
52. Olbermann P, Josenhans C, Moodley Y, *et al.*: A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *PLoS Genetics* 6, 2010.
53. Backert S, Tegtmeyer N and Fischer W: Composition, structure and function of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island encoded type IV secretion system. *Futur Microbiol* 10: 955–965, 2015.
54. Alvarez-Martinez CE and Christie PJ: Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 775–808, 2009.
55. Tegtmeyer N, Wessler S and Backert S: Role of the *cag*-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *FEBS J* 278: 1190–1202, 2011.
56. Tohidpour A: CagA-mediated pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Microb Pathog* 93: 44–55, 2016.
57. Backert S and Selbach M: Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol* 10: 1573–1581, 2008.
58. Shaffer CL, Gaddy JA, Loh JT, *et al.*: *Helicobacter pylori* exploits a unique repertoire of type iv secretion system components for pilus assembly at the bacteria-host cell interface. *PLoS Pathog* 7, 2011.
59. Haley KP, Blanz EJ, Gaddy JA: High Resolution Electron Microscopy of the *Helicobacter pylori* Cag Type IV Secretion System Pili Produced in Varying Conditions of Iron Availability. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. (93):52122, 2014.



60. Jiménez-Soto LF, Haas R: The CagA toxin of *Helicobacter pylori*: abundant production but relatively low amount translocated. *Scientific Reports*. 6:23227, 2016.
61. Ishikawa S, Ohta T and Hatakeyama M: Stability of *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein in human gastric epithelial cells. *FEBS Lett* 583: 2414–2418, 2009.
62. A.T. Franco, E. Johnston, U. Krishna, Y. Yamaoka, D.A. Israel, T.A. Nagy, L.E. Wroblewski, M.B. Piazuelo, P. Correa, R.M. Peek Jr. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors *Cancer Res.*, 68 (2008), pp. 379–387
63. Tan P and Yeoh K-G: Genetics and Molecular Pathogenesis of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterology* 149: 1153–1162.e3, 2015.
64. Yong X, Tang B, Li B-S, *et al.*: *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes tumorigenesis of gastric cancer via multiple signaling pathways. *Cell Commun Signal* 13: 30, 2015.
65. Lessl M and Lanka E: Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. *Cell* 77: 321–324, 1994.
66. Fernández-González E, de Paz HD, Alperi A, *et al.*: Transfer of R388 derivatives by a pathogenesis-associated type IV secretion system into both bacteria and human cells. *J Bacteriol* 193: 6257–6265, 2011.
67. Gabriela Vallejo-Flores, Javier Torres, Claudia Sandoval-Montes, *et al.*: *Helicobacter pylori* CagA Suppresses Apoptosis through Activation of AKT in a Nontransformed Epithelial Cell Model of Glandular Acini Formation, *BioMed Research International*, vol. 2015, 2015.
68. Hande KR: Etoposide: Four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* 34: 1514–1521, 1998.
69. Schneider E, Horton JK, Yang CH, Nakagawa M and Cowan KH: Multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF7 cell line selected for etoposide resistance. *Cancer Res* 54: 152–8, 1994.

70. Al-Ghoul L, Wessler S, Hundertmark T, et al.: Analysis of the type IV secretion system-dependent cell motility of *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 860–866, 2004.
71. Olbermann P, Josenhans C, Moodley Y, Uhr M, Stamer C, et al. Correction: A Global Overview of the Genetic and Functional Diversity in the *Helicobacter pylori* cag Pathogenicity Island. *PLOS Genetics* 10(1), 2014.
72. Testerman TL, McGee DJ, Mobley HLT: Adherence and Colonization, Chapter 34. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001.
73. De Reuse H, Labigne A and Mengin-Lecreux D: The *Helicobacter pylori* ureC gene codes for a phosphoglucosamine mutase. *J Bacteriol* 179: 3488–3493, 1997.
74. Espinoza MGC, Vazquez RG, Mendez IM, Vargas CR and Cerezo SG: Detection of the glmM gene in *Helicobacter pylori* isolates with a novel primer by PCR. *J Clin Microbiol* 49: 1650–1652, 2011.
75. Helaly GF, El-Afandy NM, Hassan AA, Dowidar NL, Sharaf SM: Diagnostic Value of Housekeeping [glmM] Gene Expression in Antral Biopsies in Comparison to Rapid Urease Test and Histological Detection of *Helicobacter Pylori* Infection. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*. 18(4):119 -30, 2009.
76. Paoli P, Giannoni E and Chiarugi P: Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *BBA - Mol Cell Res* 1833: 3481–3498, 2013.
77. Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK, et al.: Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol* 5: 733–740, 2003.
78. Oliveira MJ, Costa AC, Costa AM, et al.: *Helicobacter pylori* Induces Gastric Epithelial Cell Invasion in a c-Met and Type IV Secretion System-dependent Manner. *J Biol Chem* 281: 34888–34896, 2006.
79. Baldwin EL and Osheroff N: Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5: 363–372, 2005.

80. Yoo SH, Yoon YG, Lee JS, *et al.*: Etoposide induces a mixed type of programmed cell death and overcomes the resistance conferred by Bcl-2 in Hep3B hepatoma cells. *Int J Oncol* 41: 1443–1454, 2012.
81. Varga MG, Shaffer CL, Sierra JC, *et al.*: Pathogenic *Helicobacter pylori* strains translocate DNA and activate TLR9 via the cancer-associated cag type IV secretion system. *Oncogene*: 1–8, 2016.
82. Varga MG., Peek RM.: DNA Transfer and Toll-like Receptor Modulation by *Helicobacter pylori*. In: Tegtmeyer N., Backert S. (eds) *Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter pylori*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 400. Springer, Cham, 2017.
83. Fuentes-Pananá EM, Larios-Serrato V, Méndez-Tenorio A, Morales-Sánchez A, Arias CF, & Torres J.: Assessment of Epstein-Barr virus nucleic acids in gastric but not in breast cancer by next-generation sequencing of pooled Mexican samples. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(3), 200-208, 2016.