



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Determinación de los perfiles de expresión génica en patologías gástricas asociadas a *Helicobacter pylori*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

Q.F.B. Stephanie Euridice Morales Guerrero

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Yolanda López Vidal
Facultad de Medicina, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Dr. Alejandro García Carrancá
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MÉXICO, D. F.

Enero, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y ser mi segundo hogar durante más de diez años. Por darme las herramientas para desarrollarme académicamente y poder crecer como ser humano.

A la Dra. Yolanda López Vidal por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por la confianza brindada durante estos años de trabajo. Gracias por el apoyo y la asesoría.

Al Dr. Gonzalo Castillo Rojas, por ser una parte fundamental en el desarrollo de este proyecto, por su constante asesoría académica, gracias por su apoyo.

Al comité tutor, Dr. Miguel Ángel Cevallos y al Dr. Alejandro García Carrancá por el tiempo dedicado a este proyecto y por sus valiosas aportaciones.

A los miembros del jurado, Dr. Alfonso Dueñas González, Dra. Vilma Maldonado Lagunas, Dra. Claudia Rangel Escareño, Dra. Margarita Camorlinga, Dra. Marcela Lizano Soberón. por las observaciones y correcciones realizadas, que permitieron enriquecer el presente escrito.

A cDra. Angela Schwarz por su invaluable apoyo en el análisis de los microarreglos, gracias por el tiempo brindado para enseñarme a usar mis primeras herramientas de análisis.

El presente trabajo fue realizado en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina de la UNAM, con el financiamiento de CONACyT CB2007-01-78787M, SALUD2009-C01-112588 e ICyTDF/150/2012. Al CONACyT con la beca otorgada dentro del programa de Becas Nacionales durante el periodo del 31 de enero de 2011 al 30 de enero del 2013 (número de becario: 392735).

DEDICATORIAS

A mis padres Carlos y Avelina. Gracias por todo el apoyo, por siempre confiar en mi y alentarme a seguir adelante. Sin ustedes no sería nada. ¡¡Gracias!!

A mis hermanos Amílcar y Betzabé, por siempre cuidar a la pequeña de la casa, por nunca fallarme.

A mi familia completa, los tíos Orlando, Alfonso, Alfredo, Lucía, Alicia, Eduardo (donde quiera que estes); a los primos el Ale, Fer, Valeria, y la mi cuñada Carolina. Cada uno de ustedes ha aportado a mi crecimiento personal, no seremos perfectos pero mejor familia no podría pedir, gracias.

A Sergio, con quién comparto este logro. Las palabras no alcanzan para agradecer todo lo que has hecho por mi, gracias por no dejar de creer en mi y ayudarme a cada día ser mejor, sin importar los momentos difíciles que se presentan.

A los amigos Myrna, Lalo, Alice, Caro, Memo, Gabo, Rafita, Lucoca, Pao, Deneb, Estibi. Por su amistad a pesar de convertirme en una persona escurridiza que hace apariciones esporádicas. ¡Los quiero!

A mis trillizas adoradas, Gaby y Lalo. Gracias por todos los momentos compartidos, por las experiencias, su apoyo a sido fundamental en mi crecimiento académico y personal.

A la gente bonita del PIMM, especialmente a Mary, Paty, doctora Maritoña, Karen, Viri, Sebas, Kathia, Ivette. Sin ustedes el laboratorio no sería un lugar al que considero mi otro hogar, gracias por los buenos ratos y por todo lo aprendido de ustedes. También a los que ya no están pero que en su momento hicieron del laboratorio un lugar mejor.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Agradecimientos	I
Dedicatorias	II
Índice general	III
Índice de figuras	V
Índice de tablas	VI
Abreviaturas	VII
Resumen	XI
1. Introducción	1
1.1 Epidemiología del cáncer de estómago	2
1.1.1 Epidemiología a nivel mundial	2
1.1.2 Epidemiología en México	3
1.2 Factores de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico	4
1.2.1 <i>Helicobacter pylori</i>	4
1.2.1.1 Epidemiología de la infección	4
1.2.1.2 Asociación con el desarrollo de cáncer gástrico	6
1.2.1.3 Factores de virulencia de <i>H. pylori</i> asociados con el desarrollo de cáncer gástrico	6
Proteína asociada a la citotoxina (CagA)	7
Citotoxina vacuolizante (VacA)	12
1.2.2 Factores del hospedero	17
1.2.3 Alimentación	18
1.3 Aspectos clínicos del cáncer gástrico	19
1.4 Clasificación histológica del cáncer gástrico	20
1.4.1 Modelo de progresión del cáncer gástrico de tipo intestinal	20
1.4.1.1 Gastritis crónica	21
1.4.1.2 Metaplasia intestinal	23
1.5 Análisis de expresión génica aplicada a cáncer gástrico y sus etapas precursoras	26

2. Justificación	29
3. Hipótesis	30
4. Objetivo	31
4.1 Objetivos particulares	31
5. Metodología	32
5.1 Obtención de biopsias gástricas	33
5.2 Extracción de RNA	34
5.3 Ensayos de microarreglos	35
5.4 Análisis de microarreglos	36
5.5 Síntesis de cDNA a partir del RNA extraído de biopsias gástricas	38
5.6 Detección de <i>H. pylori</i> mediante PCR semi-anidado del gen <i>16S RNAr</i>	39
5.7 Confirmación de la presencia de <i>H. pylori</i> mediante hibridación	40
6. Resultados	42
6.1 Obtención de biopsias gástricas y extracción de RNA	42
6.2 Análisis de microarreglos	43
6.3 Detección de <i>H. pylori</i> mediante PCR semianidado del gen <i>16S RNAr</i> e hibridación	53
7. Discusión	54
8. Conclusiones	64
9. Perspectivas	65
10. Referencias	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Incidencia mundial de cáncer gástrico, estandarizada por edad, en hombres reportada en 2008 3
Figura 2	Consecuencias de la señalización dependiente de CagA en células epiteliales 12
Figura 3	Estructura y diversidad alélica de VacA 15
Figura 4	Alteraciones provocadas por VacA 17
Figura 5	Modelo de progresión a cáncer gástrico 21
Figura 6	Expresión de las sondas de marcaje e hibridación en las muestras del grupo control, gastritis crónica y metaplasia intestinal; expresadas en log2 44
Figura 7	Análisis de componentes principales para las muestras del grupo control, gastritis crónica y metaplasia intestinal 45
Figura 8	Gráfica de volcán que representa los genes sobre-expresados y sub-expresados para el grupo de gastritis crónica 47
Figura 9	Gráfica de volcán que representa los genes sobre-expresados y sub-expresados para el grupo de metaplasia intestinal 50
Figura 10	Detección de <i>H. pylori</i> en las muestras analizadas por microarreglos. 53

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Principales tipos de cáncer y tasa de mortalidad en 2012	1
Tabla 2 Mortalidad por tumores malignos según tipo y género	4
Tabla 3 Proteínas que interactúan con CagA fosforilada	9
Tabla 4 Proteínas que interactúan con CagA sin fosforilar	10
Tabla 5 Efectos de VacA adicionales a la vacuolización	13
Tabla 6 Secuencia de los iniciadores y sonda utilizados para la amplificación del gen <i>16S RNAr</i>	39
Tabla 7 Características de la población de estudio	42
Tabla 8 Concentración, pureza e integridad del RNA obtenido de las biopsias gástricas del grupo control, gastritis crónica y metaplasia intestinal	43
Tabla 9 Genes sobre-expresados y sub-expresados en gastritis crónica . .	46
Tabla 10 Asociación funcional de los genes expresados diferencialmente en gastritis crónica	48
Tabla 11 Genes sobre-expresados y sub-expresados en metaplasia intestinal	50
Tabla 12 Asociación funcional de los genes expresados diferencialmente en metaplasia intestinal	52

ABREVIATURAS

α -pix	Rac/Cdc42 Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) 6
Abl	C-Abl Oncogen 1, tirosina cinasa tipo no receptor
AINES	Antiinflamatorio No Esteroideo
AMICA1	Adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1
ANOVA	Análisis de Varianza
APC	Adenomatous polyposis coli
APO	Apolipoproteína
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
AZGP1	alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding
Bcl-2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
c-Met	Met proto-oncogen
c-myc	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
c-Src	v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog
<i>cag</i> -PAI	Isla de Patogenicidad <i>cag</i>
CagA	Proteína asociada a la citotoxina
CD	Cluster de Diferenciación
CDH	Cadherina
Cdx	Caudal type homeobox
CEACAM	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule
CNTFR	Ciliary neurotrophic factor receptor
CoCl ₂	Cloruro de Cobalto
COX2	Ciclooxigenasa 2
Crk	v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog
CSK	c-src tirosina cinasa
CTSK	Catepsina K
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
DDC	Dopa decarboxilasa
ddUTP	2',3'-Dideoxiuridina-5'-Trifosfato
DEF.	Defunciones
DGIS	Dirección General de Información en Salud
dH ₂ O	Agua desionizada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario
dNTP's	Deoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
dUTP	Deoxiuridina Trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENTPD1	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1

ERBB4	v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4
Erk	Cinasas reguladas por señales extracelulares
F2R	Factor de coagulación 2
FABP4	Proteína de unión a ácidos grasos 4
FAK	Cinasa de adhesión focal
FC	Fold Change (Cambio en la expresión)
g	Gramos
GHRL	Ghrelin
GNAZ	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide
GPER	Receptor de estrógeno acoplado a proteína G1
Grb	Growth factor receptor-bound protein
GSK3b	Glucógeno sintasa cinasa 3 beta
HCl	Ácido clorhídrico
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HIST1H4A	Cluster 1 de histona, H4a
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IARC	Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer
IC	Intervalo de Confianza
IGF1R	Receptor de factor de crecimiento parecido a insulina 1
IL	Interleucina
IL1RN	Antagonista del receptor de interleucina 1
ITGB4	Integrina beta 4
JAM	Molécula de adhesión de unión
kb	Kilobases
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodaltones
LDLR	Receptor de lipoproteína de baja densidad
log2	Logaritmo base 2
LRP1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
LTF	Lactotransferrina
M	Molar
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MIP- α	Proteína inflamatoria de monocitos 1 α
mJ/cm ²	Milijoules/centímetro cuadrado
MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPP7	Membrane Protein, Palmitoylated 7 (MAGUK P55 Subfamily Member 7)
MST1	Proteína estimulante de macrófagos 1

MT	Metalotioneína
MUC	Mucina
MYOF	Mioferlina
NaCl	Cloruro de sodio
NF-kB	Factor de transcripción nuclear kappa B
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
ng	Nanogramos
NOD	Receptores con dominios de oligomerización para unión a nucleótidos
°C	Grados centígrados
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds ratio (Razón de momios)
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa 1
pb	Pares de bases
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PLAUR	Activador de plasminógeno, receptor de urocinasa
PLC-γ	Fosfolipsa C- gamma
PLTP	Proteína de transferencia de fosfolípidos
PMN	Polimorfonucleares
pmol	Picomoles
pPCR	Producto de PCR
PRDM1	PR Domain Containing 1, With ZNF Domain
RACK1	Receptor for Activated C Kinase 1
RASGRP1	RAS Guanyl Releasing Protein 1 (Calcium And DAG-Regulated)
RIN	Número de integridad del RNA
RMA	Robust Multiarray Average
RNA	Ácido ribonucleico
cRNA	RNA complementario
RNS	Especies reactivas de Nitrógeno
ROS	Especies reactivas de Oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RUNX	Factor de transcripción relacionado con Runt
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de Sodio
SERPIN	Serpina
SFK	Familia de cinasas Src
SH2	Src Homology 2
SHP-2	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 11
SLC	Familia de acarreadores de solutos
SNAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SORL1	Sortilin-related receptor, L

SOS	Son of Sevenless
SRE	Elemento de respuesta al suero
SRF	Factor de respuesta al suero
SSC	Solución salina de citratos
SST4	Sistema de secreción tipo 4
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TA	Temperatura ambiente
TACO	Tryptophan-aspartate containing coat protein
TAK1	Transforming growth factor β activated kinase-1
TFF	Factor trefoil
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
THBS1	Trombospondina 1
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Linfocitos T reguladores
TRIM	Tripartite motif-containing protein
U	Unidades
VacA	Citotoxina Vacuolizante
VCAM	Proteína de adhesión celular vascular
Yes	V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog
ZO-1	Zonula Occludens 1

RESUMEN

El cáncer gástrico se encuentra dentro de los tipos de cáncer más comunes, con una alta tasa de mortalidad a nivel mundial, debido al diagnóstico tardío de este. Si bien es una enfermedad multifactorial, el principal factor de riesgo para el desarrollo de esta entidad es la infección con *Helicobacter pylori*, una bacteria gramnegativa que coloniza casi a la mitad de la población mundial.

Se sabe que la variante de cáncer gástrico denominada de tipo intestinal progresa en una serie de eventos que inician con una gastritis crónica y que progresan hacia el desarrollo de una gastritis crónica atrófica que lleva a una metaplasia intestinal, último evento antes del desarrollo de lesiones malignas. A nivel de cambios en la expresión génica en estas etapas previas al cáncer gástrico la información con la que se cuenta es limitada, por lo que entender estas diferencias es importante para elucidar los mecanismos biológicos alterados en la progresión a cáncer gástrico, así como, su posible aplicación como biomarcadores.

En el presente trabajo se utilizaron microarreglos de cobertura completa del genoma para evaluar los cambios en la expresión génica de muestras de gastritis crónica y metaplasia intestinal, respecto a un grupo control, con la finalidad de obtener perfiles de expresión característicos para cada entidad clínica.

Los resultados mostraron que existen perfiles de expresión característicos para la gastritis crónica y la metaplasia intestinal. El primero se encontró asociado a una deficiencia en moléculas protectoras a daño por especies reactivas de Oxígeno, mientras que el perfil correspondiente a metaplasia intestinal se caracterizó por la presencia de moléculas asociadas a un epitelio intestinal. Estos perfiles podrían explicar las alteraciones que se observan histológicamente y que favorecerían la progresión a cáncer gástrico, además, proveen información acerca de posibles moléculas con aplicaciones como biomarcadores para cada entidad.

1

INTRODUCCIÓN

El término cáncer se refiere a un grupo de enfermedades que afectan a cualquier parte del cuerpo, que se caracterizan por una rápida multiplicación de células anormales, con la capacidad de invadir partes adyacentes del cuerpo y propagarse a otros órganos en un proceso conocido como metástasis [1].

El cáncer es un problema de salud importante, ya que es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Se le atribuyen 8.2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2012 [1], siendo los principales tipos de cáncer los que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales tipos de cáncer y tasa de mortalidad en el 2012.

Tipo de cáncer	Mortalidad
Pulmonar	1.59 millones
Hepático	745,000
Gástrico	723,000
Colorrectal	694,000
Mamario	521,000
De esófago	400,000

Tomado de la Nota descriptiva de cáncer de la OMS [1].

Es importante señalar que más del 70% de las defunciones por cáncer se registraron en países en vías de desarrollo y se anticipa que el número de defunciones siga en aumento en el mundo y supere los 22 millones para el año 2030 [1].

1.1 Epidemiología del cáncer de estómago o cáncer gástrico

1.1.1 Epidemiología a nivel mundial.

La incidencia de cáncer gástrico aumenta con la edad, alcanzando su pico máximo entre los 60-80 años [2]. De acuerdo a los datos de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) en el 2012, se presentaron cerca de un millón de casos nuevos de cáncer gástrico (952,000 casos; representando el 6.8% de los casos totales de cáncer), lo que lo ubicó como uno de los tipo de cáncer que se presenta con mayor frecuencia [3].

La tasa de incidencia estandarizada por edad, muestra que el cáncer gástrico se presenta con mayor frecuencia en hombres que en mujeres, con la relación de 2 a 4 hombres por cada mujer afectada. El cáncer gástrico puede presentarse en la región proximal o distal del estómago. El cáncer en la región distal del estómago predomina en países en vías de desarrollo, en personas Afroamericanas y de bajo nivel socioeconómico, mientras que los casos de cáncer proximal se presentan comúnmente en países desarrollados, en caucásicos y personas con un alto nivel socioeconómico [2].

Cabe señalar que la incidencia de cáncer gástrico muestra una variación geográfica, como se muestra en la Figura 1. Más del 70% de los casos de cáncer gástrico (677,000) se presentan en países en vías de desarrollo (456,000 en hombres, 221,000 en mujeres) [3]. La mayor tasa de incidencia esta localizada en los países del este de Asia (en donde ocurren cerca de la mitad de los casos totales), del este de Europa, así como en algunos países de América Central y Sudamérica, mientras que se observa una baja incidencia en América del Norte, Europa Occidental, así como, en el Sur de Asia y África [4].

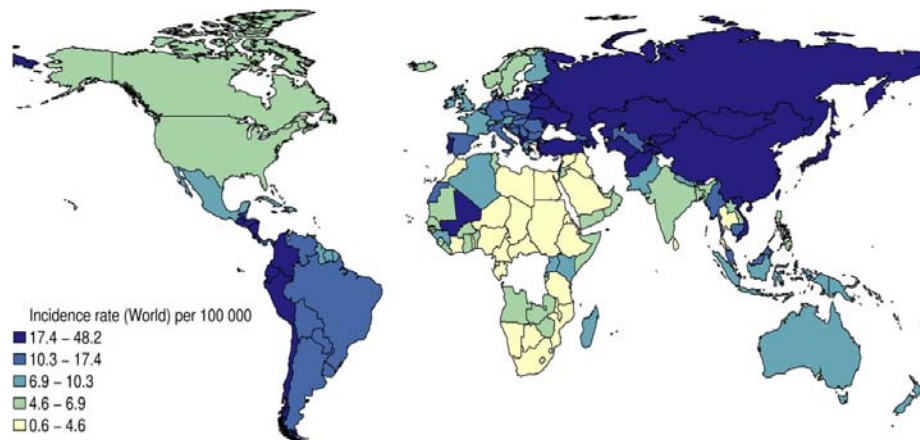


Figura 1. Incidencia mundial de cáncer gástrico, estandarizada por edad (Age-standardized), en hombres reportada en el 2008. La incidencia se muestra como casos por 100,000 habitantes. Fuente: de Martel, 2013 [5].

Además de la alta frecuencia con que se presenta, el cáncer gástrico representa la tercera causa de muerte, con 723,000 defunciones lo cual representa el 8.8% del total de muertes por cáncer en el 2012 [3].

Estudios de migración han mostrado que inmigrantes de primera generación de un país con alta incidencia a un país de baja incidencia presentan el riesgo de desarrollar cáncer gástrico de su país de origen, pero este riesgo disminuye en la siguiente generación [6], lo cual sugiere que los factores ambientales en etapas tempranas de la vida podrían tener un papel importante en el desarrollo de cáncer gástrico [5].

1.1.2 Epidemiología en México.

En nuestro país las estadísticas proporcionadas por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SNAVE) [7], mostraron en su último reporte del 2010 que el cáncer gástrico presentó una tasa de mortalidad de 5.2 muertes/100 mil habitantes (Tabla 2), con 5,599 defunciones. Si bien se observa que existen diferencias en la mortalidad entre hombres y mujeres, las tasas de mortalidad total

indican que el cáncer gástrico es la tercera causa de muerte debida a neoplasias en nuestro país.

Tabla 2. Mortalidad por tumores malignos según tipo y sexo. Fuente: Dirección General de Información en Salud (DGIS).

TUMORES MALIGNOS	TOTAL		HOMBRES		MUJERES	
	DEF.	TASA*	DEF.	TASA*	DEF.	TASA*
Tráquea, bronquios y pulmon	6,795	6.3	4,413	8.3	2,381	4.3
Estómago	5,599	5.2	3,003	5.6	2,596	4.7
Próstata	5,508	5.1	5,508	10.3	-	-
Hígado	5,393	5.0	2,593	4.9	2,800	5.1
Mama	5,094	4.7	32	0.1	5,062	9.2
Cervicouterino	3,959	3.7	-	-	3,959	7.2
Leucemia	3,953	3.6	2,106	4.0	1,847	3.3

Base de datos 1979-2010. Secretaria de Salud. *Tasa por 100,000 habitantes.

1.2 Factores de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico

1.2.1 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*).

El cáncer es una enfermedad multifactorial y para el caso del cáncer gástrico, diferentes factores de riesgo están asociados con su desarrollo [5] aunque cabe señalar que este es claramente asociado con un agente infeccioso. En 1994 la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer clasificó como un carcinógeno tipo I a *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), por su asociación con el desarrollo de adenocarcinoma gástrico y linfoma tipo MALT (linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa) [8] y ratificado en 2009, por un el segundo grupo de estudio de la IARC [9].

1.2.1.1 Epidemiología de la infección. *H. pylori* es una bacteria gramnegativa, microaerófila, en forma de espiral que coloniza la mucosa gástrica humana. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cerca del 50%

de la población mundial se ha expuesto a *H. pylori* [10], aunque se observan diferencias en la seroprevalencia entre los países desarrollados y en vías de desarrollo.

Estudios de seroepidemiología muestran que la seroprevalencia en los países en vías de desarrollo se caracteriza por una rápida tasa de adquisición de la infección durante la infancia, donde a la edad de 5 años más del 20% de los niños presentan anticuerpos contra *H. pylori*, alcanzando el pico de infección en la adolescencia y para los 20 años, el 80% de la población es seropositiva [11, 12]. En contraste, en los países desarrollados la prevalencia de la infección es baja en niños menores de 10 años, esta se adquiere generalmente en la infancia tardía y adolescencia, alcanzando el pico máximo de infección en la edad adulta, en donde entre los 30 y 40 años llega aproximadamente al 40% [13]. La prevalencia en la población adulta se ha estimado de 62% en China y en América Central, 82% en Europa Oriental, 71% en Japón, y en Estados Unidos varía del 26% al 53% [4]. Cabe señalar que la prevalencia varía entre las diferentes subpoblaciones, siendo mayor en ciertas poblaciones étnicas, como asiáticos o africanos y en poblaciones con bajo nivel socioeconómico [13].

En la gran mayoría de los casos, una vez establecida la infección en la mucosa gástrica ésta se conserva de por vida; aunque existen reportes de casos de la eliminación espontánea de la infección [13].

En México, existen 2 estudios seroepidemiológicos de la infección con *H. pylori*. Torres y cols, determinaron que a la edad de un año, el 20% de los infantes presentaron anticuerpos específicos contra *H. pylori* y observó un aumento importante en la seroconversión, ya que para la edad de 10 años, el 50% de los niños mostraban anticuerpos contra *H. pylori*, mientras que a la edad de 25 años, más del 80% de los sujetos presentaron anticuerpos contra la bacteria. Por otro lado, Camargo y cols, en el estudio de seroprevalencia realizado en 2004, encontraron una correlación con lo reportado previamente por Torres y cols [14, 15], con lo que se concluye que la infección por *H. pylori* se adquiere a edad

temprana y tiene una alta prevalencia en nuestro país.

Es importante señalar que la seroprevalencia de la infección por *H. pylori* va en disminución en los países desarrollados, debido a que los factores que favorecen la diseminación de la infección, tales como el bajo nivel socioeconómico, condiciones sanitarias deficientes, hacinamiento y la presencia de familiares infectados, se observan a la baja [16].

1.2.1.2 Asociación con el desarrollo de cáncer gástrico. De acuerdo al reporte del grupo colaborativo en cáncer y *Helicobacter pylori*, en el cual se analizaron 12 estudios prospectivos [17], correspondientes a 762 casos de cáncer gástrico de tipo no cardia y 200,250 sujetos controles, se concluyó que la razón de momios (odds ratio; OR) fue de 2.97 (95% IC 2.34–3.77) para la infección con *H. pylori*, mientras que, para el caso de cáncer gástrico de cardia, donde se analizaron 274 casos de cáncer y 827 controles el OR fue de 0.99 (95% IC 0.40–1.77). Estos estudios fueron de gran importancia para que *H. pylori* se clasificara como un carcinógeno definitivo en humanos [8].

Aunque la asociación entre la infección y el desarrollo de cáncer gástrico es clara, el mecanismo exacto por el cual la infección desencadena el desarrollo del cáncer gástrico aún no se comprende en su totalidad. Incluso se estima que la mayoría de los sujetos infectados (80-85%) cursarán la infección asintomática y sin desarrollar alguna entidad clínica mas allá de una gastritis superficial. Únicamente del 1 al 3% de los infectados progresarán a cáncer gástrico, con el porcentaje restante de infectados en riesgo de desarrollar úlcera péptica [18]. Esta observación motivó el estudio de los diferentes factores de virulencia de *H. pylori* y de los mecanismos que favorecen el desarrollo de lesiones malignas.

1.2.1.3 Factores de virulencia de *H. pylori* asociados con el desarrollo de cáncer. Dentro de los factores de virulencia de *H. pylori* más estudiados y relacionados fuertemente a la inducción de cáncer gástrico en sujetos infectados, se encuentran la Isla de Patogenicidad *cag* (*cag*-PAI), la proteína asociada a la Citotoxina (CagA) y la Citotoxina Vacuolizante (VacA).

La proteína asociada a la citotoxina (CagA). Es uno de los factores de virulencia más estudiados y asociado al desarrollo de cáncer gástrico. CagA es una proteína de 120-145 kDa, codificada por el gen *cagA*, localizado en el extremo terminal de la Isla de Patogenicidad *cag* (*cag*-PAI), un segmento cromosomal que se sugiere fue adquirido por transferencia horizontal [19].

cag-PAI tiene un tamaño aproximado de 40 kb y contiene alrededor de 31 genes, que en su mayoría presentan homología con genes del sistema de secreción tipo IV (SST4) de *Agrobacterium tumefaciens* [20]. Este sistema de secreción le permite a *H. pylori* translocar tanto a CagA, como a otros componentes bacterianos dentro de las células epiteliales [20]. *H. pylori* puede o no tener esta isla en su genoma, sin embargo, la infección con cepas que poseen este segmento cromosomal se asocia a un mayor grado de inflamación en la mucosa gástrica, así como, a la atrofia gástrica más grave, procesos celulares considerados importantes en el desarrollo de cáncer gástrico [19, 21, 22]. *cag*-PAI está presente en aproximadamente el 70% de las cepas a nivel mundial, aunque se observan variaciones geográficas entre las cepas de *H. pylori* de Oriente y Occidente [23].

La translocación de CagA a las células epiteliales esta mediada por CagL (que también se encuentra codificada en el SST4) y su unión a las integrinas $\alpha_5\beta_1$ del hospedero. Esta unión permite la traslocación de la proteína CagA hacia el interior de las células epiteliales [24], una vez dentro de la célula, CagA tiene la capacidad de interactuar con múltiples proteínas del hospedero en dos formas diferentes, dependiente o independiente de fosforilación [25].

a) Eventos dependientes de fosforilación.

CagA es fosforilada por diferentes cinasas de la familia Src (SFK), entre las que se encuentran c-Src, Fyn, Lyn y Yes, además de la cinasa Abl [19]. CagA es fosforilada en su secuencia de aminoácidos Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (denominada motivo EPIYA), que se localiza en el extremo carboxilo terminal de la proteína [26]. Existen cuatro variantes de motivos EPIYA (A, B, C y D), determinados por la

secuencia de aminoácidos que flanquean el motivo. Los motivos EPIYA A y B se encuentran en todas las cepas del mundo, mientras que el motivo EPIYA-C se puede encontrar con varias repeticiones (1-3) y es un motivo que se encuentra en las cepas de *H. pylori* denominadas occidentales. Las cepas del este de Asia por su parte, muestran la ausencia del motivo EPIYA-C y tienen el motivo denominado EPIYA-D, exclusivo de estas cepas [26]. Los motivos EPIYA-C y EPIYA-D tienen una mayor capacidad de fosforilación a diferencia de los motivos A y B y un aumento en el número de repeticiones de EPIYA-C confiere un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico [27].

Una vez fosforilada, CagA se reporta que interactúa con diferentes proteínas que contienen el motivo SH2 (Src Homology 2), como se ejemplifica en la Tabla 3. Esta interacción tiene como consecuencia una adhesión aberrante de las células epiteliales y un rearrreglo en el citoesqueleto que produce el “fenotipo de colibrí” (hummingbird phenotype) [28], caracterizado por una elongación en las células y un aumento en la motilidad celular.

CagA fosforilada activa a la tirosina-fosfatasa SHP-2 [29], la cual inhibe a la cinasa de adhesión focal (FAK), enzima responsable de modular la adhesión y migración celular, a través de la desfosforilación de sus sitios activos; con una consecuente disminución en las interacciones célula-célula y el aumento en la migración celular [30]. Por otra parte, SHP-2 activada a través de CagA estimula la señalización celular vía Erk [31], tanto dependiente como independiente de Ras [32], que promueve una proliferación celular descontrolada [19, 33].

CagA fosforilada interactúa también con la cinasa Src C-terminal (CSK) estimulando su actividad de cinasa, que a su vez inhibe a SFK, lo que tiene como consecuencia la desfosforilación de otras proteínas como la vinculina [34], ezrina [35] y cortactina [36], produciendo alteraciones en el citoesqueleto. Además CagA fosforilada se une a las proteínas adaptadoras Crk (Crk-I, Crk-II y Crk-L) [37], que produce una dispersión celular, disrupción del complejo E-cadherina/ β -catenina, y la activación de Raf.

Si bien diversos estudios de proteómica han reportado la interacción de CagA fosforilada con otras proteínas, como se muestra en la Tabla 3, su papel a nivel biológico aún queda por elucidarse.

Tabla 3. Proteínas que interactúan con CagA fosforilada.

Proteína	Función propuesta	Evidencia experimental
Abl	Fosforilación de CagA y CrkII	Ensayos de infección, transfección con CagA
CrkI, CrkII, CrkL	Dispersión celular, pérdida uniones apicales, señalización por MAPK	Ensayos de infección, transfección con CagA
Csk	Inactivación de Src, pérdida de interacción Shp2-CagA	Transfección con CagA
	Desfosforilación de cortactina	Proteómica
Grb2	Dispersión celular, señalización por MAPK	Proteómica
Grb7	ND	Proteómica
		Ensayos de infección
PI3K	ND	Proteómica
		Ensayos de infección
Ras-GAP	ND	Proteómica
Shp1	ND	Proteómica
		Ensayos de infección
Shp2	Dispersión celular, activación de ERK, defosforilación de FAK	Transfección de CagA
Src	Fosforilación de CagA	Ensayos de infección

ND: No determinada. Referencia: Modificado de Backert, 2010 [25].

b) Eventos independientes de fosforilación.

CagA sin fosforilar también tiene la capacidad de interactuar con proteínas dentro de la célula epitelial (Tabla 4), que en conjunto inducen la activación de señales proinflamatorias y mitogénicas, así como, la disrupción de las uniones célula-célula y la pérdida de la polaridad celular.

Tabla 4. Proteínas que interactúan con CagA sin fosforilar.

Proteína	Función propuesta	Evidencia experimental
α -Pix	ND	Ensayos de infección
Integrina β_1	ND	Ensayos de infección
CagA	Multimerización	Transfección de CagA
c-Met	Dispersión celular, activación de PI3K, Erk, β -catenina y NF- κ B	Ensayos de infección, transfección de CagA
E-cadherina	Destabilización of uniones apicales, señalización por β -catenina	Transfección de CagA
p120 catenina	Formación del complejo E-cadherina / c-Met / p120, dispersión celular, invasión	Ensayos de infección
Grb2	Dispersión celular, activación de señalización por Ras-MAPK	Transfección de CagA
Par1b / MARK2	Inhibición de la actividad de Par1, disrupción de las uniones apicales	Transfección de CagA, infección
Par1b	Inhibición de la mitosis	Transfección de CagA
Par1a, Par1c, Par1d	Aumento de la elongación celular	Transfección de CagA
Par1b	Inhibición de Par1	Estructura 3D
PLC- γ	Dispersión celular	Ensayos de infección
TAK1	Activación de NF- κ B	Ensayos de infección, transfección de CagA
ZO-1 JAM	Disrupción de las uniones laterales y aumento en la motilidad celular	Ensayos de infección, transfección de CagA

Referencia: Modificado de Backert, 2010 [25].

CagA se asocia con las proteínas ZO-1 (zonulla occludens 1) y JAM (junctional adhesion molecule) [38], lo que provoca la disrupción en las uniones estrechas de las células epiteliales. CagA se une a Par1b/MARK2 (partitioning-defective 1/microtubule affinity-regulating kinase), para inhibir su actividad de cinasa, y por lo tanto, aumenta la pérdida de las uniones estrechas [39, 40].

En otros estudios, se ha reportado que CagA al interactuar con E-cadherina perturba la formación del complejo E-cadherina/ β -catenina [41], que tiene como consecuencia la liberación de la β -catenina del complejo, por lo que se acumula en el citoplasma con su subsecuente translocación al núcleo, en donde aumenta la expresión de genes implicados en la transformación oncogénica [42]. Dentro de los genes regulados por β -catenina se encuentra CDX1 que codifica a un factor de transcripción específico de intestino (Cdx1) [41], involucrado en la regulación de la transcripción de genes relacionados con la diferenciación intestinal, lo cual indicaría que CagA es capaz de promover la transformación de las células gástricas a células intestinales en la etapa de la metaplasia intestinal, evento clave en la progresión a cáncer gástrico.

Además, CagA se une a Grb-2 (growth factor receptor-bound protein 2) para activar la cascada de señalización Ras/Erk vía SOS (son of sevenless) [43] lo que provoca el aumento en la proliferación celular y en la motilidad celular. Por otro lado, CagA aumenta la actividad de los factores de transcripción SRF (Serum Response Factor) y SRE (Serum Response Element) [44], así como, la producción de IL-8 a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B, que tendría como consecuencia la creación de un microambiente proinflamatorio en la mucosa gástrica que favorecería el desarrollo de lesiones malignas. CagA es capaz también de interactuar con el Receptor del Factor de Crecimiento de hepatocitos c-Met (GFH), que estimula el crecimiento celular, migración y la invasión [45].

La versatilidad de interacciones que presenta CagA (esquematizadas en la Figura 2) con diversas proteínas del hospedero, resalta su capacidad oncogénica y su importancia en el desarrollo de cáncer gástrico.

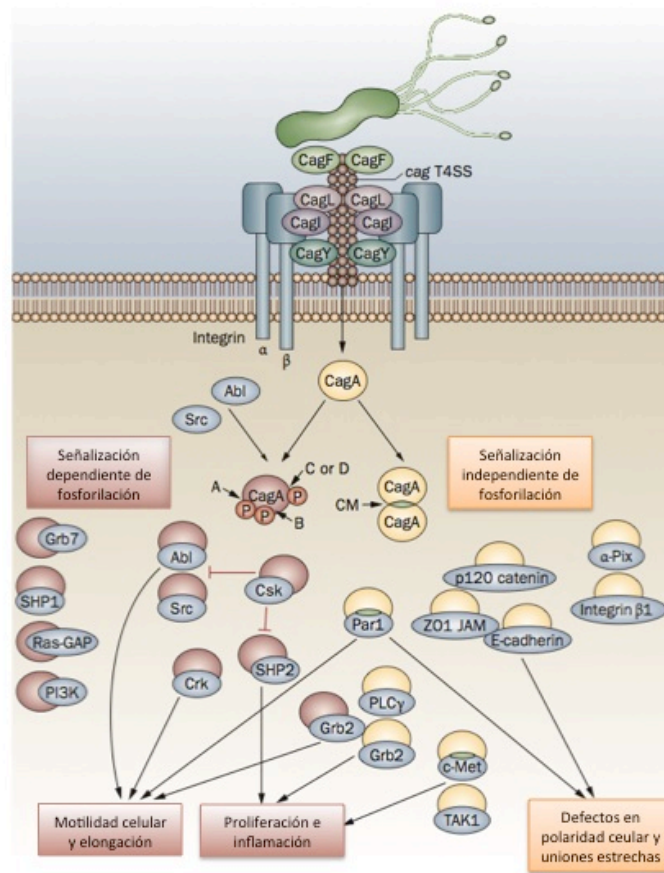


Figura 2. Consecuencias de la señalización dependiente de CagA en las células epiteliales. Modificado de Yamaoka, 2010 [46].

La Citotoxina vacuolizante (VacA). Otro factor de virulencia ampliamente estudiado en *H. pylori* es la proteína VacA, codificada por el gen *vacA*. Esta proteína ejerce diversos efectos en las células epiteliales [47], como son la formación de vacuolas (su actividad más importante y mejor estudiada), la inducción de apoptosis y la supresión de la respuesta de linfocitos T, aunque otras actividades han sido asociadas a esta proteína (Tabla 5).

Tabla 5. Efectos de VacA adicionales a la vacuolización.

Efecto	Dependiente de formación de poros
Secreción de Pepsinógeno por células epiteliales	ND
Inhibición selectiva de la presentación de antígeno dependiente de Ii	ND
Inducción de liberación de citocromo c de mitocondria y apoptosis	Si
Permeasa de urea	Si
Interacción con RACK1	No
Aumento de la secreción alcalina en células gástricas	Si
Inducción de migración de mastocitos y producción de citocinas proinflamatorias	ND
Inhibición de la activación de linfocitos T y B	Si
Interrupción de la maduración del fagosoma al reclutar a la proteína TACO	ND
Activación de la señalización p38/ATF2	No
Interacción con fibronectina	No
Aumento en la generación de trombina en la mucosa gástrica	ND
Aumento de la sobrevivencia intracelular de <i>H. pylori</i> en células epiteliales	ND
Aumento de la producción de Prostaglandina E2 por la inducción de COX2	No
Inhibición de GSK3b a través de la señalización PI3K/Akt	No
Inducción de autofagia	Si
Perturbación del reciclamiento de transferrina a través de la localización incorrecta del receptor de transferrina	ND
Disminución en la expresión de STAT3 y Bcl-2	No
Inducción de necrosis	Si

ND. No determinado. Modificado de Boquet, 2012 [48].

Si bien la mayoría de las cepas de *H. pylori* expresan el gen *vacA*, la actividad de la proteína se ve alterada por las variaciones que presenta principalmente en tres regiones, denominadas secuencia señal (s), región intermedia (i) y región media (m) [49, 50]. Dentro de la secuencia señal se han identificado las variantes s1 y s2, en la región intermedia, las variantes i1, i2 e i3, mientras que, en la región media se encuentran las variantes m1 y m2 [49]. Un mayor grado de virulencia y un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico se ha asociado a cepas de *H. pylori* que poseen las variantes s1/m1 [51, 52], ya que causan una inflamación crónica más grave en comparación con otros genotipos de VacA. Por otra parte, la región intermedia presenta 3 variantes, de las cuales, la región i1 se asocia con una mayor patogenicidad de las cepas y se propone como un indicador del desarrollo de lesiones malignas (Figura 3) [50, 53].

VacA es expresada como una protoxina de 140 kDa, que consiste en una secuencia señal, un dominio pasajero (passenger domain) y un dominio de autotransportador [54]. Estos dominios son procesados y escindidos de la proteína madura, que tiene un tamaño de 88 kDa [55], que es secretada como proteína soluble al espacio extracelular [56], donde puede oligomerizarse [55, 57], o mantenerse localizada en la superficie de la bacteria [58]. La proteína madura a su vez puede sufrir un corte proteolítico, de donde se obtienen los fragmentos denominados p33 y p55 (Figura 3) [59]. Si bien no se tiene totalmente elucidado el papel de cada uno de los fragmentos, diversos estudios sugiere que el fragmento p33 contiene una secuencia hidrofóbica que tiene actividad de formación de poros, mientras que el p55 contiene dominios que le permiten unirse a las células epiteliales [60, 61].

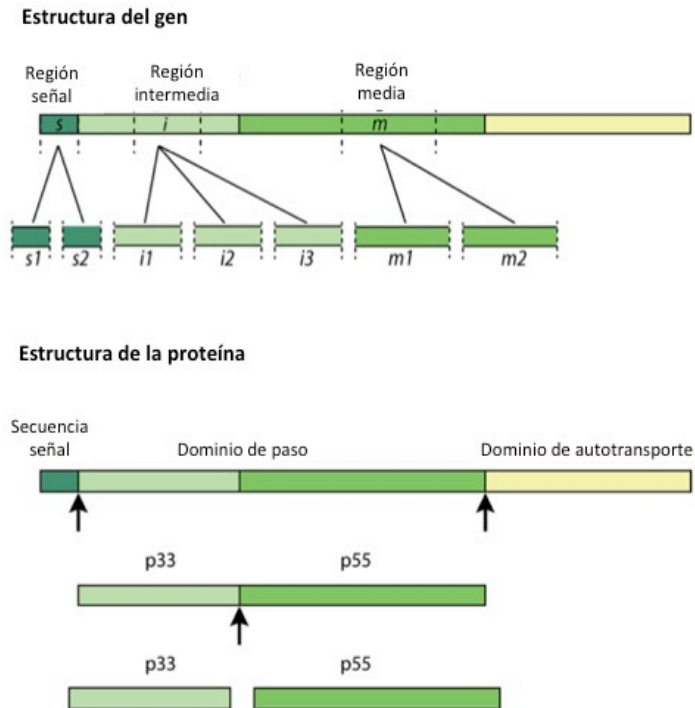


Figura 3. Estructura y diversidad alélica de VacA. Modificado de Palframan, 2012 [54].

La principal actividad biológica que presenta VacA es la inducción de vacuolas en las células epiteliales [62], sin embargo, VacA tiene la capacidad de oligomerizarse en la membrana celular y formar canales iónicos [63] que podrían permitir el paso de nutrientes hacia el exterior de la célula favoreciendo el crecimiento de la bacteria [23]. Además, puede reducir la resistencia eléctrica transepitelial de las células al aumentar la permeabilidad celular, lo que permitiría la liberación de cationes y aminoácidos o azúcares, favoreciendo la captación de nutrientes por la bacteria [64]. Si bien la consecuencia fisiológica de estos efectos durante la infección de *H. pylori* no son bien comprendidos, es posible que la formación de vacuolas y de canales iónicos alteren el tráfico de moléculas en las células que tendrían consecuencias a nivel de las funciones celulares [54].

El mecanismo a través del cual VacA es transportada al citosol y posteriormente a la mitocondria no es completamente claro, aunque se sabe que la proteína se transloca a este organelo [65], en donde puede producir diferentes alteraciones, como son la reducción del potencial de membrana y la liberación de citocromo *c*, relacionados con la alteración en la permeabilidad de la mitocondria [66]. Además, es capaz de inducir modificaciones en la mitocondria que tienen como consecuencia la reducción en la concentración de ATP y alteración en ciclo celular [67]. Además VacA induce el aumento del nivel de la proteína Bax, y la escisión de PARP (poly ADP-ribose polymerase) para activar a la caspasa 3 [54].

A nivel de sistema inmune, VacA se une a la integrina $\beta 2$ [25] y de esta manera interfiere con la señalización dependiente de IL-2, inhibiendo al Factor de Transcripción Nuclear de Células T activadas (NFAT) [5]. Por otro lado, al interactuar con un receptor aun no reconocido, VacA activa de manera aberrante a MKK3/6, p38 y Rac-Specific Nucleotide Exchange Factor (Vav), que estimula la polimerización de fibras de actina y que altera la arquitectura celular, estos dos procesos descritos tienen como consecuencia la interferencia en la presentación de antígenos, un mecanismo que se plantea favorece la persistencia de la infección [6]. Además, esta toxina se ha observado que promueve cambios en el citoesqueleto de las células epiteliales, suprime su proliferación y migración, procesos que en conjunto alteran la morfología del epitelio gástrico (Figura 4) [26].

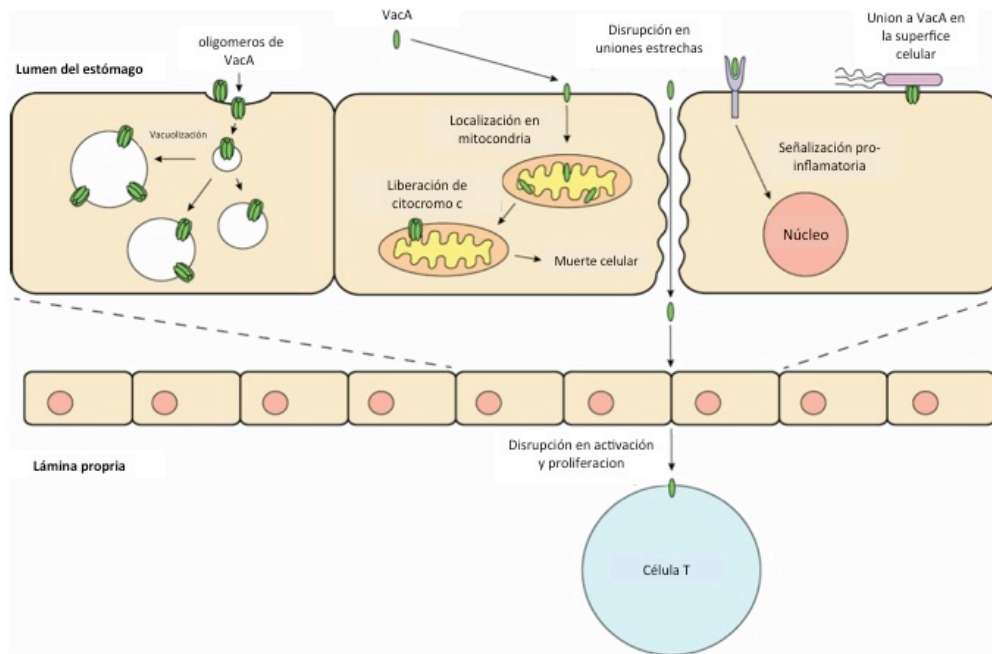


Figura 4. Alteraciones provocadas por VacA. Modificado de 2012, Palframan [54].

1.2.2 Factores del hospedero.

La respuesta inmune a la infección con *H. pylori* juega un papel importante en el desarrollo de cáncer gástrico, se ha encontrado que las células Treg que expresan $CD4^+CD25^{high}$ se asocian con un mayor grado de colonización por parte de la bacteria [68, 69], cambios asociados a inflamación y la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-10, IL-17, and TGF- β [70].

La existencia de los polimorfismos en factores moduladores de la respuesta inflamatoria a la infección podrían jugar un papel importante en el desarrollo de cáncer gástrico. Los polimorfismos reportados se encuentran relacionados con citocinas como TNF- α , IL-10, IL-8, IFN- γ [71, 72], relacionados con receptores de reconocimiento de patógenos con TLR-4, NOD-1 y NOD-2 [73, 74]. De manera importante, polimorfismos tanto en el gen de la IL-1 β (*IL1B*), como en el antagonista de su receptor (IL-1RN), incrementan el riesgo de desarrollar cáncer

gástrico hasta cuatro veces [75]. Estos últimos polimorfismos destacan de manera interesante, ya que se sabe que la IL-1 β es un inhibidor de la secreción de ácido en células parietales [76], además de favorecer una respuesta de tipo Th1 incapaz de eliminar la infección y por lo tanto, con la consecuencia de mantener un ambiente inflamatorio en el estómago.

Además de los polimorfismos en genes involucrados en la respuesta inmune, se han encontrados polimorfismo en genes que codifican para proteasas [77], enzimas de metabolismo de xenobióticos [78], reguladores de ciclo celular [79], mucinas [80] y del HLA [81] que podrían estar involucrados en el desarrollo de cáncer gástrico.

1.2.3 Alimentación.

La alimentación se ha mostrado como un factor importante en el desarrollo de cáncer, ya que el consumo de alimentos con alto contenido de sal, ahumados, mal preservados o que contienen nitratos, nitritos y aminos secundarios, aumentan el riesgo de cáncer cuando se ingieren de manera prolongada, debido a la producción de compuestos N-nitrosos relacionados con el desarrollo de atrofia gástrica. Por otro lado, dietas ricas en frutas y vegetales frescos se asocian a una disminución en el riesgo de desarrollar cáncer debido a sus propiedades antioxidantes [5, 82].

Como resultado de estas investigaciones, se sugiere que la capacidad de virulencia de *H. pylori* es capaz de activar una serie de eventos que promueven la progresión secuencial desde un epitelio gástrico normal hacia cáncer gástrico [18, 83, 84]. Aunque es importante señalar que la progresión a cáncer gástrico ocurre cuando además de la infección con la bacteria, existe un ambiente permisible al desarrollo de la enfermedad, así como, una susceptibilidad genética de parte del hospedero [85]. Por lo tanto, la inducción del cáncer gástrico se propone ocurre debido tanto a factores de la bacteria, componentes de la respuesta inmune del hospedero (polimorfismos en receptores de interleucinas), factores ambientales (como el consumo de sal, alteraciones en la respuesta hormonal y en la secreción

de ácido), que en conjunto alteran vías de señalización celular en el hospedero, alteran señales apoptóticas y de proliferación celular que llevan finalmente al desarrollo de neoplasia [86, 87].

1.3 Aspectos clínicos del cáncer gástrico

El cáncer gástrico con frecuencia no produce síntomas o son de carácter inespecífico. Aproximadamente 50% de los pacientes presentan síntomas de dispepsia en etapas tempranas o superficiales del cáncer gástrico y que pueden ser tratadas de manera quirúrgica. Cabe señalar que únicamente del 1 al 2% de los sujetos a los que se les realiza una endoscopia por síntomas de dispepsia son diagnosticados con cáncer, lo que se traduce en una demora en el diagnóstico de la enfermedad, por lo que aproximadamente 80% de los casos se detectan en etapas avanzadas, cuando ya existe metástasis y la efectividad de la resección quirúrgica es baja, lo que correlaciona con la alta mortalidad de la enfermedad, ya que la tasa de supervivencia a 5 años en los pacientes varía entre un 10 y 30% [88].

Hasta el momento, la endoscopia se considera el procedimiento más sensible y específico de realizar el diagnóstico de cáncer gástrico, ya que permite la visualización de las lesiones y la toma de biopsias para realizar el análisis y diagnóstico histológico [88]. Sin embargo, el uso de esta técnica como una herramienta de tamizaje en población asintomática, solo se utiliza en países como China y Japón, en donde la incidencia de cáncer gástrico es alta, y en el caso de países con una incidencia baja, solo se recomienda en sujetos con alto riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico (P. ej. historia familiar de cáncer gástrico) [88]. Lo que plantea la alternativa de desarrollar una prueba de tamizaje para la detección y diagnóstico temprano de cáncer gástrico, que no sea invasiva y que tenga un bajo costo para el monitoreo de la población general y que permita el monitoreo de la enfermedad en etapas tempranas.

1.4 Clasificación histológica del cáncer gástrico

El cáncer gástrico se refiere a cualquier neoplasma que surge en la región entre la unión gastro-esofágica y el píloro. Es importante señalar que aproximadamente el 95% de los casos de cáncer gástrico tienen un origen epitelial por lo cual se denominan como adenocarcinomas [2]. La clasificación histológica establecida en 1965 por Lauren, y que sigue en uso, divide al adenocarcinoma gástrico en 2 variantes, el de tipo difuso y el de tipo intestinal [89].

El cáncer de tipo difuso (o poco diferenciado) es el más común en población joven, con una distribución geográfica homogénea y con un relación hombre:mujer similar. Histológicamente se caracteriza por la presencia de un infiltrado de células neoplásicas que no forman estructuras glandulares [11].

El adenocarcinoma de tipo intestinal (la forma más prevalente de la enfermedad) está relacionado a una gastritis predominante en la región del cuerpo gástrico, con presencia de atrofia gástrica [11] y que presenta histológicamente la formación de estructuras similares a glándulas intestinales [87].

1.4.1 Modelo de progresión del cáncer gástrico de tipo intestinal.

Dadas las evidencias de patología y epidemiología, Correa en 1992 propuso el modelo de progresión hacia cáncer gástrico [90], a través de una serie de eventos secuenciales, los cuales inician con una gastritis crónica, caracterizada por un infiltrado inflamatorio de células mononucleares y polimorfonucleares (PMN) a la lamina propia, que progresa hacia una gastritis atrófica, en la cual comienza la pérdida de la estructura glandular del epitelio gástrico, que tiene como consecuencia la alteración en la función normal de las células epiteliales, así como, la invasión de las células inflamatorias a la zona glandular del epitelio. La atrofia gástrica conlleva al desarrollo de una metaplasia intestinal, observándose el reemplazo de células epiteliales gástricas por células epiteliales de tipo intestinal, con presencia de células caliciformes secretoras de moco y enterocitos con microvellosidades que expresan enzimas características del intestino [91];

posteriormente, ésta progresa hacia una displasia, donde ocurre una proliferación de células indiferenciadas, para finalmente, concluir en el desarrollo de cáncer gástrico [92]. Correa propone que la infección con *H. pylori* tiene un papel causal en las primeras etapas de la progresión del modelo (Figura 5) [90].

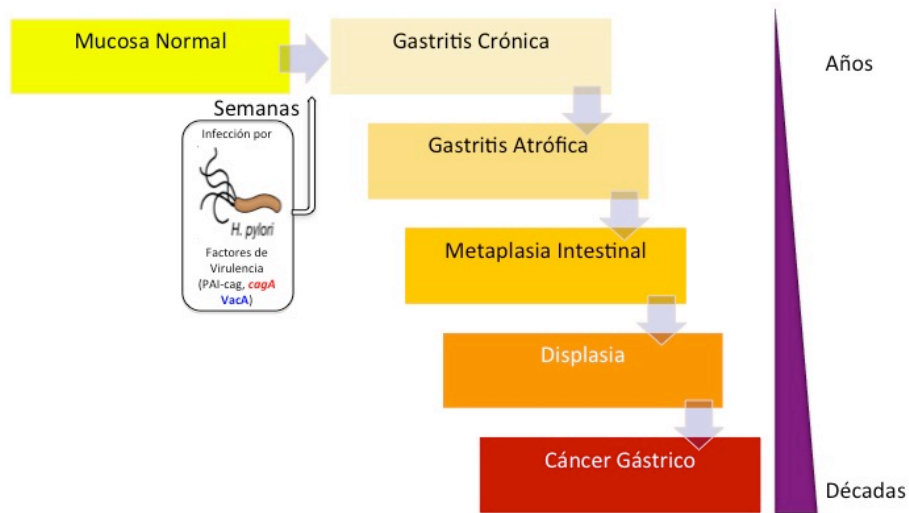


Figura 5. Modelo de progresión a cáncer gástrico. Esquema basado en el propuesto por Correa en 1992 [90].

Dentro de este modelo de progresión, son de nuestro interés 2 entidades clínicas, la gastritis crónica y la metaplasia intestinal, que planteamos como fundamentales en la progresión hacia cáncer gástrico.

1.4.1.1 Gastritis crónica. El término gastritis crónica se refiere esencialmente a un diagnóstico histológico y se define como un proceso inflamatorio crónico en la mucosa gástrica [93], caracterizado por la presencia de PMN, macrófagos, linfocitos B y T, así como, de células plasmáticas [92]. Si bien diversos factores desencadenan el desarrollo de gastritis, como son la ingesta de alcohol o antiinflamatorios no esteroideos (AINES), la epidemiología mundial indica que el principal factor asociado al desarrollo de esta entidad clínica es la infección con *H. pylori*.

A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes clasificaciones con la finalidad de tener un consenso en las características de esta entidad clínica, Whitehead y cols, en 1972, establecieron una clasificación según el tipo de mucosa, el grado de gastritis, superficial o atrófica, y el tipo de metaplasia asociada [94]. Strickland y Mackay, en 1973, clasificaron a la gastritis de acuerdo a la topografía en tipo A y B, la primera se refiere a la gastritis presente en el cuerpo gástrico, que frecuentemente se asocia a autoanticuerpos contra las células parietales, mientras que la gastritis de tipo B se presenta predominantemente en la parte distal del estómago [95]. Posteriormente, Wyatt y Dixon, en 1988, propusieron una clasificación basada en las características histológicas y en la patogénesis de la gastritis, de esta manera se clasificó a la gastritis en tipo A (autoinmune), Tipo B (bacteriana) y tipo C (química o por reflujo) [96].

Finalmente, la clasificación para gastritis más reciente y de mayor uso en la actualidad, es la clasificación de Sydney, la cual surgió con la finalidad de conjuntar las clasificaciones previas y tomar en cuenta las observaciones endoscópicas e histológicas, con el objetivo de tener un sistema estandarizado de clasificación clínica, que además permite la valoración semicuantitativa de cada una de las observaciones realizadas. De esta manera, la clasificación de Sydney toma en cuenta la etiología, topografía y morfología observada [97, 98]. Esta clasificación evalúa 5 parámetros a nivel histológico, la inflamación crónica, actividad de la gastritis (definida por la presencia de infiltrado de neutrófilos), atrofia, metaplasia intestinal y densidad bacteriana de *H. pylori*, las cuales son catalogadas como leve, moderado o severo.

La gastritis asociada a *H. pylori* puede manifestarse de diferentes formas, que va desde una gastritis en el antro o una gastritis en el cuerpo gástrico, hasta una pangastritis (con o sin presencia de atrofia gástrica). Estos diversos patrones de la gastritis se asocian además con el desarrollo de otras patologías, como la úlcera duodenal y el cáncer gástrico. La primera se asocia con una gastritis predominantemente en antro, mientras que el cáncer gástrico se ha asociado en

mayor medida a una gastritis con atrofia en el cuerpo gástrico [18, 99]. Es importante señalar que la presencia del proceso inflamatorio crónico en el estómago causa una destrucción progresiva de las estructuras glandulares del epitelio que esta fuertemente asociado al desarrollo de la atrofia antes mencionada [99].

Los reportes epidemiológicos de nuestro país durante en el año 2012, notificaron 1,641,712 casos de úlceras, gastritis y duodenitis, ocupando el primer lugar dentro de las veinte principales causas de enfermedades no transmisibles en el país. De manera general, estas patologías afectaron principalmente a mujeres, en una proporción de 2 mujeres por cada hombre; los grupos de edad con mayor incidencia fueron los de 60 a 64 años (2,991.99), de 45 a 49 años (2,602.8) y los de 65 y más (2411.22). Las entidades federativas que presentaron mayor incidencia fueron: Nayarit (3,064.7), Sinaloa (2,835.21) y Aguascalientes (2,811.89); las de menor incidencia fueron: Michoacán (1,356.92), Estado de México (1,356.56) y Quintana Roo (1,287.80) [100].

Estas estadísticas resaltan la importancia de las patologías a nivel gástrico en nuestro país. La gastritis que es un padecimiento importante que debe monitorearse dada la posibilidad de que esta entidad clínica progrese a patologías más graves, como lo planteado anteriormente en el modelo de Correa [90].

El estudio de la gastritis crónica es primordial debido a que es la primera fase en el modelo de progresión a cáncer gástrico y permitiría conocer cuales son los primeros mecanismos que participan en la alteración en el epitelio gástrico a nivel molecular, que permita además complementarse con la información clínica.

1.4.1.2 Metaplasia intestinal. Otra entidad clínica de importancia en el modelo de progresión a cáncer gástrico es la metaplasia intestinal, la cual se considera una lesión preneoplásica, en la cual la mucosa gástrica normal se reemplaza por una con características de la mucosa intestinal [101]. Histológicamente, se observa un fenotipo que consiste en células caliciformes secretoras de moco y enterocitos con microvellosidades que expresan enzimas

específicas del intestino [91], esta lesión generalmente aparece primero en la región entre el cuerpo-antro y con el tiempo se extiende a la mucosa colindante [102].

Existen tres subtipos de metaplasia intestinal de acuerdo a las características que presenta el tejido; en la metaplasia intestinal completa (tipo I), el epitelio parece semejante al presente en el intestino delgado, con la presencia de enterocitos y células caliciformes. En ocasiones también se presentan células de Paneth (productoras de lisozimas), así como, la expresión de sialomucinas. Posteriormente, la lesión progresa a una metaplasia de tipo incompleta (tipo II y III) en donde se observa el cambio en la morfología celular, la cual adquiere características que se observan en el intestino grueso (tipo II), con la presencia de células columnares y caliciformes, además de sialomucinas y mucinas neutras. En la última etapa de la metaplasia (tipo III) la morfología ya es de tipo colónica con la expresión de sulfomucinas [103].

La metaplasia intestinal de tipo incompleta está asociada a una transformación oncogénica [91]. Si bien los eventos claves en el desarrollo y progresión de la metaplasia intestinal no están completamente elucidados, la inestabilidad microsatelital, pérdida de heterocigocidad, mutaciones en p53, en APC, la represión en la expresión de p27, así como la sobreexpresión de c-myc (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*), telomerasa, COX-2 (Ciclooxigenasa 2) y la infección con *H. pylori* son asociadas a esta patología [91, 104].

También se reporta en metaplasia intestinal la expresión de factores de transcripción como son: CDX1, CDX2, PDX1, OCT1, TFF3 y RUNX3, conocidos reguladores de la diferenciación intestinal, mientras que la expresión de SOX2, un regulador de diferenciación gástrica se pierde [91, 104].

Otra característica que se observa, es el cambio en la expresión de mucinas en el tejido gástrico, en donde la expresión de marcadores de tejido sano

MUC1, MUC5A y MUC6, cambia hacia la expresión de mucinas de tipo intestinal como es MUC2 [104], entre otras.

CDX2 es un factor de transcripción presente en el intestino delgado y el colon, en tejido gástrico no es expresado de manera normal, sin embargo, en regiones con metaplasia intestinal [91] se observa la expresión de este factor de transcripción al igual que en sujetos infectados con *H. pylori* [104]. Dentro de los genes que se transcriben a través de CDX2 se encuentran la sucrosa-isomaltasa, anhidrasa carbónica 1, la lactasa-florizina hidrolasa, guanilil ciclase C, la apolipoproteína B, claudina 2, defensina humana 5, fosfatasa alcalina y mucina 2 [104].

Por otro lado, dentro de la familia de factor trefoil (TFF, péptidos secretorios), el TFF3 se encuentra expresado de manera normal en células caliciformes del intestino, aunque también se observa una sobreexpresión de esta proteína en epitelio gástrico que presenta metaplasia intestinal [104]. Este péptido está involucrado en el mantenimiento y protección del epitelio intestinal y se propone que la expresión de este péptido sea regulada por CDX2 [104].

La vilina es otro marcador importante de metaplasia intestinal, esta proteína se expresa de manera normal en el intestino ya que está involucrada en la formación de las microvellosidades en el intestino delgado [101] y se propone que *H. pylori* sea capaz de activar la expresión de éste a través de la vía de señalización Erk (extracellular signal-regulated protein kinase pathway) [105].

Para la metaplasia intestinal, los genes anteriormente mencionados son los que se encontraron expresados de manera importante en diversos estudios realizados, tanto en metaplasia intestinal en estómago como en esófago [106].

1.5 Análisis de expresión génica aplicada a cáncer gástrico y sus etapas precursoras

A partir de la identificación de la secuencia de los genes presentes en el genoma humano fue posible el desarrollo de la “ómica”, que ha permitido evaluar las diferencias entre dos o más estados biológicos a nivel de DNA (polimorfismos), RNA (expresión de genes) y proteína (expresión de proteínas) [88]. El estudio se ha enfocado principalmente a entender la biología del cáncer, es decir, las diferencias existentes a nivel genómico, transcriptómico o proteómico entre diferentes tipos de cáncer y sus correspondientes tejidos sanos, lo cual ha permitido un mejor entendimiento de la biología del cáncer.

El estudio de las diferencias a nivel de RNA (transcriptómica) o análisis de expresión génica aplicado a la biología del cáncer ha permitido elucidar algunos de los mecanismos moleculares alterados en este proceso, así como, la identificación de posibles biomarcadores de la enfermedad a nivel diagnóstico y pronóstico e incluso posibles blancos terapéuticos. Sin embargo, a nivel de etapas premalignas el estudio “ómico” aún es limitado.

Particularmente en el caso del cáncer gástrico, el estudio “ómico” se ha realizado a través de análisis de expresión génica en respuesta a la infección con *H. pylori*. A partir de estos estudios se determinó que la infección induce una alteración en la transcripción de genes relacionados con mecanismos de defensa y respuesta inmune, a proliferación y apoptosis celular entre otros [107], sin embargo, la mayor parte de estos estudios se han realizado en modelo *in vitro* de cultivos celulares epiteliales y/o en modelos animales experimentales [108-111].

En el 2003, Boussioutas y cols [112], realizaron un estudio con 124 muestras de cáncer de estómago y de tejido adyacente, con presencia de gastritis crónica o metaplasia intestinal, en donde evaluaron la expresión de 9,381 genes por medio de un microarreglo de expresión. Los patrones de expresión descritos permitían distinguir entre las diferentes etapas premalignas e incluso entre el subtipo de cáncer gástrico. En el caso de las muestras con gastritis crónica, en

este estudio se determinó una firma de expresión para esta entidad representada principalmente por la alteración en genes asociados a procesos mitocondriales, como son la producción de ATP, degradación de ácidos grasos y otros procesos oxidativos, genes asociados a complejo de cadena respiratoria, transporte de moléculas en la mitocondria entre otros. Destacan que esta firma de expresión podría relacionarse con la patogénesis de la infección con *H. pylori* y de manera más específica podría asociarse a la presencia de la proteína VacA, la cual es bien conocido que tiene efectos a nivel de este organelo. En el caso de la metaplasia intestinal, la firma de expresión se asoció con un aumento en la expresión de genes involucrados en diferenciación del tejido intestinal, que se relaciona perfectamente con las manifestaciones histológicas observadas en esta entidad clínica.

Recientemente, Yang y cols [107], en un estudio de muestras de tejido gástrico de pacientes con diagnóstico de gastritis crónica superficial (tres infectados con *H. pylori* y tres sin infección), a través del uso de un microarreglo de 14,112 genes, encontraron un perfil de expresión para gastritis crónica asociado a la infección, concluyendo que en esta entidad clínica se presentan alteraciones en la expresión de genes asociados a metabolismo de proteínas, adhesión celular, inflamación, respuesta inmune, transducción de señales, y transcripción génica. De manera tal que la infección con *H. pylori* estaría provocando alteraciones en estos procesos, favoreciendo la evasión del sistema inmune y perturbando la homeostasis en el estómago para dar origen al desarrollo de cáncer gástrico.

Es importante profundizar en el conocimiento de las diferencias en la expresión génica no solo en cáncer gástrico, sino también en las etapas previas, con la finalidad de identificar perfiles de expresión característicos que permitan distinguir cada evento en la progresión a cáncer gástrico, como son la gastritis crónica y la metaplasia intestinal, y correlacionarlas con las diferencias fenotípicas que se observan y de esta manera comprender los eventos involucrados en inicio y progresión a cáncer gástrico. Además, estos perfiles abrirían la posibilidad de

obtener biomarcadores con aplicaciones diagnósticas, pronósticas e incluso terapéuticas para el tratamiento oportuno tanto del cáncer gástrico como de las etapas previas y así disminuir la alta incidencia y mortalidad que presenta esta enfermedad.

2

JUSTIFICACIÓN

El cáncer gástrico es un problema de salud mundial con una alta mortalidad y que está asociado a la infección con *Helicobacter pylori*; la enfermedad progresa desde una gastritis crónica, como consecuencia de la infección, hasta el desarrollo de cáncer gástrico.

La información a nivel de la expresión génica de las etapas precursoras en el desarrollo de la enfermedad es de importancia para el mejor entendimiento de los mecanismos moleculares alterados durante la progresión; además, permitirá obtener patrones de expresión génica que podrían ser usados para la detección y diagnóstico temprano de cáncer gástrico de tipo intestinal.

3

HIPÓTESIS

La determinación de los perfiles de expresión génica para gastritis crónica y metaplasia intestinal permitirán caracterizar estas dos entidades clínicas. Las diferencias en los perfiles de expresión proporcionarán moléculas específicas con potenciales aplicaciones clínicas.

4

OBJETIVO

Determinar el perfil de expresión génica en etapas precursoras a cáncer gástrico.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener RNA de biopsias gástricas de sujetos con gastritis crónica y metaplasia intestinal.
- Determinar los niveles de expresión génica en gastritis crónica y metaplasia intestinal.
- Determinar los genes expresados diferencialmente en cada entidad y realizar su asociación funcional.
- Generar el patrón de expresión característico para gastritis crónica y metaplasia intestinal.
- Determinar a nivel molecular la presencia de *H. pylori* en las muestras analizadas.

5

METODOLOGÍA

Para alcanzar los objetivos planteados en el proyecto, la metodología se dividió en 4 fases.

En la primera fase se obtuvieron las biopsias gástricas de los grupos de estudio planteados, en colaboración con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y el Hospital General de México.

La segunda consistió en la obtención del RNA total de las biopsias, para realizar la detección de *H. pylori* y los ensayos de expresión génica, esta etapa se realizó en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina de la UNAM.

En la tercera fase a partir del RNA extraído se realizaron los ensayos de microarreglos con la plataforma de Affymetrix (Santa Clara, CA, USA), esto se llevó a cabo en la Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Finalmente, en la cuarta fase de la metodología, la información obtenida de los ensayos de microarreglos se analizó para evaluar la calidad de los resultados. Posteriormente, se determinó el perfil de expresión génica en las etapas analizadas del modelo de progresión a cáncer gástrico. A la par se realizó la determinación de la presencia de *H. pylori* en las muestras a través de técnicas moleculares (PCR-Hibridación) en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina de la UNAM.

5.1 Obtención de biopsias gástricas

Las biopsias se obtuvieron del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y del Hospital General de México (HGM), con la aprobación previa por parte de los comités de ética e investigación tanto de la UNAM, como de los hospitales participantes. De igual manera, antes de la obtención de las muestras se obtuvo el consentimiento informado y por escrito de cada uno de los sujetos incluidos en el estudio.

Se plantearon dos grupos de estudio a evaluar: gastritis crónica y metaplasia intestinal, además un tercer grupo, gastritis aguda, fue planteado como el grupo control contra el cual se realizaron las comparaciones en los análisis de expresión.

Para la obtención de las muestras se reclutaron sujetos con indicación de estudio endoscópico por presentar sintomatología ácido péptica, historia de sangrado digestivo reciente y/o pérdida de peso, excluyendo a menores de 18 años y sin considerar criterios de exclusión de sexo. Dentro de los sujetos que aceptaron participar en el estudio, se excluyeron a aquellos que presentaron linfoma gástrico y úlcera péptica.

Brevemente, para la toma de muestras se realizó un procedimiento endoscópico, en donde el endoscopista examinó cada área del estómago para realizar una evaluación macroscópica del órgano y detectar la presencia de posibles lesiones relacionadas con los grupos a estudiar. Para el caso de sujetos con sospecha de gastritis crónica y gastritis aguda, se tomaron 2 biopsias de las zonas con sospecha de lesión, las cuales se colocaron en una solución estabilizadora de ácidos nucleicos RNAlater (Ambion, Austin, TX) y almacenadas a -70°C, hasta la obtención del diagnóstico histológico. En el caso de pacientes con sospecha de metaplasia intestinal previo a la toma de biopsias se aplicaron de 5 a 10 mL de agente mucolítico en combinación con 20 mL de azul de metileno sobre la mucosa gástrica para evaluar las zonas azul positivas (sugestivas de

metaplasia intestinal) efectuándose, en zonas aledañas a la lesión, la toma de las biopsias dirigidas a este estudio.

Para obtener el diagnóstico histológico se tomaron las biopsias de acuerdo a los lineamientos de la Unidad de Endoscopia del INCMNSZ, (2 biopsias de antro y 2 de cuerpo más una de la incisura angular) [113]. Todas las muestras fueron evaluadas por un patólogo experto y clasificadas de acuerdo a la Clasificación de Sydney [97], para determinar el tipo de lesión, la gravedad y la extensión de la lesión, que se evaluó indicado como ausencia, leve, moderada, severa) de: inflamación (presencia de mononucleares), actividad (presencia de polimorfonucleares), atrofia gástrica (pérdida de glándulas gástricas) y metaplasia intestinal (presencia de tejido con características intestinales), así como, la presencia de *H. pylori*. Las muestras de gastritis crónica solo presentaron inflamación y actividad mientras que las muestras correspondientes a metaplasia intestinal podían estar acompañadas de atrofia, además se determinó el tipo de metaplasia presente (completa o incompleta).

5.2 Extracción de RNA

El RNA de las biopsias seleccionadas se extrajo con el kit RNAqueous (Ambion, Austin, TX). Brevemente, la biopsia se retiró de la solución estabilizadora de ácidos nucleicos (RNAlater, Ambion, Austin, TX) y se colocó en 700 μ L de solución de lisis (a 4°C). Una vez en esta solución, la biopsia fue disgregada con un homogeneizador eléctrico (Tissue Ruptor; Cole Parmer) por pulsos de 15 s a 35,000 rpm hasta que el tejido se lisó y se formó una solución homogénea. Posteriormente, se siguió el protocolo de extracción de acuerdo a las indicaciones del fabricante, eluyendo el RNA de la columna de fibra de vidrio con 20 μ L de agua grado biología molecular y libre de RNAsas (Sigma) pre-calentada a 75°C.

Al concluir la extracción, se realizó una evaluación cuantitativa y cualitativa del RNA. La concentración (expresada en ng/ μ L) y la pureza (expresada como la

relación de absorbancia 260/280) se determinaron con el equipo NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Además, la integridad del RNA se evaluó a través del valor de RIN (RNA Integrity Number) y una nueva cuantificación se realizó con el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) con la finalidad de que su calidad fuera adecuada para el ensayo de microarreglos.

El RNA extraído con una concentración entre 75-120 ng/μL, una relación 260/280 entre 1.8 y 2.1 y una integridad (valor de RIN) ≥ 6.0 , fue usado en los ensayos de microarreglos.

5.3 Ensayos de microarreglos

Para los ensayos de microarreglos se utilizó la plataforma Human Gene 1.0 ST array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), la cual posee 764,885 sondas con un tamaño de 25-mer, que mapean 28,869 genes (con un promedio de 26 sondas por cada gen), con lo cual se logra una cobertura completa del transcriptoma (whole-transcript coverage).

El RNA extraído se llevó a una concentración de 100 ng/μL para posteriormente añadir los controles de marcaje (*dap*, *lys*, *phe*, *thr*, *trp*) de acuerdo a las indicaciones del GeneChip Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

Posteriormente, la síntesis de cDNA se realizó con el kit comercial Ambion WT Expression Kit (Ambion, Austin, TX). Brevemente, a cada muestra el RNA fue sometido a una transcripción reversa para obtener cDNA de cadena sencilla a partir de la cual se sintetizó la segunda cadena de DNA. A partir del DNA de doble cadena se realizó una transcripción *in vitro* con lo que se obtuvo la cadena anti-sentido de RNA complementario (cRNA), el cual fue purificado y cuantificado para confirmar un rendimiento aproximado de 8-10 μg de cRNA. Con este cRNA se

realizó una segunda transcripción reversa con primers degenerados para obtener la cadena sentido de cDNA, adicionando dUTP para realizar la posterior fragmentación y marcaje. El cDNA sintetizado se cuantificó para determinar que se tuvieran mas de 6 µg de cDNA.

El cDNA del paso anterior fue fragmentado y marcado con biotina, para ello se utilizó el Affymetrix GeneChip WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Primero se generaron fragmentos de un tamaño de 40-70 nucleótidos, los cuales posteriormente fueron marcados con biotina. Una vez marcados, se realizó en cocktail de hibridación que incluyó los controles de hibridación (CreX, BioD, BioC y BioD), el cocktail se transfirió al microarreglo que fue incubado en un horno de hibridación a 45°C por 17 horas a 60 rpm. Pasado el tiempo de incubación los microarreglos se tiñeron con el Hybridization Wash and Stain Kit, utilizando con el equipo Fluidics Station 450.

Finalmente, los microarreglos fueron escaneados en el GeneChip® Scanner 3000 7G y se generaron los archivos .CEL que contienen los datos crudos de intensidad de fluorescencia para cada sonda.

5.4 Análisis de microarreglos

Los archivos .CEL fueron importados al software Partek Genomics Suite 6.5 (Partek, St Louis, Mo) con la finalidad de realizar el análisis y la selección de genes expresados diferencialmente. Los datos crudos de estos archivos se sometieron a una corrección de fondo con una posterior normalización con dos métodos, la normalización por cuartiles [114] y RMA (Robust Multichip Average) [115]. Después de este proceso, los datos de los valores de cada sonda se integraron en valores de expresión a nivel de gen y fueron expresados en log2.

Concluida la normalización, se procedió a realizar un control de calidad de marcaje e hibridación de microarreglos a través de la determinación de la

expresión de sondas específicas de origen procariótico (*dap*, *lys*, *phe*, *thr* y *trp* como control de marcaje; CreX, BioD, BioC y BioB como control de hibridación). La finalidad de este control de calidad fue determinar que todas las muestras analizadas fueron procesadas de manera homogénea, desde la síntesis de cDNA hasta la hibridación con los microarreglos, y por tanto, los resultados obtenidos no son productos de variaciones técnicas al momento del manejo de las muestras.

Posterior al control de calidad, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) [116] para determinar el comportamiento de las muestras dentro de cada grupo de estudio. Cada muestra se representó por un número pequeño de componentes que se graficaron para evaluar las similitudes y diferencias entre muestras y de esta manera agruparlas y a su vez distinguirlas de las correspondientes a las otras etapas.

Para el análisis de expresión diferencial se realizó un análisis de varianza (ANOVA) [117], en el cual se compararon los grupos de gastritis crónica y metaplasia intestinal, respecto al grupo control (gastritis aguda). A partir de este análisis estadístico, se seleccionaron los genes que presentaron un cambio en la expresión (Fold Change, FC) mayor o igual a 1.5 (genes sobre-expresados) y un cambio en la expresión menor o igual a -1.5 (genes sub-expresados), y con un valor de $p < 0.05$. Los genes que cumplieron con los parámetros descritos fueron considerados como expresados diferencialmente.

Los genes clasificados como expresados diferencialmente tanto en gastritis crónica como en metaplasia intestinal, se analizaron con el software Ingenuity Pathway Analysis [118] (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com), para asignar una asociación biológica a dichos genes. Este software posee una base de datos (Ingenuity Knowledge Base) con información de publicaciones científicas acerca de las relaciones (directas como indirectas) entre genes y proteínas. Con esta herramienta se realizó el análisis funcional utilizando una prueba exacta de Fisher de una cola para calcular el valor de p [119], que determinó cuales fueron las funciones y procesos biológicos representados significativamente en cada entidad

clínica. De igual manera permitió determinar si estos genes se encontraban significativamente asociados a alguna otra enfermedad.

Por otro lado, se generaron redes de interacción entre los genes expresados diferencialmente en cada entidad. Los genes expresados diferencialmente fueron mapeados en la base de datos y sobrepuestos en una red molecular en esta base de datos y por medio de un algoritmo (con base en la conectividad entre los genes) se construyeron las redes de interacción.

5.5 Síntesis de cDNA a partir del RNA extraído de las biopsias gástricas

Para realizar la detección de *H. pylori* por PCR, a partir del RNA obtenido de las biopsias, se sintetizó cDNA con la enzima Superscript III (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, en un tubo Eppendorf se añadieron 10 µL de agua para PCR, 1 µL de dNTP's (Roche) 10 mM, 1 µL de hexanucleótidos (Roche, Boehringer Mannheim) 10 mM y 1 µL de RNA (en una concentración de 100 ng/µL); esta mezcla se calentó durante 5 min a 65°C y posteriormente se colocó en hielo durante 2 min, se adicionaron 4 µL del amortiguador de la enzima 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂) y 2 µL de DTT 0.1M, el tubo se incubó 2 min a temperatura ambiente (TA) y posteriormente, se adicionó 1 µL de la enzima Superscript III (200 U, Invitrogen), la mezcla final se incubó durante 10 min a TA y posteriormente durante 50 min a 42°C, finalmente, la reacción se detuvo calentando a 70°C durante 15 min.

5.6 Detección de *H. pylori* mediante PCR semi-anidado del gen *16S RNARibosomal*

El PCR semi-anidado consistió en dos amplificaciones consecutivas, para la primer amplificación se utilizó 1 µL del cDNA sintetizado, al que se le adicionaron 24 µL de la mezcla de reacción para PCR, que contenía: 10 µL de amortiguador (10X), 2.5 µL de MgCl₂ (50 mM), 0.5 µL de dNTP's (10 mM), 0.5 µL de los iniciadores Hp1 y Hp3 (20 pmol/µL) y 0.2 µL de Taq DNA Polimerasa (5 U/µL). La amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 94°C/45s, 60°C/45s y 72°C/45s durante 25 ciclos. La segunda amplificación se llevó a cabo con 1 µL del producto de PCR de la primera amplificación, en una mezcla de reacción como la descrita anteriormente utilizando los iniciadores Hp1 y Hp2, bajo las mismas condiciones de amplificación. Los iniciadores utilizados en las amplificaciones se muestran en la Tabla 6. Como control positivo de amplificación se utilizó DNA de la cepa *Helicobacter pylori* J99 (ATCC 700824) y como controles negativos DNA de linfocitos humanos y DNA de *Campylobacter jejuni*. Los productos de amplificación de este segundo PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. El producto esperado tiene un tamaño de 109 pb.

Tabla 6. Secuencia de los iniciadores y sonda utilizados para la amplificación del gen *16S RNARibosomal* [120].

Iniciador	Secuencia 5' -> 3'	Tamaño del producto (pb)	Temperatura de amplificación (°C)	Posición 5' -> 3'
Hp1	CTGGAGAGACTAAGCCCTCC	109	60	834-853
Hp2	ATTACTGACGCTGATTGTGC			744-763
Hp3	AGGATGAAGGTTTAAGGATT			407-426
pHp	CATCCATCGTTTAGGGCGTG	-	42	806-825

5.7 Confirmación de la presencia de *H. pylori* mediante hibridación

Para confirmar la presencia de *H. pylori*, los productos de PCR (ppPCR) obtenidos de la segunda amplificación del PCR semi-anidado se hibridaron con la sonda (iniciador pHp) marcada con digoxigenina, la secuencia de la sonda utilizada se describe en la Tabla 6.

El marcaje de la sonda se realizó en el extremo 3' terminal, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (DIG oligonucleotide 3'-End Labelling kit, Boehringer Mannheim Biochemical). Brevemente, en un tubo Eppendorf se colocaron 4 µL de buffer de reacción concentrado, 4 µL de CoCl₂ 25 mM, 100 pmol de sonda pHp (5 µL de solución de trabajo), 1 µL de DIG-ddUTP, 5 µL de dH₂O y 50 U (1 µL) de Trasferasa Terminal. La mezcla se incubó 15 min a 37°C y la reacción se detuvo con 2 µL de solución de glicógeno-EDTA (1 µL de glicógeno [20mg/ mL] y 2 µL EDTA [0.2 M, pH 8.0]).

Para la hibridación, los ppPCR (20 µL) fueron transferidos a membranas de nylon (Hybond N+, Amersham) y fijados a la membrana en un crosslinker (UVP) a 12,000 µJ/cm². Una vez fijados, la membrana se incubó 1 hora a 42°C con solución de prehibridación (Solución amortiguadora de citrato salino [SSC, 750 mM NaCl, 75 mM de citrato de sodio, pH 7.0], Reactivo de bloqueo 2% [Roche, Boehringer Mannheim], N-laurilsarcosina 0.1%, Dodecil Sulfato de Sodio [SDS] 0.02% y reactivo de Denhart [0.5 g Albúmina sérica bovina fracción V, 0.5 g Ficol (tipo 400), y 0.5 g de Polivinilpirrolidona]), concluida la incubación, se desechó la solución de prehibridación y se agregaron 10 pmol de la sonda pHp (2.5 µL de solución 3.3 pmol/µL) marcada (previamente calentada a ebullición durante 5 min y posteriormente colocada en hielo 2 min) en solución de prehibridación fresca, dejándose incubar toda la noche a 42°C.

Posteriormente, se realizó un lavado con SSC 2X-SDS 0.1% a temperatura ambiente (TA) durante 15 min, se realizó un segundo lavado con SSC 0.5X-SDS 0.1% por 15 min, nuevamente se desechó la solución y se realizó un tercer lavado

con solución amortiguadora de maleatos (ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5). La solución se desechó para adicionar a la membrana solución de bloqueo al 2% y se incubó durante 30 min a TA, concluida la incubación se desechó la solución y se adicionó solución de bloqueo fresca con 4 μ L de anticuerpo anti-digoxigenina (Roche, Boehringer Mannheim) conjugado a fosfatasa alcalina (dilución 1:5,000) dejándose incubar 30 min a TA. Posteriormente, se realizó un lavado con solución amortiguadora de malatos 15 min a TA y se realizó un último lavado con solución de detección (0.1 M TrisBase, 0.1 M NaCl).

El revelado de la membrana se realizó con el reactivo DuoLux Chemiluminescent/Fluorescent Substrate for Alkaline Phosphatase (Vector Laboratories) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, utilizando un volumen de reactivo de 50 μ L/cm², que se colocó directamente en la membrana y se incubó 5 min en la oscuridad. Posteriormente, la membrana se expuso a la película (Kodak) durante 30-60 segundos hasta detectar la señal del control positivo.

6 RESULTADOS

6.1 Obtención de biopsias gástricas y extracción de RNA

Un total de 9 sujetos se estudiaron, 3 se seleccionaron del grupo control, 3 del grupo de gastritis crónica y 3 del grupo de metaplasia intestinal. La selección se realizó de acuerdo a las características de edad y diagnóstico histológico, con la finalidad de que en cada grupo existiera la mayor homogeneidad posible entre muestras.

A partir de las biopsias gástricas obtenidas de estos pacientes se realizaron los ensayos de microarreglos. La información de los sujetos se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Características de la población de estudio.

Grupo	Hombres	Mujeres	Edad
Control	2	1	43 (38-44)
Gastritis crónica	2	1	44 (39-49)
Metaplasia intestinal	1	2	75 (72-78)

De las muestras estudiadas, la extracción de RNA se realizó, con un posterior análisis cuantitativo y cualitativo. La información de éste análisis se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentración, pureza e integridad del RNA obtenido de las biopsias gástricas del grupo control, gastritis crónica y metaplasia intestinal.

Grupo	Muestra	Concentración (ng/μL)	Pureza (260/280)	Integridad (RIN)
Control	P86	337.4	2.06	7.5
	P113	762.0	2.07	7.8
	P131	251.0	2.05	7.1
Gastritis crónica	N008	209.1	2.02	7.6
	N010	1167.6	2.08	6.0
	HGM011	1666.4	2.20	7.5
Metaplasia intestinal	N001	819.7	1.96	6.5
	N002	537.6	2.05	7.5
	N009	260.3	2.07	6.9

Con estos análisis se se concluyó que el RNA obtenido de la biopsias cumplió con los parámetros establecidos para continuar con la metodología. Por lo cual, el RNA fue procesado para obtener el cDNA fragmentado, que se marcó e hibridó para su posterior escaneo y al término construir los archivos .CEL de intensidad de fluorescencia.

6.2 Análisis de microarreglos

A partir de estos archivos, la normalización de los datos se llevó a cabo, para posteriormente realizar el control de calidad de la sondas de marcaje e hibridación, en donde se evaluó la expresión oligos de origen eucariótico que son sintetizadas *in vitro* y que se encuentran ausentes en muestras eucarióticas. Para el caso del control de marcaje, se monitoreó que el procesamiento de las muestras a partir del RNA fuera consistente entre ellas, al evaluar la expresión de las sondas de *B. subtilis*, que debían encontrarse en orden creciente:

lys<phe<thr<dap; mientras que para el control de hibridación, se determinó que el proceso de hibridación en el microarreglo fuera similar entre las muestras, esto se realizó al evaluar que la expresión de las sondas involucradas en la síntesis de biotina en *E. coli*, así como, una sonda del bacteriófago P1 se encontraran en el orden: bioB<bioC<bioD<creX. El valor de expresión expresado en log2, se graficó para cada uno de los microarreglos como se muestra en la Figura 6.

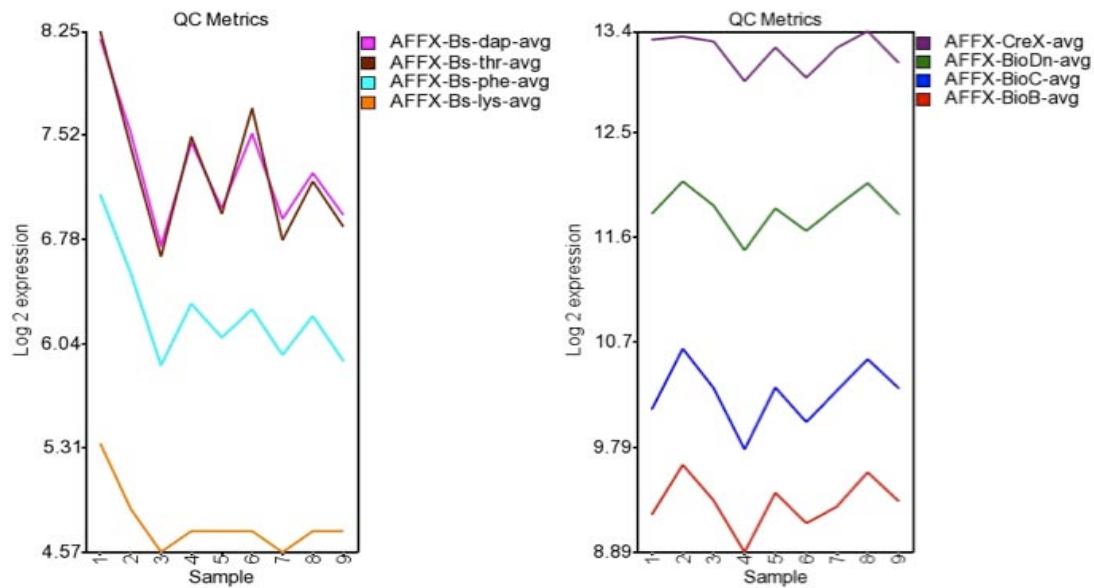


Figura 6. Expresión de las sondas control de marcaje e hibridación en las muestras del grupo control, gastritis crónica y metaplasia intestinal; expresadas en log₂. Las muestras se graficaron de la siguiente manera, 1: HGM011, 2: N001, 3: N002, 4: N008, 5: N009, 6: N010, 7: P113, 8: P131, 9: P86,

En estas gráficas se observa que los niveles de expresión de las sondas se encuentran en el intervalo esperado en las muestras procesadas, siendo las sondas dap y CreX las que presentaron una expresión mayor, y las sondas lys y BioB las que presentaron una expresión menor. Esto es consistente con la metodología, en la cual las primeras sondas se agregaron en una concentración mayor y las sondas lys y BioB, fueron adicionadas a una concentración menor. Por ello, fue posible concluir que la metodología se llevó a cabo de manera consistente

entre las nueve muestras procesadas, sin existir variaciones sistemáticas entre ellas y por lo tanto, las diferencias en expresión de genes son producto de la variación biológica y no de variaciones técnicas.

Concluido el control de calidad, por medio de un análisis de componentes principales (PCA), cada una de las muestras se representó por un número pequeño de componentes y se graficaron, para de esta manera visualizar las similitudes y diferencias entre muestras (Figura 7).

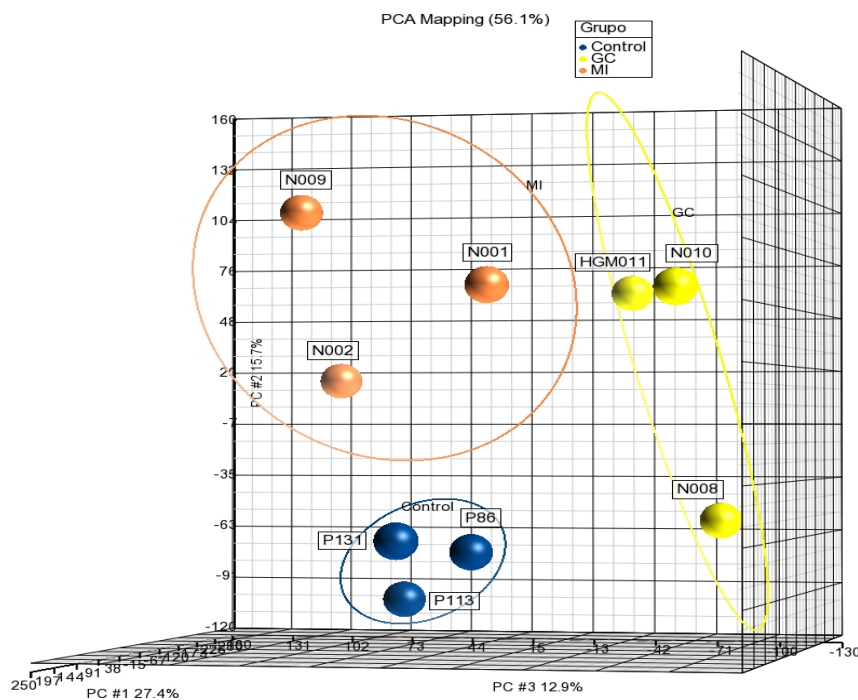


Figura 7. Análisis de componentes principales para las muestras del grupo control, gastritis crónica y metaplasia intestinal.

En la gráfica de PCA se observa que las muestras correspondientes al grupo control, las muestras del grupo de gastritis crónica y las muestras de metaplasia intestinal tuvieron un comportamiento similar dentro de cada grupo y a su vez cada grupo de muestras se asociaron en planos diferentes. Considerando la consistencia en el agrupamiento de las muestras por entidad de estudio, fue

posible realizar los análisis posteriores para determinar las diferencias en la expresión génica en los grupos de gastritis crónica y metaplasia intestinal, con respecto al grupo control.

La evaluación de la expresión génica tanto para el grupo de gastritis crónica como para el de metaplasia intestinal se realizó con un análisis de varianza (ANOVA), el cual generó la información del cambio de expresión (FC, Fold Change) de cada gen con respecto al grupo control. Esta información se utilizó para realizar la selección de genes expresados diferencialmente, que fueron aquellos que mostraron un cambio en la expresión de $-1.5 \geq FC \geq 1.5$, con una $p < 0.05$ de significancia estadística.

Para el grupo de gastritis crónica, se encontraron 605 genes expresados diferencialmente, de estos, 399 se encontraron sobre-expresados y 206 sub-expresados (Tabla 9). En la Figura 8, se muestra una gráfica de volcán, en la cual esta representado el valor de p en función del cambio en la expresión. Los genes seleccionados como expresados diferencialmente son los que se encuentran en el cuadrante superior izquierdo (sub-expresados) y el cuadrante superior derecho (sobre-expresados).

Tabla 9. Genes sobre-expresados y sub-expresados en gastritis crónica.

	Genes sobre-expresados FC ≥ 1.5	Genes sub-expresados FC ≤ -1.5
FC promedio	1.68	-1.77
(FC mínimo-máximo)	(1.50 – 4.88)	(-1.50 – -4.91)

FC: Fold Change (Cambio en la expresión).

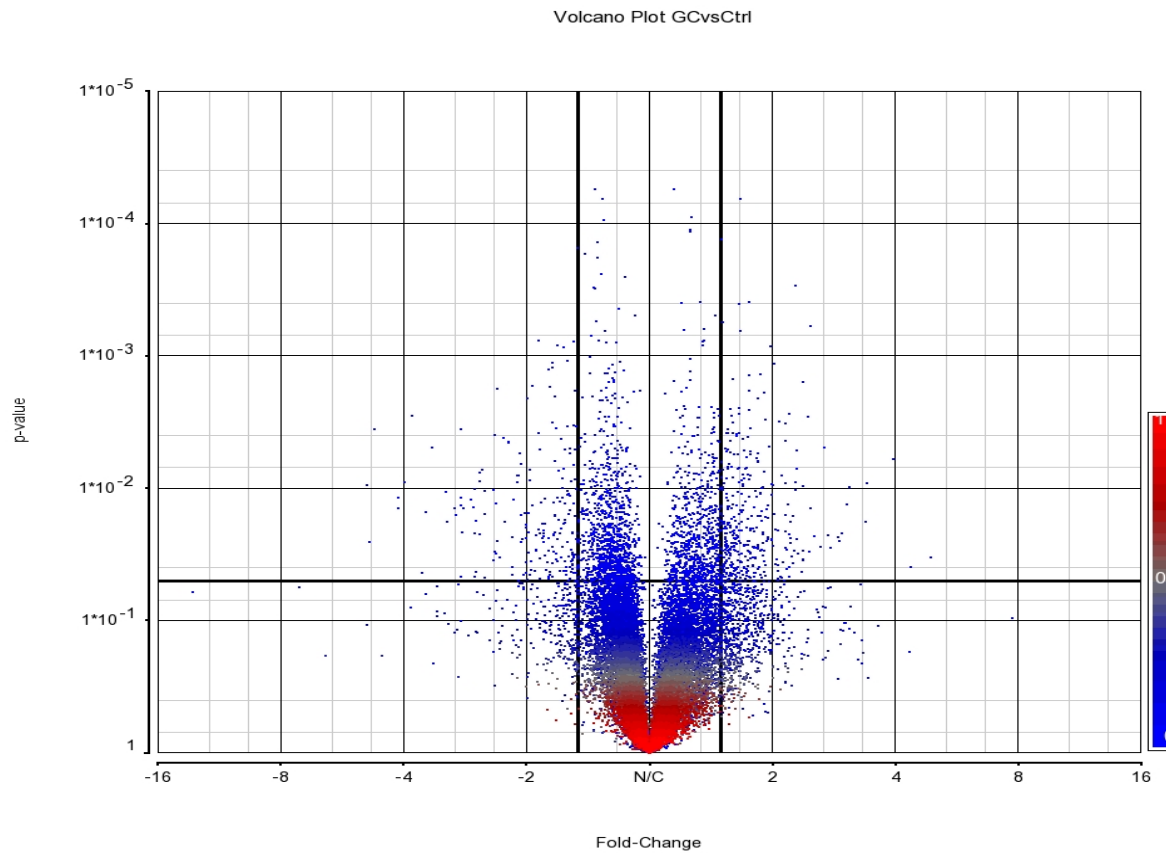


Figura 8. Gráfica de volcán que representa los genes sobre-expresados y sub-expresados para el grupo de gastritis crónica.

De los genes expresados diferencialmente, el 66% mostró un aumento en la expresión, mientras que el 33% de ellos se encontró con una disminución en la expresión con respecto al grupo control. Dentro de los genes sobre-expresados, se encontró una media en el cambio de expresión de 1.68 veces, sin embargo, se alcanzó a detectar un aumento en la expresión de 4.8 veces. La media de cambio de expresión para los genes sub-expresados se encontró de -1.7 veces, observándose además, genes con una disminución en la expresión de casi 5 veces. Esto demostró que si bien hay un cambio en la expresión génica en gastritis crónica respecto al grupo control, este no es tan marcado, aunque no por ello deja de ser significativo.

Por medio del software Ingenuity Pathway Analysis, se realizó la asociación funcional de los genes expresados diferencialmente. En la Tabla 10, se muestran las funciones celulares y moleculares que se encontraron alteradas de acuerdo a los genes expresados diferencialmente en gastritis crónica.

Tabla 10. Asociación funcional de los genes expresados diferencialmente en gastritis crónica. Se muestran el número de genes expresados diferencialmente en cada función, así como, algunos ejemplos de estos.

Función celular y molecular	Genes	Ejemplos
Crecimiento y proliferación celular	63	Proliferación de células cancerosas (CD44, GPER, IGF1R) Proliferación de células endoteliales (FABP4, MYOF, THBS1) Proliferación de células epiteliales (ERBB4, MST1, TGFB3)
Desarrollo celular	40	Diferenciación de líneas tumorales (AZGP1, CTSK, ERBB4, GNAZ, HIST1H4A, IGF1R, IL1RN, PLAUR, PRDM1, RASGRP1, TRIM16) Desarrollo de células endoteliales (CD44, FABP4, MYOF, THBS1, VCAM1) Transición epitelio-mesenquimal de células de cáncer de seno (CD44, IGF1R)
Interacción y señalización entre células	28	Adhesión de células cancerígenas (AMICA1, CD44, CDH2, THBS1, VCAM1) Ensamblaje de uniones intercelulares (CDH2, ERBB4, F2R, GHRL, MPP7, THBS1) Unión celular (CD44, CEACAM5, CNTFR, ENTPD1, F2R, IGF1R, LTF, PLAUR, SERPINA5, SORL1, THBS1, VCAM1)

De acuerdo a los resultados anteriores, en la gastritis crónica es posible observar la alteración en procesos celulares como son la proliferación celular, el desarrollo celular, y en procesos de adhesión y de ensamblaje de las uniones intercelulares.

Además de la asociación funcional de los genes expresados diferencialmente, se construyeron redes de interacción entre ellos con el software descrito. En total fue se generaron 24 redes de interacción entre los genes, siendo 10 las que mapearon el mayor número de genes expresados diferencialmente. De manera general estas redes de interacción se encuentran relacionadas con procesos de proliferación celular, señalización celular y respuesta inflamatoria, lo cual coincide con las observaciones histológicas que se presentaron en esta entidad clínica.

Por otro lado, se predijeron un total de 140 reguladores transcripcionales (factores de transcripción, enzimas, cinasas, citocinas, etc) asociados a la expresión diferencial observada en gastritis crónica, esta predicción además indicaba si existía una activación o inhibición de dichos reguladores transcripcionales. Si bien el número de reguladores transcripcionales asociados a los cambios observados en gastritis crónica es importante, no se encontraron factores de transcripción que se predijeran como activados o reprimidos.

Para el grupo de metaplasia intestinal, se encontraron 631 genes expresados diferencialmente, de estos, 420 mostraron una sobre-expresión y 211 una sub-expresión (Tabla 11). En la Figura 9, se muestra una gráfica de volcán, en la cual esta representado el valor de p en función del cambio en la expresión. Los genes seleccionados como expresados diferencialmente son los que se encuentran en el cuadrante superior izquierdo (sub-expresados) y el cuadrante superior derecho (sobre-expresados).

Tabla 11. Genes sobre-expresados y sub-expresados en metaplasia intestinal.

	Genes sobre-expresados	Genes sub-expresados
	FC ≥ 1.5	FC ≤ -1.5
FC promedio	1.82	-1.68
(FC mínimo-máximo)	(1.50 – 32.54)	(-1.50 – -6.12)

FC: Fold Change (Cambio en la expresión).

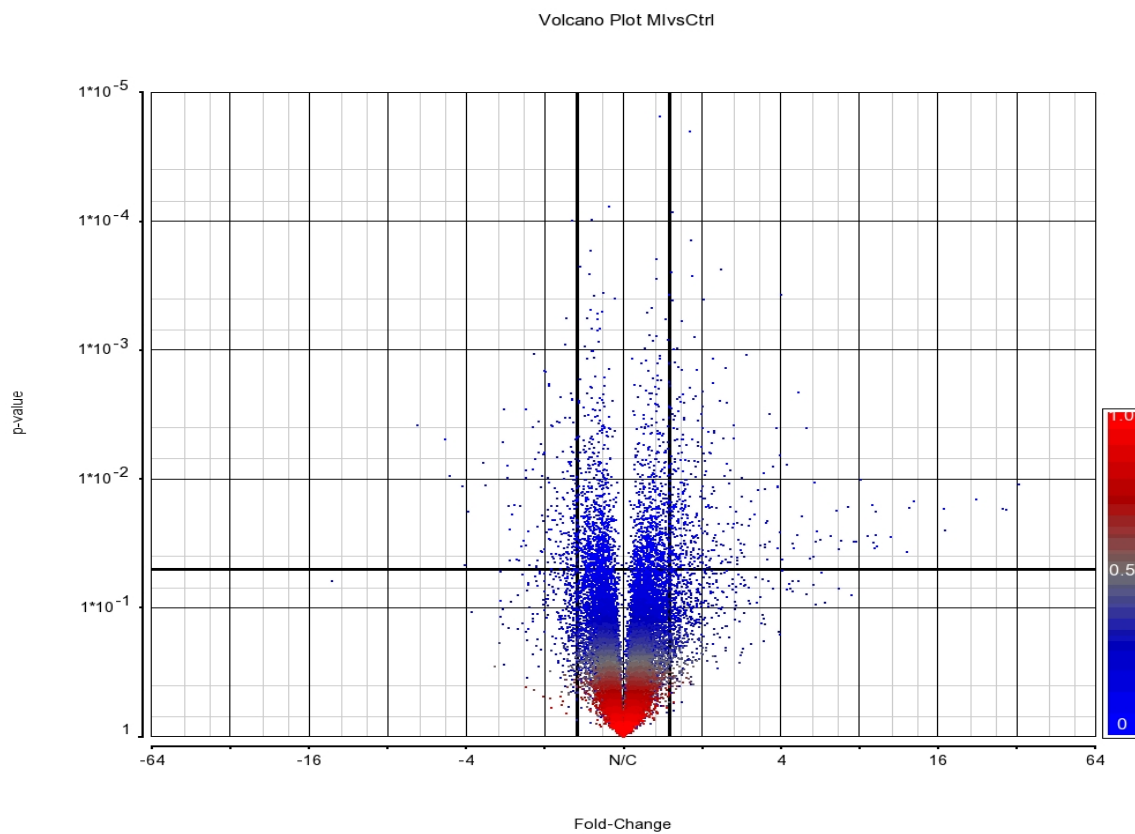


Figura 9. Gráfica de volcán que representa los genes sobre-expresados y sub-expresados para el grupo de metaplasia intestinal.

En el grupo de metaplasia intestinal el 67% de los genes expresados diferencialmente se encontraron con un aumento en la expresión, y el 33% mostraron una disminución en la expresión respecto al grupo control, una tendencia similar a lo observado en el grupo de gastritis crónica. Los genes sobre-

expresados mostraron un cambio en la expresión entre 1.5 y 32.5 veces, con un promedio de 1.82. en el caso de los genes con sub-expresados el promedio de la disminución en la expresión fue de -1.6 veces, aunque se observó una disminución en la expresión de hasta 6 veces.

El cambio en la expresión en metaplasia intestinal muestra una mayor variabilidad en comparación al cambio en la expresión en gastritis crónica. Para metaplasia intestinal se encontraron genes con un aumento en la expresión de hasta 32 veces, mientras que en el caso de gastritis crónica el mayor cambio en la expresión fue de 4.8 veces. En el caso de los genes con una disminución en la expresión, en metaplasia intestinal el cambio observado (6.1 veces) fue cercano al observado en gastritis crónica (4.9 veces), lo que denota que en la metaplasia intestinal existe una mayor variabilidad en la expresión génica que en la gastritis crónica, lo cual se puede asociar a una etapa más avanzada en el modelo de progresión a cáncer gástrico de tipo intestinal.

Con el software Ingenuity Pathway Analysis, se realizó la asociación funcional de los genes expresados diferencialmente en metaplasia intestinal. En la Tabla 12, se muestran las funciones celulares y moleculares que se encontraron alteradas por los genes expresados diferencialmente en metaplasia intestinal.

Tabla 12. Asociación funcional de los genes expresados diferencialmente en metaplasia intestinal. Se muestran el número de genes expresados diferencialmente en cada función, así como, algunos ejemplos de estos.

Función celular y molecular	Genes	Ejemplos
Bioquímica de moléculas pequeñas	72	Metabolismo de lípidos (APOA4, APOB, APOC3, ABCC2, ABCC3, ABCG2, SLC27A4) Síntesis de aminoácidos (DCC)
Transporte molecular	63	Transporte de lípidos (LDLR, LRP1, PLTP, SLC27A4) Exportación de cationes inorgánicos (ATP7B, SLC9A3) Transporte de cationes (ATP1A1, ATP2A2, SLC7A5, SLC9A3)
Interacción y señalización entre células	28	Unión de células (CEACAM5, CXCL12, ITGB4, SERPINB5)

Por otro lado, con la lista de genes expresados diferencialmente fue posible generar redes de interacción entre ellos. Se generaron 25 redes de interacción, siendo 14 las que más mapearon un mayor número de genes expresados diferencialmente. Estas redes de interacción estaban relacionadas de manera importante a procesos de metabolismo, lo cual puede relacionarse con la adquisición de un epitelio con características intestinales, el cual esta encargado de llevar a cabo diferentes procesos metabólicos para la adquisición de nutrientes.

De igual manera se predijeron 190 reguladores transcripcionales (factores de transcripción, enzimas, cinasas, citocinas, etc) asociados con la expresión diferencial observada en metaplasia intestinal. Al igual que en el análisis para gastritis crónica, no se encontraron factores de transcripción que se predijeran como activados o reprimidos.

6.3 Detección de *H. pylori* mediante PCR semi-anidado del gen 16S RNArribosomal e hibridación

La presencia de *H. pylori* se detectó en las muestras del grupo control y de gastritis crónica, sin embargo, en las muestras de metaplasia intestinal no fue posible detectarlo (Figura 10)

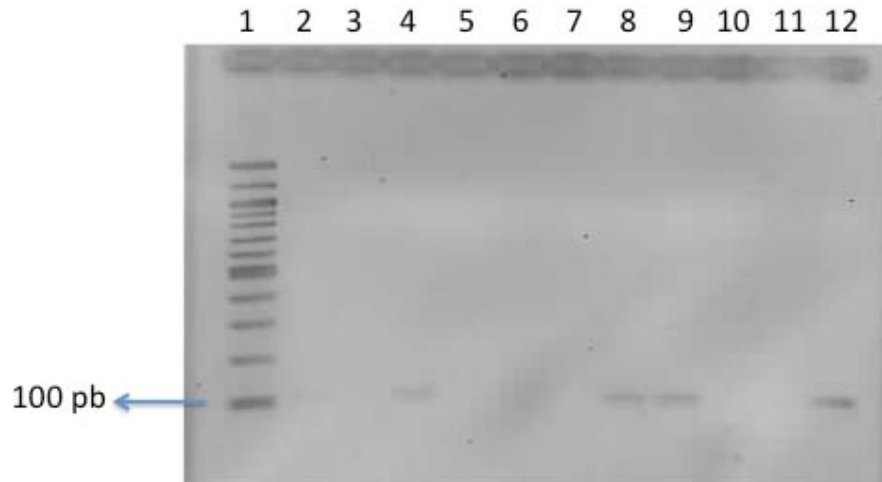


Figura 10. Detección de *H. pylori* en las muestras analizadas por microarreglos. Se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, el producto esperado es de 109 pb. 1: Marcador de peso molecular (100pb), 2: P86, 3:P113, 4:P131, 5:N001, 6:N002, 7:N009, 8:HGM011, 9:N008, 10:N010, 11:*C. jejuni*, 12: *H. pylori*

De igual manera que en la electroforesis, la presencia de *H. pylori* en las muestras control y de gastritis crónica fue positiva mientras que en las muestras de metaplasia intestinal el resultado fue negativo.

7

DISCUSIÓN

La gastritis crónica, es un proceso inflamatorio que ocurre en la mucosa gástrica [93], en donde el principal factor asociado a su desarrollo es la infección con *H. pylori*. El hospedero activa diferentes mecanismos para contrarrestar la infección, donde se presenta la secreción de moléculas antimicrobianas, como la lactoferrina, que inhibe el crecimiento bacteriano al restringir la disponibilidad del Hierro [107].

Las herramientas computacionales utilizadas permitieron analizar a nivel biológico las funciones de los genes expresados diferencialmente. De esta manera se determinó que en la gastritis crónica existen alteraciones en procesos celulares como son la proliferación celular, el desarrollo celular, al igual que en procesos de adhesión en ensamblaje de las uniones intercelulares; lo cual podría ser un mecanismo para compensar el daño en la mucosa gástrica y regenerar la estructura del epitelio

En la gastritis crónica ocurre un infiltrado de diferentes células como PMN, macrófagos, linfocitos B y T, entre otros [92]. En particular neutrófilos y macrófagos producen cantidades importantes de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) [121].

De manera interesante, dentro de los genes que se encontraron con una disminución en la expresión en gastritis crónica, se encontraron genes pertenecientes a la familia de las metalotioneinas (MT1F, MT1JP, MT1E, MT1DP, MT1M, MT1L, MT1P3, MT2A, MT1G, MT1H, MT2A, MT1B, MT1X, MT1P2, MT1IP, MT1A). Moléculas de bajo peso molecular con alto contenido de cisteínas que tienen la capacidad de unión a metales pesados y que forman parte de los

mecanismos de detoxificación de metales como el mercurio y cadmio, y en la homeostasis de metales como el cobre y zinc [122].

Se conoce también su actividad antioxidante al sensar e inactivar ROS, y se sabe que están involucradas en procesos de angiogénesis, apoptosis y proliferación celular [123]. Su papel como antioxidantes y como protectores contra ROS se sugiere es inducido en respuesta a estímulos con interleucinas [124], a manera de actividad anti-inflamatoria, para contrarrestar la respuesta del hospedero a un proceso infeccioso. Es importante, ya que se tienen evidencias de que una baja expresión de estas moléculas hace más susceptibles a las células a sufrir daños a nivel de DNA, producto del estrés oxidativo [124].

Modelos animales con ratones deficientes de metalotioneinas (MT-null), han mostrado que los animales deficientes en estas moléculas son más susceptibles a la acción del LPS bacteriano [125], y presentan mayores niveles de proteína inflamatoria de macrófagos (MIP- α) y la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) [126]. También su papel como potenciales anticancerígenos se ha descrito, dado que la deficiencia de estas moléculas aumenta la susceptibilidad a desarrollar lesiones cancerígenas en modelos animales [127].

El papel de las metalotioneinas en la homeostasis en el estómago comenzó a estudiarse en años recientes, en particular Mita y *cols* en el 2008, realizaron un estudio con ratones deficientes de metalotioneinas que fueron infectados con *H. pylori*; se encontró que estos ratones presentaban un gastritis grave, con un infiltrado importante de células inflamatorias, presencia de lesiones erosivas y un aumento en la producción de citocinas dependientes de NF- κ B, en comparación con los ratones silvestres, después de 21 semanas post-infección [128]. Ese mismo año, Mitani y *cols*, reportaron que en sujetos infectados con *H. pylori* la expresión de metalotioneinas fue mayor en sujetos que no presentaban cáncer gástrico en relación a sujetos infectados que si presentaban cáncer, reafirmando su potencial papel como anticancerígenos [129]. El mismo grupo de investigación de Mitani, en 2012, utilizando un modelo animal a 53 semanas post-infección,

demonstró que los ratones deficientes de metalotioneinas presentaban un infiltrado mayor de células inflamatorias, además, de observar una disrupción en la mucosa gástrica, y la presencia de primeros indicios de metaplasia intestinal [127], por lo que se concluyó que estas moléculas no solo juegan un papel importante como anticancerígenos, sino también, ejercen una acción protectora contra la infección por *H. pylori*.

Respecto a la expresión génica de estas moléculas, el estudio de Boussioutas y colaboradores [112] reporta una alteración moléculas que pertenecen a la familia de las metalotioneinas (MT2A, MT1G, MT1H), así como, en moléculas con una función biológica similar (Protocadherina A), sin embargo, no se ahonda en las posibles implicaciones biológicas de dicha alteración.

Con los resultados obtenidos en este trabajo y correlacionando con los antecedentes previamente descritos, es posible inferir que las metalotioneinas tienen un papel importante a nivel del estómago. Dada su actividad protectora contra ROS y el mayor grado de inflamación que se ha reportado en los estudios en animales deficientes de estas moléculas, se puede concluir que la disminución de la expresión que mostraron los sujetos analizados en gastritis crónica se relaciona con el proceso inflamatorio en la mucosa gástrica y significaría una mayor susceptibilidad de las células a sufrir alteraciones producto del estrés oxidativo, consecuencia del mismo proceso inflamatorio; dando a entender que esta susceptibilidad favorecería la progresión hacia lesiones más severas como la metaplasia intestinal o el cáncer gástrico.

Además de las metalotioneinas, dentro de los genes que presentaron una disminución en la expresión en gastritis crónica, se encontraron algunos relacionados a procesos en mitocondria como son: MRPL32 (Mitochondrial Ribosomal Protein L32), SLC25A4 (Solute Carrier Family 25 (Mitochondrial Carrier; Adenine Nucleotide Translocator), Member 4), COX7B (cytochrome c oxidase subunit VIIb), NDUFA5 (NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 5), nuevamente correlacionando con lo previamente descrito por

Bossiutas en el 2003 [112].

La mitocondria es un organelo fundamental en el metabolismo celular, en donde se da la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa, además de llevar a cabo la beta oxidación de ácidos grasos, y el metabolismo de aminoácidos, sin olvidar su papel en el inicio de la apoptosis [130]. Dado que en la mitocondria es donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa, también es una fuente importante de ROS [131], que si no son correctamente metabolizadas pueden llegar a afectar las funciones de la mitocondria. Se sabe que el genoma mitocondrial es susceptible a sufrir mutaciones producto de estas especies [132, 133]. Los resultados observados pueden sugerir que la perturbación a nivel de mitocondria por las ROS no sólo estaría afectando a nivel del genoma mitocondrial, sino también a nivel funcional debido a la alteración en genes asociados a cadena respiratoria y transporte de moléculas hacia este organelo.

Estos primeros indicios de una alteración a nivel mitocondrial en gastritis crónica pueden estar ligados a la presencia de *H. pylori*, la cual fue demostrada por ensayos moleculares. Como se mencionó anteriormente, la citotoxina vacuolizante (VacA) puede dañar este organelo [48], si bien sus efectos se han descrito más a nivel de inducción de la apoptosis, no se puede descartar que este factor de virulencia o algún otro se relacione con las alteraciones que se observaron en este trabajo, aunque es importante destacar que es necesario profundizar en los hallazgos reportados en este trabajo, analizando un mayor número de muestras de sujetos con esta entidad clínica, para definir de manera más clara cual es el daño que se está provocando en este organelo y sus posibles implicaciones en el desarrollo de patologías más severas.

Al realizar el análisis funcional de los genes expresados diferencialmente en gastritis crónica, se determinó que de manera principal los genes estaban asociados a procesos de proliferación, desarrollo y señalización celular. La alteración en estas funciones celulares en la gastritis crónica puede explicarse como un fenómeno para restaurar la homeostasis en la mucosa gástrica, así

como, un mecanismo para contrarrestar el daño que sufre la mucosa debido al proceso inflamatorio y a la infección con el microorganismo.

Con la información generada para el caso del grupo de gastritis crónica, es posible inferir que en esta entidad clínica el perfil de expresión génica muestra una disminución en moléculas protectoras contra especies reactivas de oxígeno, lo que podría aumentar la posibilidad de daño celular por un ineficiente metabolismo de estas moléculas. Además, da indicios de primeras alteraciones a nivel de mitocondria, las cuales podrían estar relacionadas con la infección con *H. pylori*.

Por otro lado, para el grupo de metaplasia intestinal, dentro de los genes expresados diferencialmente se encontraron marcadores característicos de la metaplasia intestinal [104]. Dentro de estos se encontraron la sucrosa isomaltasa (SI, FC: 32.54), vilina (VIL1, FC: 6.51) y el factor trefoil 3 (TFF3, FC: 3.27), lo cual permite concluir que las muestras presentan un fenotipo intestinal consistente con los reportes previos de la alteración en el fenotipo de las células que se presentan en la mucosa gástrica, correlacionando con los hallazgos reportados por Boussioutas su estudio del 2003 [112].

Si bien otros marcadores como la anhidrasa carbónica 1 (CA1), la lactasa-florizina hidrolasa (LPH), guanilato ciclasa C (GC), la apolipoproteína B (APOB), claudina 2 (CLDN2), defensina humana 5 (DEF5) y la mucina 2 (MUC2) presentaron un cambio en la expresión mayor a 2, el valor de p para estos genes fue mayor a 0.05 y no alcanzaron una significancia estadística, sin embargo, se debe señalar que el número de muestras para cada grupo analizado es reducido por lo que un incremento en el número de muestras para los grupos estudiados permitiría fortalecer la significancia estadística de los resultados.

Dentro de los genes que mostraron un aumento en la expresión en metaplasia intestinal, se encontró a la cadherina 17 (CDH17). Esta molécula pertenece a la familia de las cadherinas, glicoproteínas involucradas en la interacción célula-célula dependiente de calcio, con actividad esencial en morfogénesis, formación de uniones estrechas, polaridad celular y transducción de

señales [134]. La cadherina 17 es una proteína que se expresa únicamente en el intestino, particularmente en la región lateral de las células intestinales [135]. Estudios previos reportaron la expresión de CDH17 en cáncer colorectal, gástrico y pancreático [136]. De igual manera, existen algunos reportes en los cuales se encontró a través de inmunohistoquímica, la expresión de CDH17 en metaplasia intestinal, sin embargo, la función de esta molécula en el desarrollo oncogénico aún no está completamente clara [137]. Si bien los reportes que existen sobre esta molécula en la metaplasia intestinal son limitados, es de importancia que los resultados obtenidos en este trabajo coinciden en que existe un aumento en la expresión de esta cadherina, por lo cual también podría usarse como un posible marcador de esta entidad clínica.

Entre los genes con una sobre-expresión importante, resalta el gen OLFM4, que codifica a la proteína olfactomedina 4, perteneciente a la familia de las olfactomedinas. Se sabe que estas proteínas están involucradas en la señalización e interacción célula-célula [138] y diversos estudios sugieren que tienen una función importante en la neurogenesis, adhesión celular y en la regulación del ciclo celular [139]. El estudio de la proteína permitió conocer que se trata de una glicoproteína de matriz que facilita la adhesión celular al interactuar con lectinas [139], se observó también que interactúa con cadherinas [140], además de poseer efectos antiapoptóticos al inhibir la liberación de citocromo c, e inhibir la activación de las caspasas 3 y 9 [139].

De manera normal, la olfactomedina 4 se expresa en próstata, intestino delgado y colon e incluso se propone como un marcador para células progenitoras de intestino que expresan el receptor Lgr5 [141]. Por otro lado, es capaz de promover la proliferación al favorecer la progresión de la fase S a G2/M del ciclo celular en células cancerígenas [142].

En distintos estudios se reporta la sobreexpresión de esta molécula en la enfermedad inflamatoria intestinal, en individuos infectados con *H. pylori*, así como en diversos tipos de cáncer (de estómago, páncreas, colon, pulmón, mama e

hígado) [139]. Se ha determinado que existe una expresión aumentada de OLFM4 en adenocarcinomas gástricos de tipo intestinal, mientras que en el caso del adenocarcinoma de tipo difuso se observa una tendencia en la que se pierde la expresión de esta molécula [143]. Cabe señalar que a nivel de metaplasia intestinal no se tienen reportes previos de alteraciones en la expresión de este gen, y el papel de esta molécula en el cáncer gástrico no se ha estudiado a profundidad, los análisis hasta el momento únicamente plantean su potencial como marcador pronóstico de cáncer gástrico [144].

Dados estos antecedentes, resalta que en este trabajo se detectara un aumento en la expresión de esta molécula en lesiones precancerosas, particularmente en la metaplasia intestinal, por lo que su potencial aplicación como marcador pronóstico es aplicable, no solo a lesiones malignas, sino también a lesiones precancerosas. Esto además abre la posibilidad de hacer un monitoreo temprano de sujetos que podrían desarrollar cáncer gástrico y tener un diagnóstico oportuno de la patología. Aunado a esto, no debe descartarse que la sobreexpresión de la OLFM4 se encuentre involucrada en la alteración del fenotipo de las células epiteliales, favoreciendo la transformación hacia un fenotipo oncogénico, aunque para plantear un mecanismo por el cual la olfactomedina estaría participando en este último evento es necesario realizar más estudios profundizando en su papel en la metaplasia intestinal.

Como se mencionó, esta molécula se propone como un marcador para células progenitoras en el intestino, que además poseen el marcador Lgr5. El gen que codifica a este marcador (LGR5) también se encontró con un aumento en la expresión, en conjunto con otro marcador propuesto para células progenitoras, la prominina 1 (PROM1). Si bien la sobreexpresión que mostraron estas dos últimas moléculas no es tan grande como la que presentó la OLFM4, resulta interesante que se observe un aumento en marcadores de células progenitoras en la metaplasia intestinal.

Estos marcadores de células progenitoras pueden ser utilizadas como marcadores pronósticos en el desarrollo de cáncer, sin perder de vista que plantea la interrogante del papel de las células progenitoras en la progresión a cáncer de estómago [145]. Una teoría que ha surgido recientemente acerca del origen del cáncer, establece que estos provienen de una alteración en células progenitoras [146], por lo que los resultados de este trabajo sugieren que es necesario explorar el papel de estas células a profundidad.

Por otro lado, en los genes reprimidos, el que se encontró con una disminución mayor en su expresión fue el gen CHIA que codifica para la quitinasa. Esta enzima, degrada la quitina, un componente importante de la pared de algunos organismos como hongos o artrópodos. Existen reportes de que esta proteína estimula la expresión de interleucina 13 y se conoce que es capaz de regular la respuesta inmune hacia un fenotipo Th2 [147]. Se reconoce que la quitinasa ácida, la cual fue encontrada reprimida en este estudio, es producida por células epiteliales, macrófagos y esinófilos, y que es necesaria la estimulación con IL-13 para su expresión. Padecimientos como el asma y las alergias se han sugerido se asocian a la expresión de esta enzima [147]. Algunos estudios previos han reportado la expresión de esta proteína en saliva y estómago [148], sin embargo, únicamente existe en un estudio realizado en Italia, sobre la expresión de la quitinasa en pacientes dispepsia no ulcerosa, infectados con *H. pylori*, donde el gen se encontró ligeramente sobre expresado [149]. Debido a la pobre información acerca de este gen, la disminución en la expresión encontrada en este estudio deberá ser analizada a detalle a fin de definir cual es la asociación entre su baja expresión y la presencia de metaplasia intestinal.

El análisis funcional de los genes expresados diferencialmente mostraron que existe una alteración en procesos relacionados con el metabolismo, en particular se observó una alteración en el metabolismo de lípidos, el transporte de estas moléculas y de cationes. Esta alteración se relaciona con la transformación que presenta el epitelio gástrico, el cual adquiere características del intestino el cual se encarga del metabolismo de estos nutrientes. De esta manera, es posible

inferir que el cambio en el genotipo de las células que se presentan en la metaplasia intestinal, no solo se caracteriza por la expresión de diferentes mucinas, sino que además, se da una alteración en diferentes enzimas características de un epitelio intestinal.

La detección de *H. pylori* se llevó a cabo por métodos moleculares, con el fin de complementar la información histológica, en donde se determinó la presencia de la bacteria en la tinción convencional de hematoxilina-eosina y utilizando una inmunohistoquímica específica para la bacteria.

Si bien para las muestras de dispepsia y de gastritis crónica tanto los resultados histológicos y los de PCR-hibridación muestran la presencia de *H. pylori* en las biopsias procesadas, para el caso de las muestras de metaplasia intestinal, los resultados de histología y de PCR-hibridación fueron negativos; se debe señalar que la ausencia de señal no necesariamente indica que la lesión presente en la mucosa gástrica no esté asociada a la infección por la bacteria. Diversos estudios han mostrado que durante la primera etapa de la infección en la que se da el proceso inflamatorio (es decir, la gastritis) la bacteria puede detectarse mediante diferentes métodos, pero conforme se progresa hacia lesiones más avanzadas, en particular cuando ya existe atrofia del epitelio o la presencia de metaplasia intestinal, el aislamiento y detección de la bacteria a partir de biopsias disminuye. Incluso, se ha llegado a reportar una disminución en los anticuerpos contra la bacteria en sujetos con metaplasia intestinal y cáncer gástrico [150]. Si bien esta información parece contradecir la asociación de *H. pylori* con el desarrollo de cáncer gástrico, se ha sugerido que la ausencia de la bacteria en etapas posteriores al desarrollo de atrofia es consecuencia de las alteraciones que ocurren en la mucosa gástrica, donde se van perdiendo las estructuras normales del epitelio y que producen un ambiente desfavorable para la bacteria, disminuyendo su capacidad de proliferar y continuar colonizando el estómago.

Dada esta información y debido a la compleja interacción entre la bacteria y el hospedero, para determinar un resultado positivo o negativo a la infección con *H. pylori* deben tomarse en consideración diferentes pruebas, tanto moleculares como a nivel clínico. En el caso particular de las muestras de metaplasia intestinal es necesario hacer un análisis más detallado de la evolución de la enfermedad de los sujetos de quienes se tomaron las muestras con el objetivo de determinar si existen antecedentes de infección por *H. pylori*, de igual manera podrían realizarse pruebas de serología para evaluar la presencia de anticuerpos contra la bacteria en estos sujetos.

8

CONCLUSIONES

Los perfiles de expresión para gastritis crónica y metaplasia intestinal fueron determinados encontrándose características únicas para cada uno de ellos.

El perfil identificado en gastritis crónica se encontró asociado a una deficiencia en moléculas protectoras a daño por especies reactivas de oxígeno y una alteración a nivel de mitocondria.

En metaplasia intestinal, el perfil de expresión se caracterizó por la presencia de moléculas asociadas a un epitelio intestinal y con el aumento en la expresión de marcadores de células progenitoras.

Los perfiles de expresión son marcadores útiles en el diagnóstico temprano a cáncer gástrico.

9

PERSPECTIVAS

Como continuación de este trabajo, se validará la información generada a través de microarreglos en un mayor número de muestras por medio de ensayos de PCR-tiempo real para confirmar la alteración en la expresión de los genes que resultaron de interés biológico, así como por inmunohistoquímica, para visualizar las diferencias encontradas a nivel de proteína.

La información presentada en este trabajo, plantea nuevas interrogantes, una pregunta a responder es si las alteraciones observadas en gastritis crónica son producto de la infección con *H. pylori* o actúan en conjunto con el proceso infeccioso para causar daño en el epitelio gástrico. Por otro lado, el papel de las células progenitoras se ha comenzado a estudiar en procesos carcinogénicos, surgiendo la teoría de las células madres cancerosas como responsables del desarrollo de diversos tumores. En los resultados obtenidos en este trabajo, resalta el aumento en la expresión de marcadores en células progenitoras en metaplasia intestinal, abriendo el panorama del papel de estas células no solo en el desarrollo de eventos carcinogénicos, sino desde etapas consideradas como premalignas.

Con las ventajas que presentan las nuevas tecnologías de análisis genómico, es necesario complementar la información de expresión génica, con estudios a nivel de regulación de la expresión, como sería el análisis de microRNA o de perfiles de metilación. De igual manera es posible realizar estudios a nivel genómico para determinar si existen mutaciones a nivel de DNA que pudieran estar asociadas a las entidades clínicas estudiadas. En conjunto toda esta información genómica permitiría tener un mejor panorama de las alteraciones que ocurren en etapas previas al desarrollo del cáncer gástrico, lo cual permitiría elucidar los procesos biológicos clave en el desarrollo de esta entidad clínica.

La presencia de sintomatología inespecífica o en su defecto la ausencia de los mismos, en las diferentes patologías clínicas (como la gastritis crónica, la metaplasia intestinal y el cáncer gástrico) dificulta su diagnóstico, siendo la endoscopia el método estándar que se utiliza hasta la fecha. Estas limitaciones en el diagnóstico se relacionan con la alta tasa de mortalidad que presenta el cáncer gástrico, por lo que es necesario evaluar el papel de las moléculas específicas para cada entidad clínica descritas en este trabajo como posibles marcadores diagnósticos. Para ello, se requiere evaluar su expresión a nivel serológico, para de esta manera tener una herramienta no invasiva y con un menor costo que el procedimiento endoscópico para la detección temprana no solo del cáncer gástrico, sino de etapas previas, con la finalidad de detener e incluso revertir el daño en la mucosa gástrica.

10

REFERENCIAS

1. OMS, *Cáncer, Nota descriptiva 297*. 2014.
2. Nagini, S., *Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention*. World J Gastrointest Oncol, 2012. **4**(7): p. 156-69.
3. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2013; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
4. Mbulaiteye, S.M., M. Hisada, and E.M. El-Omar, *Helicobacter Pylori associated global gastric cancer burden*. Front Biosci, 2009. **14**: p. 1490-504.
5. de Martel, C., D. Forman, and M. Plummer, *Gastric cancer: epidemiology and risk factors*. Gastroenterol Clin North Am, 2013. **42**(2): p. 219-40.
6. Haenszel, W., *Report of the working group on studies of cancer and related diseases in migrant populations*. Int J Cancer, 1969. **4**(3): p. 364-71.
7. *Panorama Epidemiológico y Estadístico de la Mortalidad en México 2010*, SINAVE/DGE/SALUD, Editor 2012.
8. IARC, *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1994. **61**: p. 1-241.
9. IARC, *A review of human carcinogens. Part B: Biological agents / IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2012. **100 (pt.B)**: p. 1-441.
10. Mobley, H.L., G.L. Mendz, and S.L. Hazell, *Helicobacter pylori physiology and genetics* 2001, Washington DC: ASM Press. 626.
11. Crew, K.D. and A.I. Neugut, *Epidemiology of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(3): p. 354-62.
12. Graham, D.Y., et al., *Seroepidemiology of Helicobacter pylori infection in India. Comparison of developing and developed countries*. Dig Dis Sci, 1991. **36**(8): p. 1084-8.
13. Konturek, P.C., S.J. Konturek, and T. Brzozowski, *Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis*. J Physiol Pharmacol, 2009. **60**(3): p. 3-21.
14. Camargo, M.C., et al., *Determinants of Helicobacter pylori seroprevalence in Mexican adolescents*. Helicobacter, 2004. **9**(2): p. 106-14.
15. Torres, J., et al., *A community-based seroepidemiologic study of Helicobacter pylori infection in Mexico*. J Infect Dis, 1998. **178**(4): p. 1089-94.
16. Suerbaum, S. and P. Michetti, *Helicobacter pylori infection*. N Engl J Med, 2002. **347**(15): p. 1175-86.
17. *Gastric cancer and Helicobacter pylori: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts*. Gut, 2001. **49**(3): p. 347-53.
18. Amieva, M.R. and E.M. El-Omar, *Host-bacterial interactions in Helicobacter pylori infection*. Gastroenterology, 2008. **134**(1): p. 306-23.

19. Hatakeyama, M., *Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis*. J Gastroenterol, 2009. **44**(4): p. 239-48.
20. Tegtmeyer, N., S. Wessler, and S. Backert, *Role of the cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in Helicobacter pylori pathogenesis*. FEBS J, 2011. **278**(8): p. 1190-202.
21. Blaser, M.J., et al., *Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach*. Cancer Res, 1995. **55**(10): p. 2111-5.
22. Hatakeyama, M., *Oncogenic mechanisms of the Helicobacter pylori CagA protein*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(9): p. 688-94.
23. Jones, K.R., J.M. Whitmire, and D.S. Merrell, *A tale of two toxins: Helicobacter pylori CagA and VacA modulate host pathways that impact disease*. Frontiers in Microbiology, 2010. **1**(115): p. 1-17.
24. Polk, D.B. and R.M. Peek, Jr., *Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(6): p. 403-14.
25. Backert, S., N. Tegtmeyer, and M. Selbach, *The versatility of Helicobacter pylori CagA effector protein functions: The master key hypothesis*. Helicobacter, 2010. **15**(3): p. 163-76.
26. Higashi, H., et al., *Biological activity of the Helicobacter pylori virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14428-33.
27. Ferreira, R.M., et al., *The number of Helicobacter pylori CagA EPIYA C tyrosine phosphorylation motifs influences the pattern of gastritis and the development of gastric carcinoma*. Histopathology, 2012. **60**(6): p. 992-8.
28. Nguyen, L.T., et al., *Helicobacter pylori virulence and the diversity of gastric cancer in Asia*. J Med Microbiol, 2008. **57**(Pt 12): p. 1445-53.
29. Higashi, H., et al., *SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein*. Science, 2002. **295**(5555): p. 683-6.
30. Tsutsumi, R., et al., *Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with Helicobacter pylori CagA*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(1): p. 261-76.
31. Maroun, C.R., et al., *The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(22): p. 8513-25.
32. Higashi, H., et al., *Helicobacter pylori CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17205-16.
33. Suerbaum, S. and C. Josenhans, *Helicobacter pylori evolution and phenotypic diversification in a changing host*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(6): p. 441-52.
34. Moese, S., et al., *The Helicobacter pylori CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin*. Cell Microbiol, 2007. **9**(5): p. 1148-61.
35. Selbach, M., et al., *The Helicobacter pylori CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin*. Proteomics, 2004. **4**(10): p. 2961-8.
36. Selbach, M., et al., *The Helicobacter pylori CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation*. EMBO J, 2003. **22**(3): p. 515-28.
37. Suzuki, M., et al., *Interaction of CagA with Crk plays an important role in Helicobacter pylori-induced loss of gastric epithelial cell adhesion*. J Exp Med, 2005. **202**(9): p. 1235-47.

38. Amieva, M.R., et al., *Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori CagA*. Science, 2003. **300**(5624): p. 1430-4.
39. Saadat, I., et al., *Helicobacter pylori CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity*. Nature, 2007. **447**(7142): p. 330-3.
40. Zeaiter, Z., et al., *Analysis of detergent-resistant membranes of Helicobacter pylori infected gastric adenocarcinoma cells reveals a role for MARK2/Par1b in CagA-mediated disruption of cellular polarity*. Cell Microbiol, 2008. **10**(3): p. 781-94.
41. Murata-Kamiya, N., et al., *Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells*. Oncogene, 2007. **26**(32): p. 4617-26.
42. Fodde, R. and T. Brabletz, *Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(2): p. 150-8.
43. Mimuro, H., et al., *Grb2 is a key mediator of helicobacter pylori CagA protein activities*. Mol Cell, 2002. **10**(4): p. 745-55.
44. Hirata, Y., et al., *Helicobacter pylori CagA protein activates serum response element-driven transcription independently of tyrosine phosphorylation*. Gastroenterology, 2002. **123**(6): p. 1962-71.
45. Churin, Y., et al., *Helicobacter pylori CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response*. J Cell Biol, 2003. **161**(2): p. 249-55.
46. Yamaoka, Y., *Mechanisms of disease: Helicobacter pylori virulence factors*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010. **7**(11): p. 629-41.
47. Wroblewski, L.E. and R.M. Peek, Jr., *Helicobacter pylori in gastric carcinogenesis: mechanisms*. Gastroenterol Clin North Am, 2013. **42**(2): p. 285-98.
48. Boquet, P. and V. Ricci, *Intoxication strategy of Helicobacter pylori VacA toxin*. Trends Microbiol, 2012. **20**(4): p. 165-74.
49. Atherton, J.C., et al., *Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration*. J Biol Chem, 1995. **270**(30): p. 17771-7.
50. Rhead, J.L., et al., *A new Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer*. Gastroenterology, 2007. **133**(3): p. 926-36.
51. Atherton, J.C., et al., *Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of Helicobacter pylori*. Gastroenterology, 1997. **112**(1): p. 92-9.
52. Miehleke, S., et al., *The Helicobacter pylori vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany*. Int J Cancer, 2000. **87**(3): p. 322-7.
53. Chung, C., et al., *Diversity of VacA intermediate region among Helicobacter pylori strains from several regions of the world*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(3): p. 690-6.
54. Palframan, S.L., T. Kwok, and K. Gabriel, *Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for Helicobacter pylori pathogenesis*. Front Cell Infect Microbiol, 2012. **2**: p. 92.
55. Lupetti, P., et al., *Oligomeric and subunit structure of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin*. J Cell Biol, 1996. **133**(4): p. 801-7.
56. Cover, T.L. and M.J. Blaser, *Purification and characterization of the vacuolating toxin from Helicobacter pylori*. J Biol Chem, 1992. **267**(15): p. 10570-5.
57. Adrian, M., et al., *Multiple oligomeric states of the Helicobacter pylori vacuolating toxin demonstrated by cryo-electron microscopy*. J Mol Biol, 2002. **318**(1): p. 121-33.
58. Ilver, D., et al., *Helicobacter pylori toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism*. Cell Microbiol, 2004. **6**(2): p. 167-74.

59. Nguyen, V.Q., R.M. Caprioli, and T.L. Cover, *Carboxy-terminal proteolytic processing of Helicobacter pylori vacuolating toxin*. Infect Immun, 2001. **69**(1): p. 543-6.
60. Reyrat, J.M., et al., *3D imaging of the 58 kDa cell binding subunit of the Helicobacter pylori cytotoxin*. J Mol Biol, 1999. **290**(2): p. 459-70.
61. McClain, M.S., et al., *Essential role of a GXXXG motif for membrane channel formation by Helicobacter pylori vacuolating toxin*. J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 12101-8.
62. Molinari, M., et al., *Vacuoles induced by Helicobacter pylori toxin contain both late endosomal and lysosomal markers*. J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 25339-44.
63. Szabo, I., et al., *Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of Helicobacter pylori is required for its biological activity*. EMBO J, 1999. **18**(20): p. 5517-27.
64. Papini, E., et al., *Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by Helicobacter pylori vacuolating toxin*. J Clin Invest, 1998. **102**(4): p. 813-20.
65. Foo, J.H., et al., *Both the p33 and p55 subunits of the Helicobacter pylori VacA toxin are targeted to mammalian mitochondria*. J Mol Biol, 2010. **401**(5): p. 792-8.
66. Willhite, D.C. and S.R. Blanke, *Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity*. Cell Microbiol, 2004. **6**(2): p. 143-54.
67. Kimura, M., et al., *Vacuolating cytotoxin purified from Helicobacter pylori causes mitochondrial damage in human gastric cells*. Microb Pathog, 1999. **26**(1): p. 45-52.
68. Kandulski, A., P. Malfertheiner, and T. Wex, *Role of regulatory T-cells in H. pylori-induced gastritis and gastric cancer*. Anticancer Res, 2010. **30**(4): p. 1093-103.
69. Jang, T.J., *The number of Foxp3-positive regulatory T cells is increased in Helicobacter pylori gastritis and gastric cancer*. Pathol Res Pract, 2010. **206**(1): p. 34-8.
70. Machado, J.C., et al., *A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma*. Gastroenterology, 2003. **125**(2): p. 364-71.
71. Camargo, M.C., et al., *Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and gastric cancer: a meta-analysis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(9): p. 1674-87.
72. Hou, L., et al., *Polymorphisms in Th1-type cell-mediated response genes and risk of gastric cancer*. Carcinogenesis, 2007. **28**(1): p. 118-23.
73. Santini, D., et al., *Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in gastric cancer of intestinal and diffuse histotypes*. Clin Exp Immunol, 2008. **154**(3): p. 360-4.
74. Wex, T., et al., *Gene polymorphisms of the NOD-2/CARD-15 gene and the risk of gastric cancer in Germany*. Anticancer Res, 2008. **28**(2A): p. 757-62.
75. El-Omar, E.M., et al., *Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer*. Nature, 2000. **404**(6776): p. 398-402.
76. El-Omar, E.M., *The importance of interleukin 1beta in Helicobacter pylori associated disease*. Gut, 2001. **48**(6): p. 743-7.
77. Ye, S., *Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases*. Matrix Biol, 2000. **19**(7): p. 623-9.
78. Gedert, H., et al., *Polymorphism of p16 INK4A and cyclin D1 in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract*. J Cancer Res Clin Oncol, 2005. **131**(12): p. 803-8.
79. Capella, G., et al., *DNA repair polymorphisms and the risk of stomach adenocarcinoma and severe chronic gastritis in the EPIC-EURGAST study*. Int J Epidemiol, 2008. **37**(6): p. 1316-25.

80. Silva, F., et al., *MUC1 gene polymorphism in the gastric carcinogenesis pathway*. Eur J Hum Genet, 2001. **9**(7): p. 548-52.
81. Magnusson, P.K.E., et al., *Gastric cancer and human leukocyte antigen: distinct DQ and DR alleles are associated with development of gastric cancer and infection by Helicobacter pylori*. Cancer Res, 2001. **61**(6): p. 2684-9.
82. Huang, X.E., et al., *Effects of dietary, drinking, and smoking habits on the prognosis of gastric cancer*. Nutr Cancer, 2000. **38**(1): p. 30-6.
83. Kim, S.S., et al., *Helicobacter pylori in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma*. Cancer Lett, 2011. **305**(2): p. 228-38.
84. Hofman, P., et al., *Pathogenesis of Helicobacter pylori infection*. Helicobacter, 2004. **9 Suppl 1**: p. 15-22.
85. Fox, J.G. and T.C. Wang, *Inflammation, atrophy, and gastric cancer*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 60-9.
86. Ding, S.Z., J.B. Goldberg, and M. Hatakeyama, *Helicobacter pylori infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis*. Future Oncol, 2010. **6**(5): p. 851-62.
87. Stoicov, C., et al., *Molecular biology of gastric cancer: Helicobacter infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling*. Gene, 2004. **341**: p. 1-17.
88. Dicken, B.J., et al., *Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions*. Ann Surg, 2005. **241**(1): p. 27-39.
89. Lauren, P., *The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1965. **64**: p. 31-49.
90. Correa, P., *Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention*. Cancer Res, 1992. **52**(24): p. 6735-40.
91. Giraud, A.S., *Metaplasia as a premalignant pathology in the stomach*. Gastroenterology, 2007. **132**(5): p. 2053-6.
92. Peek, R.M., Jr. and M.J. Blaser, *Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 28-37.
93. Rugge, M., et al., *Gastritis: the histology report*. Dig Liver Dis, 2011. **43 Suppl 4**: p. S373-84.
94. Whitehead, R., S.C. Truelove, and M.W. Gear, *The histological diagnosis of chronic gastritis in fiberoptic gastroscope biopsy specimens*. J Clin Pathol, 1972. **25**(1): p. 1-11.
95. Strickland, R.G. and I.R. Mackay, *A reappraisal of the nature and significance of chronic atrophic gastritis*. Am J Dig Dis, 1973. **18**(5): p. 426-40.
96. Wyatt, J.I. and M.F. Dixon, *Chronic gastritis--a pathogenetic approach*. J Pathol, 1988. **154**(2): p. 113-24.
97. Price, A.B., *The Sydney System: histological division*. J Gastroenterol Hepatol, 1991. **6**(3): p. 209-22.
98. Misiewicz, J.J., *The Sydney System: a new classification of gastritis. Introduction*. J Gastroenterol Hepatol, 1991. **6**(3): p. 207-8.
99. Morson, B.C. and N.A. Shepherd, *Morson and Dawson's gastrointestinal pathology*. 5th ed2013, Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell. xiii, 873 p.
100. *Información Epidemiológica de Morbilidad, Anuario Ejecutivo 2012*, SINAVE/DGE/SALUD, Editor 2013.

101. Busuttill, R.A. and A. Boussioutas, *Intestinal metaplasia: a premalignant lesion involved in gastric carcinogenesis*. J Gastroenterol Hepatol, 2009. **24**(2): p. 193-201.
102. Correa, P., M.B. Piazuelo, and K.T. Wilson, *Pathology of gastric intestinal metaplasia: clinical implications*. Am J Gastroenterol. **105**(3): p. 493-8.
103. Barros, R., et al., *Pathophysiology of intestinal metaplasia of the stomach: emphasis on CDX2 regulation*. Biochem Soc Trans. **38**(2): p. 358-63.
104. Gutierrez-Gonzalez, L. and N.A. Wright, *Biology of intestinal metaplasia in 2008: more than a simple phenotypic alteration*. Dig Liver Dis, 2008. **40**(7): p. 510-22.
105. Tsukamoto, T., T. Mizoshita, and M. Tatematsu, *Gastric-and-intestinal mixed-type intestinal metaplasia: aberrant expression of transcription factors and stem cell intestinalization*. Gastric Cancer, 2006. **9**(3): p. 156-66.
106. Stairs, D.B., J. Kong, and J.P. Lynch, *Cdx genes, inflammation, and the pathogenesis of intestinal metaplasia*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2010. **96**: p. 231-70.
107. Yang, Z.M., W.W. Chen, and Y.F. Wang, *Gene expression profiling in gastric mucosa from Helicobacter pylori-infected and uninfected patients undergoing chronic superficial gastritis*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33030.
108. Backert, S., et al., *Gene expression and protein profiling of AGS gastric epithelial cells upon infection with Helicobacter pylori*. Proteomics, 2005. **5**(15): p. 3902-18.
109. You, Y.H., et al., *Time-series gene expression profiles in AGS cells stimulated with Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(11): p. 1385-96.
110. Maeda, S., et al., *cDNA microarray analysis of Helicobacter pylori-mediated alteration of gene expression in gastric cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **284**(2): p. 443-9.
111. Kim, N., et al., *Analysis of Gene Expression Profile of AGS Cells Stimulated by Helicobacter pylori Adhesion*. Gut Liver, 2007. **1**(1): p. 40-8.
112. Boussioutas, A., et al., *Distinctive patterns of gene expression in premalignant gastric mucosa and gastric cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(10): p. 2569-77.
113. Stolte, M. and A. Meining, *The updated Sydney system: classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment*. Can J Gastroenterol, 2001. **15**(9): p. 591-8.
114. Bolstad B.M., I.R.A., Åstrand M. and Speed T.P. , *A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias*. Bioinformatics, 2002. **19**(2): p. 185-192.
115. Irizarry, R.A., et al., *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data*. Biostatistics, 2003. **4**(2): p. 249-64.
116. Jolliffe, I.T., *Principal Component Analysis*, ed. Springer-Verlag1986, New York.
117. Cui, X., et al., *Improved statistical tests for differential gene expression by shrinking variance components estimates*. Biostatistics, 2005. **6**(1): p. 59-75.
118. Thomas, S. and D. Bonchev, *A survey of current software for network analysis in molecular biology*. Hum Genomics, 2010. **4**(5): p. 353-60.
119. Kramer, A., et al., *Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis*. Bioinformatics, 2014. **30**(4): p. 523-30.
120. Ho, S.A., et al., *Direct polymerase chain reaction test for detection of Helicobacter pylori in humans and animals*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(11): p. 2543-9.
121. Phull, P.S., C.J. Green, and M.R. Jacyna, *A radical view of the stomach: the role of oxygen-derived free radicals and anti-oxidants in gastroduodenal disease*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1995. **7**(3): p. 265-74.

122. Thirumoorthy, N., et al., *A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology*. World J Surg Oncol, 2011. **9**: p. 54.
123. Ruttkay-Nedecky, B., et al., *The role of metallothionein in oxidative stress*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(3): p. 6044-66.
124. Thirumoorthy, N., et al., *Metallothionein: an overview*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(7): p. 993-6.
125. Kimura, T., et al., *Sensitivity of metallothionein-null mice to LPS/D-galactosamine-induced lethality*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(1): p. 358-62.
126. Inoue, K., et al., *Role of metallothionein in coagulatory disturbance and systemic inflammation induced by lipopolysaccharide in mice*. FASEB J, 2006. **20**(3): p. 533-5.
127. Mita, M., et al., *Metallothionein deficiency exacerbates chronic inflammation associated with carcinogenesis in stomach of mice infected with Helicobacter pylori*. J Toxicol Sci, 2012. **37**(6): p. 1261-5.
128. Mita, M., et al., *Metallothionein is a crucial protective factor against Helicobacter pylori-induced gastric erosive lesions in a mouse model*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(4): p. G877-84.
129. Mitani, T., et al., *Role of metallothionein in Helicobacter pylori-positive gastric mucosa with or without early gastric cancer and the effect on its expression after eradication therapy*. J Gastroenterol Hepatol, 2008. **23**(8 Pt 2): p. e334-9.
130. Desler, C. and L.J. Rasmussen, *Mitochondria in biology and medicine - 2012*. Mitochondrion, 2013.
131. Venditti, P., L. Di Stefano, and S. Di Meo, *Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species*. Mitochondrion, 2013. **13**(2): p. 71-82.
132. Yakes, F.M. and B. Van Houten, *Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(2): p. 514-9.
133. Li, J.M., et al., *Effects of hydrogen peroxide on mitochondrial gene expression of intestinal epithelial cells*. World J Gastroenterol, 2002. **8**(6): p. 1117-22.
134. Geiger, B. and O. Ayalon, *Cadherins*. Annu Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 307-32.
135. Wendeler, M.W., et al., *Intestinal LI-cadherin acts as a Ca²⁺-dependent adhesion switch*. J Mol Biol, 2007. **370**(2): p. 220-30.
136. Su, M.C., et al., *Cadherin-17 is a useful diagnostic marker for adenocarcinomas of the digestive system*. Mod Pathol, 2008. **21**(11): p. 1379-86.
137. Dong, W., Q. Yu, and Y. Xu, *Altered expression of a Li-cadherin in gastric cancer and intestinal metaplasia*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(2): p. 536-42.
138. Tomarev, S.I. and N. Nakaya, *Olfactomedin domain-containing proteins: possible mechanisms of action and functions in normal development and pathology*. Mol Neurobiol, 2009. **40**(2): p. 122-38.
139. Grover, P.K., J.E. Hardingham, and A.G. Cummins, *Stem cell marker olfactomedin 4: critical appraisal of its characteristics and role in tumorigenesis*. Cancer Metastasis Rev. **29**(4): p. 761-75.
140. Liu, W., et al., *The glycoprotein hGC-1 binds to cadherin and lectins*. Exp Cell Res, 2006. **312**(10): p. 1785-97.
141. van der Flier, L.G., et al., *OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells*. Gastroenterology, 2009. **137**(1): p. 15-7.
142. Kobayashi, D., et al., *Olfactomedin 4 promotes S-phase transition in proliferation of pancreatic cancer cells*. Cancer Sci, 2007. **98**(3): p. 334-40.

143. Liu, W., et al., *Expression of hGC-1 is correlated with differentiation of gastric carcinoma*. *Histopathology*, 2007. **51**(2): p. 157-65.
144. Yu, L., L. Wang, and S. Chen, *Olfactomedin 4, a novel marker for the differentiation and progression of gastrointestinal cancers*. *Neoplasia*, 2011. **58**(1): p. 9-13.
145. Quante, M. and T.C. Wang, *Stem cells in gastroenterology and hepatology*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009. **6**(12): p. 724-37.
146. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
147. Lee, C.G., et al., *Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury*. *Annu Rev Physiol*. **73**: p. 479-501.
148. Paoletti, M.G., et al., *Human gastric juice contains chitinase that can degrade chitin*. *Ann Nutr Metab*, 2007. **51**(3): p. 244-51.
149. Cozzarini, E., et al., *CHIT1 and AMCase expression in human gastric mucosa: correlation with inflammation and Helicobacter pylori infection*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009. **21**(10): p. 1119-26.
150. Bornschein, J. and P. Malfertheiner, *Gastric carcinogenesis*. *Langenbecks Arch Surg*, 2011. **396**(6): p. 729-42.