



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Expresión de Telomerasa, *c-myc* y *sp1*
en biopsias gástricas humanas**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Maestra en Ciencias

PRESENTA

Q.F.B. Olga Roxana Suaste Villanueva

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Yolanda López Vidal
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Luis Servín González
Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM

Dr. Jorge Vázquez Ramos
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México. Septiembre, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la tutoría de la doctora Yolanda López Vidal. Durante la realización de este trabajo se contó con la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) número 201004. El trabajo experimental fue financiado por el proyecto CONACYT 47749M.

Para la realización de este proyecto se contó con el asesoramiento técnico del Dr. Gonzalo Castillo Rojas para los temas de biología molecular y microbiología; del Dr. Sergio Ponce de León Rosales para el análisis estadístico; del Servicio de Gastroenterología del INCMNSZ, donde se obtuvo la colección de muestras para el estudio; y de la QFB. Rosa Isabel Amieva Fernández, para el cultivo y obtención de las cepas tipo y aislamientos clínicos de *H. pylori*.

Agradecimientos

A la Dra. Yolanda López Vidal, por permitirme ser parte de su equipo, y por todo su apoyo y confianza para el desarrollo de este proyecto.

A mi Comité Tutor, por guiarme y apoyarme durante todas las etapas de este proyecto.

Al Dr. Gonzalo Castillo Rojas por su constante ayuda y generosidad.

A mis compañeros del Programa de Inmunología Molecular Microbiana, por ayudarme, regañarme, corregirme, compartir y siempre contribuir positivamente para que este trabajo fuera posible.

A mis padres, *Rosita* y *Beto*, por el esfuerzo que siempre hicieron para asegurar mi educación, y por los valores que me enseñaron con el ejemplo de sus vidas.

A mi hermano Andrés, por su generosidad y compañía.

A Mau, por todo lo andado, y por nuestro Simón.

A Simón, por esas risitas capaces de mover el mundo.

A Karina, por su amistad y acompañamiento durante nuestro paso por la Universidad.

Abreviaturas

Símbolo / Siglas	Significado
°C	Grado Celsius
AGS	Adenocarcinoma gástrico
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (del inglés <i>American Type Culture Collection</i>)
BLAST	Herramienta de búsqueda básica por alineamiento local (del inglés <i>Basic Local Allignment Search Tool</i>)
C	Citosina
Cag	Proteína asociada a la citotoxina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario (del inglés <i>Complementary desoxyribonucleic acid</i>)
CG	Cáncer gástrico
CO ₂	Dióxido de carbono
Ct	Punto umbral (del inglés <i>Threshold point</i>)
DE	Desviación estándar
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés <i>Ethylendyaminetetraacetic acid</i>)
fg	Fentogramos
g	Gramo
G	Guanina
GCL	Gastritis crónica leve
GCM	Gastritis crónica moderada
GCS	Gastritis crónica severa
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
HTM	<i>Haemophilus</i> Test Medium
IARC	Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (del inglés <i>International Agency for research on cancer</i>)
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Inr	Secuencia iniciadora de la transcripción
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodalton
L	Litro
log	Logaritmo
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar

Símbolo / Siglas	Significado
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas (del inglés, <i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i>)
MI	Metaplasia intestinal
µg	Microgramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mM	Milimolar
NCBI	Centro Nacional para Información Biotecnológica (del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NFQ	Apagador no-fluorescente (del inglés <i>Non-fluorescent quencher</i>)
ng	Nanogramo
nt	Nucleótido
O ₂	Oxígeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI-cag	Isla de patogenicidad <i>cag</i>
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase chain reaction</i>)
pH	Potencial hidrógeno
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés <i>Ribonucleic acid</i>)
RNA _m	Ácido ribonucleico ribosomal (del inglés <i>Ribosomal Ribonucleic acid</i>)
rRNA	Ácido ribonucleico mensajero (del inglés <i>Ribonucleic acid messenger</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>Reactive oxygen species</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RT PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (inversa) (del inglés <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SFB	Suero fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
T _m	Temperatura de fusión (del inglés <i>Melt temperature</i>)
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
VacA	Citotoxina vacuolizante
VEFG	Factor de crecimiento vascular endotelial (del inglés <i>Vascular endotelial growth factor</i>)

Resumen

El cáncer gástrico es un proceso patológico multifactorial que se presenta en etapas, en las cuales hay diferentes alteraciones que favorecen su desarrollo, entre ellas la acumulación de mutaciones genéticas en el individuo afectado. Estudios independientes en esta neoplasia han mostrado el papel que juegan algunos genes supresores de tumores y oncogenes, así como el papel de la activación de la telomerasa, la inestabilidad cromosómica y las moléculas de adhesión celular. De igual forma, se han estudiado diferentes marcadores moleculares individuales para determinar la asociación de la bacteria *Helicobacter pylori* con el cáncer gástrico, sin que estos hayan demostrado ser de utilidad para el diagnóstico ni el pronóstico.

En el presente estudio se evaluó el uso de marcadores genéticos conjuntos, tales como la expresión génica de telomerasa (*htert*), *c-myc* y *sp1*, con el objetivo de determinar su expresión en biopsias gástricas de pacientes con diversos padecimientos gastrointestinales tales como cáncer gástrico, úlcera péptica y gastritis, y que además tenían infección por *H. pylori*.

Se encontró que la carga bacteriana de *H. pylori* fue diferente en las distintas etapas de la enfermedad (gastritis, metaplasia intestinal y cáncer gástrico). El análisis de la expresión de *c-myc*, *sp1* y *htert* mostró una tendencia al incremento conforme el grado de la patología gástrica aumentaba en severidad y el análisis de múltiples marcadores moleculares en la progresión a cáncer gástrico permitió identificar a los sujetos con mayor riesgo de padecer patologías más severas.

Índice

Resumen.....	6
1. Introducción	9
1.1. Descubrimiento de <i>Helicobacter pylori</i>	9
1.2. Características Microbiológicas.....	10
1.3. Epidemiología.....	12
1.4. Patogénesis.....	12
1.5. Alteraciones genéticas en cáncer gástrico.....	22
2. Justificación.....	31
3. Hipótesis.....	32
4. Objetivo General.....	32
5. Objetivos particulares	32
6. Metodología	33
6.1. Iniciadores y sondas TaqMan para la cuantificación de la expresión de los genes <i>c-myc</i> , <i>sp1</i> y <i>htert</i>	33
6.2. Iniciadores y sondas Taqman para la cuantificación de <i>H. pylori</i>	33
6.3. Cepas bacterianas y líneas celulares	34
6.4. Extracción de RNA y DNA a partir de biopsias gástricas humanas.....	34
6.5. Extracción de DNA bacteriano	35
6.6. Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	36
6.7. Controles para la cuantificación de <i>H. pylori</i> por PCR tiempo real	36
6.8. PCR tiempo real para expresión génica	37
6.9. PCR tiempo real para cuantificación de <i>H. pylori</i>	38
6.10. Especificidad de iniciadores y sonda TaqMan para <i>H. pylori</i>	39
6.11. Biopsias gástricas.....	39
7. Resultados.....	40
7.1. Análisis <i>In silico</i>	40
7.2. PCR tiempo real y el intervalo dinámico.....	48
7.3. Población de estudio	64
7.4. Expresión de <i>c-myc</i> , <i>sp1</i> y <i>htert</i> en biopsias gástricas	65

7.5.	Cuantificación de <i>H. pylori</i> en biopsias gástricas	66
7.6.	Análisis estadístico.....	67
8.	Discusión	73
9.	Conclusiones	80
10.	Perspectivas	80
11.	Referencias.....	81

1. Introducción

1.1. Descubrimiento de *Helicobacter pylori*

El primer reporte conocido acerca de la presencia de microorganismos gástricos fue realizado por Giulio Bizzozero en Turín, Italia, en 1893, quien describe en sus observaciones anatómicas de la mucosa gástrica de perros, espiroquetas habitantes de las glándulas gástricas [1].

En 1940, Freedberg y Baron reportaron la presencia de “espiroquetas” en aproximadamente el 40% de los especímenes de mucosa gástrica proveniente de humanos; sin embargo, sus hallazgos causaron gran controversia debido a que un microorganismo sobreviviera en las condiciones tan adversas del estómago.

Entre 1950 y 1960, Susumu Ito realizó estudios anatómicos por microscopía electrónica de las células gástricas mediante los cuales describió la presencia de “espirilos” en sus muestras. Para el año de 1967 publicó una fotografía de uno de estos organismos con morfología característica de *Helicobacter pylori*.

A mediados de la década de los 70s, Steer y Colin-Jones estudiaron la relación entre la presencia de este microorganismo y la inflamación durante una terapia de curación de úlceras gástricas con carbenoxolona, observaron curación de las úlceras, pero sin disminución del grado de inflamación de la mucosa gástrica y aunque encontraron que el 80% de sus muestras fueron positivas para esta bacteria no pudieron cultivarla.

Para la década de los 80s, ya se comenzaba a reconocer la relación entre la presencia de este microorganismo con la presencia de ureasa, gastritis epidémica y úlcera péptica; sin embargo, aunque muchos investigadores trataron de explicar los hallazgos que relacionaban dicha bacteria con la enfermedad ulcero péptica, no fue hasta el año de 1982, cuando la bacteria pudo ser aislada [1, 2].

Desde el año de 1979, Warren había observado la presencia de microorganismos espirales en la mucosa gástrica de pacientes y había documentado la inflamación asociada a ella; En 1981, Warren y Marshall diseñaron un estudio que les permitió evaluar la asociación existente entre la presencia de esta bacteria espiral y diferentes patologías gástricas a partir de biopsias humanas. En 1982 estos investigadores australianos lograron por primera vez el aislamiento de este microorganismo utilizando medios de cultivo similares a aquellos usados para el aislamiento de *Campylobacter* sp. en condiciones de anaerobiosis. Warren y Marshall reportaron que más del 65% (n=100) de los pacientes estudiados fueron positivos para la bacteria y que además la mayor parte de ellos tenía gastritis [1-3].

En 1985 esta bacteria fue nombrada *Campylobacter pyloridis*, posteriormente, corregido a *C. pylori* en 1987. Dicho microorganismo inicialmente fue incluido en este género debido a las similitudes en cuanto a morfología, condiciones de crecimiento, metabolismo y contenido de G+C en su genoma con las especies pertenecientes al mismo; sin embargo, posteriormente se encontraron grandes diferencias entre los microorganismos del género *Campylobacter* y esta bacteria, tales como: la presencia de múltiples flagelos polares, diferencias en contenido de ácidos grasos y diferencias en la secuencia del RNA ribosomal 16S, por las cuales, se creó el género *Helicobacter* y este microorganismo fue nombrado como *Helicobacter pylori* [1, 2].

1.2. Características Microbiológicas

El género *Helicobacter* abarca más de 20 especies y forma parte de la familia *Campylobacteriaceae*; está conformado por bacterias Gram negativas no esporuladas, de morfología espiral o helicoidal cuyas dimensiones son de 0.3 a 1.0 µm de diámetro por 1.5 a 10 µm de largo. Las bacterias de este género son móviles y presentan movimientos rápidos tipo tirabuzón y movimientos lentos debido a la presencia de flagelos en uno o ambos polos.

Las especies de este género son microaerófilas y su desarrollo óptimo se presenta a 37°C. Se desarrolla en una gran variedad de bases de agar nutritivo suplementadas con sangre o suero. Son

microorganismos quimioorganótrofo. No fermentan ni oxidan sacarosa. De las diferentes especies que comprenden este género, la de mayor importancia clínica en el humano es *H. pylori* [4].

H. pylori es una bacteria en forma de “S” con 1 a 3 ondas o vueltas, que mide 0.5 x 5 µm y tiene de 5 a 7 flagelos en uno de sus polos. En cultivos de 3 a 5 días la bacteria, al microscopio, se observa de forma pleomórfica, bacilos curvos irregulares y en forma de U; sin embargo, en cultivos viejos se observan únicamente formas cocoides de la bacteria que son pobremente teñidas con la tinción de Gram. En cuanto a su organización interna presenta la típica estructura de pared celular de bacterias gramnegativas, aunque la composición del peptidoglicano de *H. pylori* es menos compleja que la del resto de las bacterias gramnegativas [4].

Los cultivos primarios de *H. pylori* de forma general tienen menos resistencia al oxígeno que los subcultivos, con un desarrollo máximo de 3 a 7% de O₂. Diferentes métodos estandarizados para el cultivo de este microorganismo, utilizan atmósferas que contienen 2 a 5% de O₂, 5 a 10% de CO₂ y 0 a 10% de H₂. Subcultivos de *H. pylori* se adaptan rápidamente a condiciones anaerobias. El tiempo de desarrollo generalmente va de 48 a 72 hrs a 37° C [4].

H. pylori se desarrolla en diferentes medios sólidos suplementados con sangre o con derivados de ella. En diferentes estudios fueron utilizados como bases el agar Brucella y el agar Columbia suplementados con 7 a 10% de sangre de caballo o carnero, aunque se observó un mejor desarrollo con sangre de caballo. Generalmente, *H. pylori* no se desarrolla en medios con antibióticos y lo hace muy lentamente en medios líquidos con la formación de una gran cantidad de formas cocoides [4].

H. pylori forma colonias pequeñas de 0.5 a 2 mm, translúcidas a amarillentas en medios suplementados con 7% de sangre de caballo y colonias translúcidas a grisáceas de 0.5 a 1mm en gelosa sangre.

Como pruebas base para la identificación de *H. pylori*, además de las características microscópicas y la morfología colonial, se tienen las pruebas de ureasa, oxidasa y catalasa a las cuales es positivo. De forma adicional a estas pruebas fenotípicas del microorganismo, en la actualidad se cuenta con

diferentes técnicas para la diferenciación de las especies pertenecientes al género *Helicobacter* tales como hibridación DNA-DNA, análisis de ácidos grasos y proteínas, proporción G+C en el genoma y secuencia de la subunidad menor del *rRNA* entre otras [4].

1.3. Epidemiología

Actualmente, se estima que cerca del 50% de la población mundial está infectada por *H. pylori*. Aunque la infección por este microorganismo se presenta a nivel mundial, existen diferencias significativas en cuanto a la prevalencia de infección en los distintos países y entre grupos poblacionales de un mismo país. De forma general, se estima la prevalencia de *H. pylori* en países desarrollados va de un 20 a un 50%, mientras que en países en desarrollo es de hasta de un 80% [5-9]. La infección por este microorganismo se adquiere en la infancia principalmente en el seno familiar. *H. pylori* fue identificada como el principal agente causal de gastritis crónica activa de la cual derivan diferentes patologías de mayor gravedad que fueron asociadas a la infección por este microorganismo [5]. En 1998 Torres y colaboradores reportaron un estudio de seroprevalencia en México; encontraron que en niños menores de 1 año la seropositividad fue del 20%, a la edad de 10 años esta se incrementó alrededor del 50% y al cumplir los 20 años cerca de 70% de la población tenía anticuerpos contra *H. pylori* [6].

1.4. Patogénesis

Existe controversia sobre la forma en que se transmite este microorganismo; sin embargo, se considera que la transmisión ocurre de persona a persona. Los resultados publicados sugieren que las vías de transmisión son: fecal-oral, oral-oral y gastro-oral, sin embargo, existen trabajos que reportan la detección de *H. pylori* en muestras de agua lo que sugiere que especialmente en países en desarrollo este es un vehículo importante de transmisión [5-7].

H. pylori es una bacteria cuyo órgano blanco es el estómago humano. Después de la ingestión del microorganismo existe un periodo de proliferación bacteriana intensa, así como un proceso

inflamatorio de la mucosa gástrica, en esta etapa se presentan síntomas transitorios debidos al proceso de gastritis aguda. Junto con el cuadro de gastritis se presenta hipoclorhidria que se prolonga durante meses, esto fue observado en niños y en modelos animales, así como, una proliferación bacteriana máxima. Posteriormente, la respuesta inflamatoria aguda debida a la infección es reducida a un nivel estable, pasando de un cuadro de gastritis aguda a gastritis crónica, durante la cual el huésped induce una respuesta inmune humoral que resulta ineficiente para la eliminación de la bacteria. En esta etapa se restaura el pH normal del estómago y el huésped se vuelve asintomático [5-7].

Debido a la persistencia de *H. pylori* en el estómago, un 15 a 20% de los individuos infectados desarrollan úlcera péptica y otro pequeño porcentaje puede desarrollar linfoma tipo MALT. Sin embargo, en algunos de los huéspedes existe un progreso gradual de la respuesta inflamatoria que afecta las glándulas gástricas provocando atrofia de las mismas; dicha progresión requiere de 30 a 40 años en promedio y tiene gran importancia ya que a partir de esta atrofia se desencadena un proceso que lleve a metaplasia intestinal, displasia y en última instancia al desarrollo de adenocarcinoma gástrico en < 1% de los sujetos infectados por *H. pylori* (Figura 1) [7, 8].

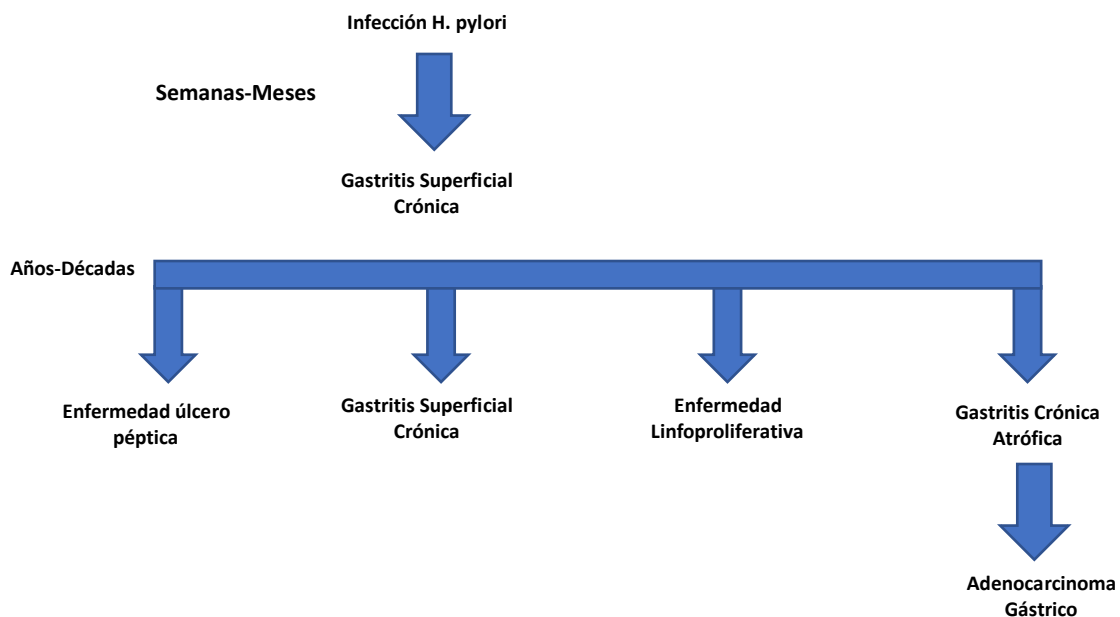


Figura 1. Historia natural de la infección por *H. pylori* [Adaptada de Ref. 8].

Los factores que determinan el resultado clínico de la infección por *H. pylori* fueron estudiados y se reportó una alta variabilidad que depende tanto de factores de la bacteria como del huésped; sin embargo, existe una fuerte correlación entre el patrón y la localización de la gastritis y el riesgo para el desarrollo del cuadro clínico, por ejemplo, úlcera gástrica o duodenal, gastritis atrófica, carcinoma o linfoma tipo MALT. Si la gastritis crónica es predominantemente antral se tiene un mayor riesgo de desarrollar úlcera duodenal; que, si se trata de una pangastritis crónica, la mayoría de los pacientes permanecen asintomáticos durante el resto de su vida; y solo un pequeño porcentaje tiene el riesgo de desarrollar linfoma tipo MALT. En el caso en que el huésped desarrolle gastritis atrófica predominantemente en cuerpo se incrementa el riesgo de desarrollar cáncer gástrico siguiendo la serie de metaplasia intestinal, displasia y cáncer gástrico, también se sabe que este riesgo es mayor conforme la edad se incrementa (Figura 2) [8, 10-13].

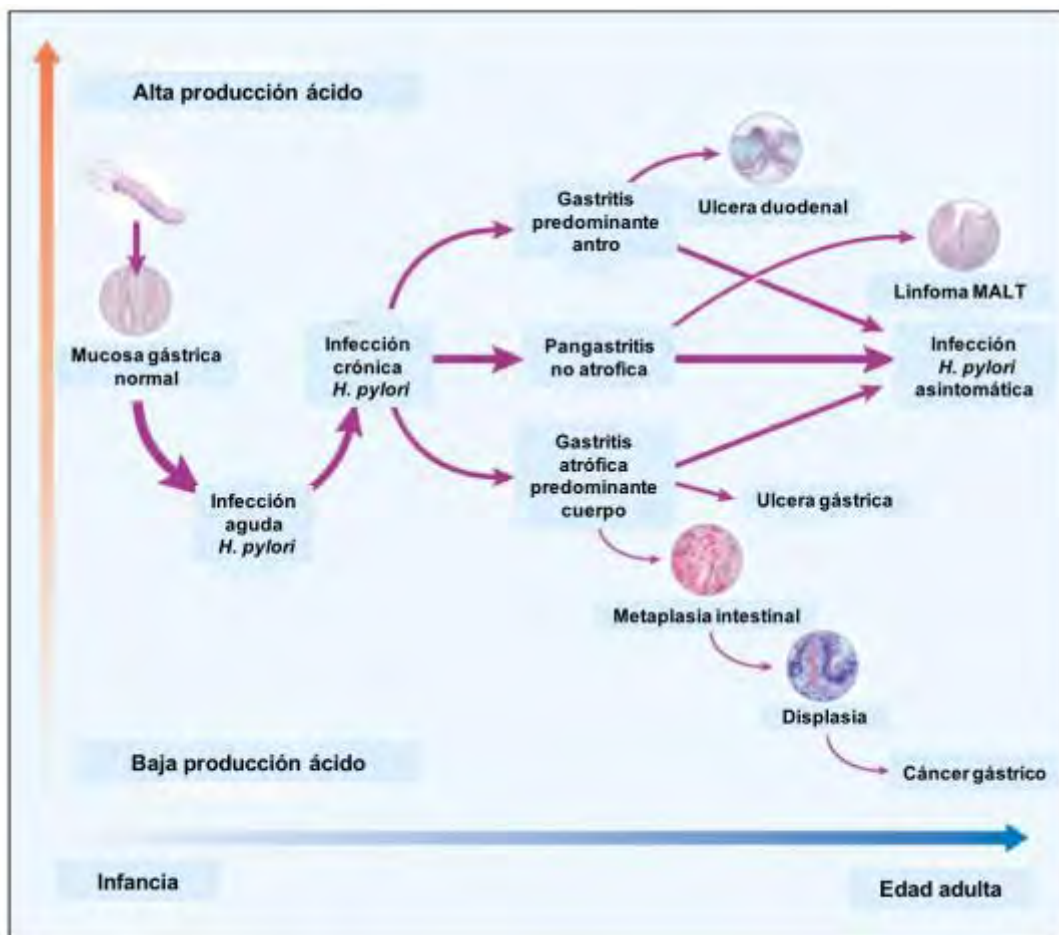


Figura 2. Historia Natural de la infección por *H. pylori* [Adaptado de Ref. 10].

1.4.1. Persistencia de *H. pylori* (factores de virulencia)

H. pylori es un microorganismo perfectamente adaptado a su nicho y tiene la capacidad de persistir en el estómago humano manteniendo una alta concentración bacteriana (10^8 UFC/g tejido) durante décadas. Este grado de adaptación está determinado por una serie de factores tanto de la bacteria como del huésped; entre los factores bacterianos se encuentran la motilidad, capacidad de adherirse a las células epiteliales gástricas y mecanismos de evasión o modulación de la respuesta inmune del huésped, principalmente [5, 7, 8, 10]. Estos factores que le permiten al microorganismo colonizar y persistir en la mucosa gástrica fueron denominados factores de virulencia y los mejor caracterizados se describen a continuación y se ilustran en la Figura 3 [8, 13].

a) Ureasa

La enzima ureasa es un dodecámero formado por seis subunidades de UreA (26.5 kDa) y seis subunidades de UreB (60.3 kDa). La síntesis de esta proteína por la bacteria varía dependiendo de las condiciones de su ambiente y llega a representar hasta el 10% de su contenido de proteína total. La bacteria capta urea a través de un canal de protones, su hidrólisis genera amonio que tiene un efecto amortiguador del pH del citoplasma y periplasma bacteriano generando una capa protectora alrededor de la bacteria. El papel de la ureasa como factor de virulencia radica en el hecho de que cepas mutantes incapaces de producir esta enzima carecen de habilidad para colonizar el nicho gástrico [8, 13, 14].

b) Motilidad

Aunque *H. pylori* sobrevive en condiciones ácidas no es un microorganismo acidófilo por lo que requiere abandonar el lumen gástrico y transportarse hasta la proximidad de las células del epitelio donde el pH es cercano a la neutralidad. *H. pylori* presenta de 5 a 7 flagelos en uno de sus polos, mediante el movimiento tipo sacacorchos impulsado por la actividad de los flagelos, la bacteria atraviesa la capa de moco guiada por factores quimiotácticos como urea y sales [10, 14, 15]. Las bacterias mutantes en la síntesis flagelar son incapaces de colonizar el nicho gástrico. Biopsias gástricas humanas infectadas por la bacteria muestran a *H. pylori* adherido a las células epiteliales, así como en la proximidad de las éstas, específicamente en la capa mucosa más cercana al ápice de las células; manteniendo esta localización, la bacteria se encuentra protegida de su eliminación por la peristalsis y recambio constante de moco [10, 14, 15].

c) Adherencia

Aunque la mayoría de los organismos de *H. pylori* se encuentran libres en la capa de moco que recubre las células epiteliales del estómago, algunos son capaces de adherirse a las células del epitelio. *H. pylori* produce una familia de 32 proteínas conocida como Hop en la cual se agrupan una serie de factores de adherencia, entre los cuales el más estudiado a la fecha es BabA. Se sabe que esta es una proteína que se encuentra en la superficie de la bacteria y que tiene la capacidad de unirse a los antígenos de Lewis B localizados en la superficie de las células epiteliales gástricas. Las cepas capaces de sintetizar dicha adhesina se asocian con un fenotipo más agresivo y un mayor riesgo de causar gastritis y atrofia gástrica en modelo murino. Otra proteína de la bacteria, HpaA, se une a glicoconjugados con ácido siálico. En el genoma de *H. pylori* el gen HP0492 codifica una proteína muy similar a HpaA por lo que tal vez tenga una función relacionada. Adicionalmente, otras proteínas y glicolípidos de la bacteria que promueven la adhesión de *H. pylori* a las células epiteliales gástricas fueron reportadas. La adhesión de la bacteria a las células es esencial para la colonización. El papel de cada una de las moléculas que participan en la adhesión es difícil de conocer de forma independiente, sin embargo, por estudios de microscopía electrónica se observó que al momento de la adhesión participan simultáneamente una gran cantidad de moléculas, por lo que se podría pensar que, aunque la mayoría de estas interacciones son enlaces débiles, el hecho de que existan en gran cantidad favorece la estabilidad de la adherencia [10, 14, 16]. El estudio de las mutantes en genes únicos de adherencia no permite evaluar la contribución de cada elemento debido a las otras múltiples proteínas que participan en la adherencia.

d) Citotoxina vacuolizante (VacA)

La citotoxina vacuolizante VacA es una proteína de 95 kDa producida por *H. pylori* induce la formación de vacuolas en las células epiteliales y su posterior lisis. Es un antígeno inmunodominante e importante factor de virulencia para la bacteria. La secreción de la toxina se lleva a cabo en dos etapas, en la primera, una péptida señal de 37 aminoácidos en el extremo amino dirige el paso del citoplasma al periplasma, posteriormente, un autotransportador de 45 kDa (en el extremo carboxilo) exporta la toxina a través de la membrana externa. Parte de VacA es liberada al medio extracelular, sin embargo, del 40 al 60% de la toxina permanece anclada a la membrana externa. Una vez liberada la toxina se inserta en la membrana de las células epiteliales formando un canal iónico; posteriormente, se forma una vacuola ácida en el interior de la célula y estos

cambios generan rearrreglos en el citoesqueleto e interferencia en las vías endosoma/lisosoma normal en la célula. La vacuolización inducida por VacA tiene diferentes efectos en la fisiología celular contribuyendo a la patogénesis de *H. pylori*. Aunque el gen que codifica para esta citotoxina se encuentra en la mayoría de las cepas, solo se expresa en la mitad de ellas; esto está determinado por variaciones en dos regiones del gen *vacA* nombradas como región media y secuencia señal. Además de la formación de vacuolas, esta citotoxina provoca diferentes eventos tales como la inhibición de la activación de linfocitos T y la estimulación de la polimerización de filamentos de actina alterando la estructura del citoesqueleto de la célula epitelial [10, 14, 17].

e) Isla de patogenicidad *cag* (PAI-*cag*)

Es una región del DNA de *H. pylori* que abarca una longitud aproximada de 40 kb y codifica 31 genes. Esta isla de patogenicidad confiere principalmente dos propiedades a la bacteria, incrementa su probabilidad de transmisión y la transformación de lo que podría ser un microorganismo comensal a una bacteria potencialmente patógena. El papel de PAI-*cag* en la patogenicidad de la bacteria se estudió en gerbos en los cuales las cepas *cag* (-) causaron sólo inflamación moderada mientras que las cepas *cag* (+) causaron patologías de mayor gravedad como inflamación severa, úlceras gástricas y tumores.

Esta región codifica para proteínas que componen un sistema de secreción tipo IV requerido para la translocación de la proteína CagA (codificada por el gen *cagA* localizado en la PAI-*cag*) al interior de la célula huésped. Dentro de la célula, CagA es fosforilada y de esta forma tiene la capacidad de afectar diferentes vías de señalización de la célula y con ello modificar funciones tales como proliferación, apoptosis, liberación de citocinas y movilidad celular [10, 14, 18].

1.4.2. *H. pylori* y Cáncer Gástrico

El cáncer gástrico es la segunda causa de muertes relacionadas con cáncer a nivel mundial; sin embargo, la patogénesis de esta enfermedad permanece desconocida, aunque hasta ahora se sugiere que es un proceso multifactorial y que se presenta en diferentes etapas. Existe una marcada variabilidad geográfica en la prevalencia de este padecimiento siendo el problema más grave en Asia, en países como China y Japón, y en países industrializados como Estados Unidos se presenta uno de los índices más bajos de morbi-mortalidad debido a esta enfermedad [19]. La OMS estima

que en México el cáncer gástrico presenta una incidencia anual del 13.1 en hombres y de 9.5 en mujeres por cada 100,000 habitantes [9].

En 1965 Làuren propuso la clasificación del cáncer gástrico de acuerdo a sus características histopatológicas en dos tipos: intestinal y difuso [7, 20].

En 1994, la agencia internacional de investigación en cáncer (IARC por sus siglas en inglés) clasificó a *H. pylori* como agente carcinogénico tipo I como consecuencia de la evidencia epidemiológica obtenida por diferentes trabajos que mostraron una estrecha asociación entre la infección por este microorganismo y el desarrollo de cáncer gástrico [21].

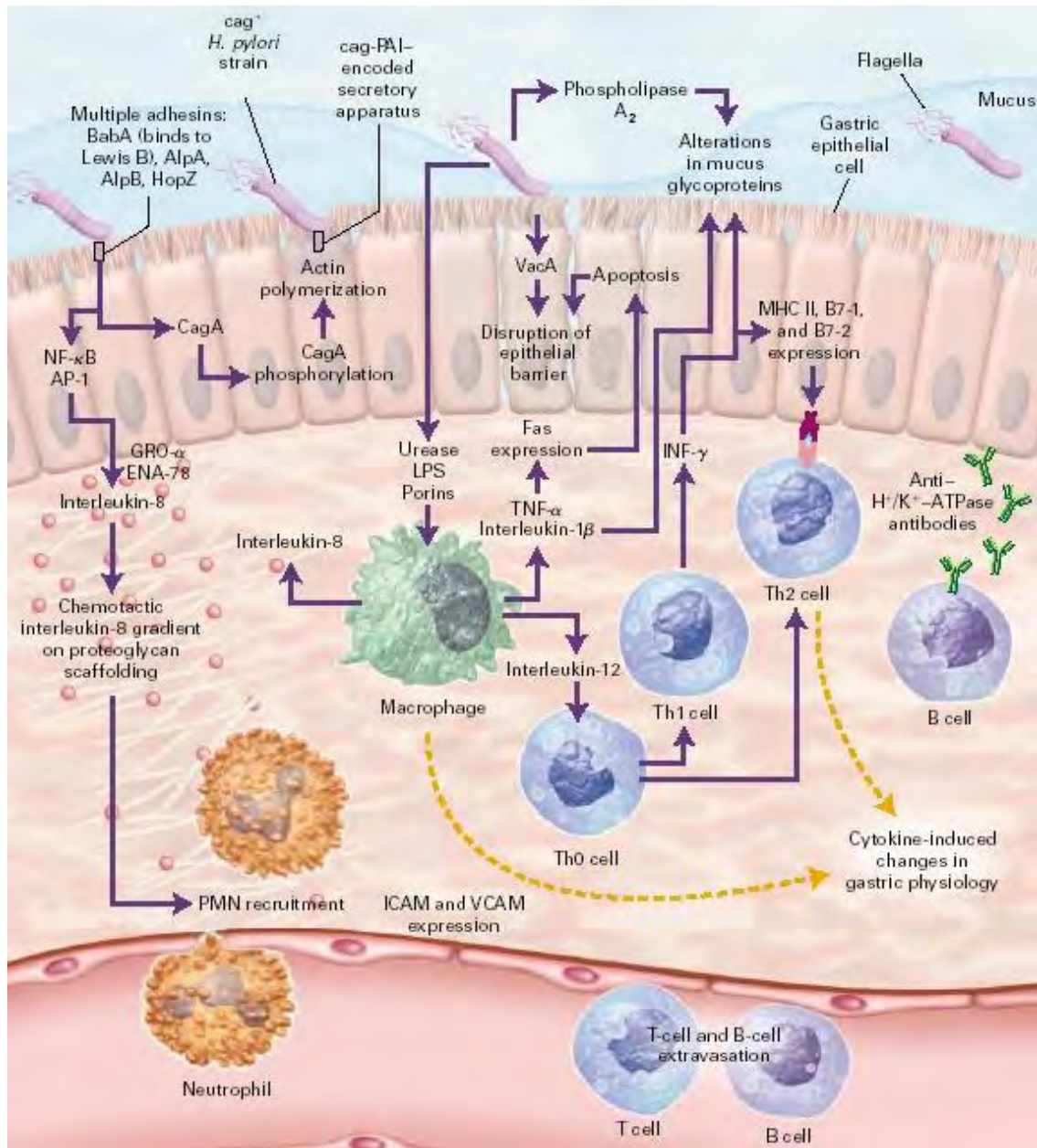


Figura 3. Interacciones huésped-parásito en la patogénesis de *H. pylori* [10].

Howson en 1986 y Parsonnet en 1995, mostraron que existía una correlación entre la disminución del número de infecciones causadas por *H. pylori* y el decremento en la morbilidad y mortalidad debida al adenocarcinoma gástrico en países industrializados. Por otro lado, Nomura y Parsonnet en 1991, en estudios independientes de casos y controles reportaron que existía una asociación positiva entre la seropositividad a *H. pylori* y el desarrollo de adenocarcinoma gástrico incrementándose en 2.1 a 17.6 veces el riesgo de desarrollar dicho padecimiento en comparación

con los sujetos seronegativos [7, 20]. Ekstrom en el 2001, reportó que más del 80% de los pacientes con cáncer gástrico estaban infectados por *H. pylori* o tenían antecedentes de una infección pasada [8, 20].

Estudios en modelos animales, especialmente en el modelo de gerbo, mostraron que la infección prolongada por *H. pylori* tiene la capacidad de provocar el desarrollo de cáncer gástrico en presencia y en ausencia de otro tipo de carcinógenos [20].

Aunque existe una clara asociación epidemiológica entre la infección por *H. pylori* y el desarrollo de cáncer gástrico, aún no se conoce el mecanismo de patogenicidad implicado en dicho evento. Sin embargo, el desarrollo del cáncer gástrico es un proceso multifactorial y que depende tanto de los factores de la bacteria como los del huésped, además de las condiciones ambientales. Se propone que *H. pylori* podría contribuir o ser agente causal del proceso neoplásico mediante dos mecanismos; ya sea que la bacteria tenga la capacidad de sintetizar o de modificar compuestos que adquieran capacidad carcinogénica o bien que la bacteria no posea un efecto carcinogénico *per se*, pero la infección por ella produce un cuadro de inflamación crónica que eventualmente lleva a atrofia gástrica y metaplasia intestinal como lesiones precursoras del cáncer gástrico [20].

Candidatos propuestos para la inducción de cáncer incluyen factores propios de la bacteria como son sus factores de virulencia, componentes de la respuesta inmune del huésped, factores de la dieta, respuestas hormonales y disminución de la secreción de ácido debido a la sobrepoblación bacteriana. En realidad, se sugiere que todos estos factores interactúan para alterar las vías de señalización del huésped; en especial, el equilibrio entre las vías de apoptosis y/o proliferación celular promoviendo la adquisición y mantenimiento de mutaciones genéticas que llevan al desarrollo neoplásico [10, 20].

1.4.3. Patogénesis Molecular de *H. pylori* en Cáncer Gástrico

El mecanismo de patogenicidad de *H. pylori* en el desarrollo y/o progresión del cáncer gástrico es ampliamente estudiado. Los efectos de la infección por *H. pylori* son diversos, abarcando un amplio espectro de posibles consecuencias; entre éstos se encuentran los efectos del proceso

inflamatorio resultante de la infección, efectos tóxicos sobre las células del epitelio gástrico debidos a la bacteria o productos de ella, alteración en el balance apoptosis/proliferación celular, modificaciones en las vías de transducción de señales y expresión génica en las células huésped, incremento del estrés oxidativo ante la infección por *H. pylori*, alteraciones en los mecanismos de reparación del DNA y alteraciones en moléculas de adhesión celular en las células del epitelio principalmente. Muchos de estos mecanismos fueron evaluados *in vitro* e *in vivo* y se tienen evidencias de la participación de la infección por *H. pylori* en cada uno de ellos [20].

Se sabe que la infección por *H. pylori* induce un importante proceso inflamatorio; por la activación de las células inflamatorias responsables de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan daño al DNA y por lo tanto la acumulación de mutaciones, que, junto con la inactivación de genes supresores de tumores, desencadenan un proceso de inmortalización celular. Además, el proceso inflamatorio desencadena una alteración del equilibrio apoptosis/proliferación celular debido al alto recambio de células epiteliales gástricas [7, 19, 20].

En cuanto al daño directo por la bacteria o por productos de la misma se describió que VacA tiene la capacidad de inducir la formación de vacuolas en las células epiteliales gástricas y la posterior destrucción de las mismas; este fenómeno estimula la proliferación celular para compensar la pérdida del epitelio y ésta sobre proliferación provoca la acumulación de mutaciones en el DNA. Además, en estudios *in vitro* de la infección por *H. pylori* se observó la afectación de las células secretoras de mucina por medio de la fosfolipasa A, y de esta forma debilitar la capa de moco que recubre el epitelio gástrico con la consecuente exposición del epitelio a las agresiones del lumen gástrico [7, 20].

En tejido gástrico normal, la presencia de células apoptóticas es escasa y se presenta preferentemente a nivel superficial; sin embargo, cuando existe infección por *H. pylori* se detecta la presencia de numerosas células en apoptosis a lo largo de las glándulas gástricas y además después de la erradicación del microorganismo existe una disminución de este número de células en apoptosis. En estudios *in vitro* se describió que la presencia de cepas CagA⁺ tienen la capacidad de incrementar la proliferación celular cuando se comparan con cepas CagA⁻. Como resultado del alto recambio celular debido a la infección por *H. pylori*, la capa de células epiteliales gástricas se

ve expuesta a una mayor tasa de proliferación celular que lleva a una acumulación de mutaciones y consecuentemente al desarrollo de cáncer [20].

1.5. Alteraciones genéticas en cáncer gástrico

Debido a que el desarrollo de cáncer gástrico es un proceso multifactorial y se presenta en etapas, se propone que una acumulación de mutaciones lleve al desarrollo de esta patología. Las principales alteraciones estudiadas en este tipo de neoplasia se presentan en genes supresores de tumores, oncogenes, activación de la telomerasa e inestabilidad cromosómica y moléculas de adhesión celular [7, 20].

a) Genes supresores de tumores

Existe una gran cantidad de agentes que incrementan la frecuencia de transformación celular; dichos agentes son nombrados como carcinogénicos. Los agentes carcinogénicos causan cambios epigenéticos o alteran el genotipo de la célula y existen dos clases de genes en los cuales estas alteraciones causan transformación celular: oncogenes y genes supresores de tumores [20].

La pérdida de la actividad de los productos de los genes supresores de tumores es un evento clave en muchos tipos de cáncer humano, incluyendo el carcinoma gástrico y aunque una gran cantidad de estos genes tales como *p53*, *pRb* y *APC* fueron estudiados, el mecanismo o la vía en la que contribuyen al desarrollo o progresión del cáncer gástrico aún se desconoce a detalle.

Uno de los genes supresores de tumores mejor caracterizado en diferentes tipos de cáncer humano es *p53*; dicho gen codifica para una proteína nuclear que tiene la función de unirse al DNA para funcionar como factor transcripcional de diferentes genes necesarios para inhibir a las cinasas dependientes de ciclinas e inducir arresto celular en la fase G1 del ciclo celular; responde a diferentes estímulos de la célula, en especial a condiciones de estrés tales como daño al DNA, hipoxia, señales hiperproliferativas y ausencia de factores de crecimiento. De tal forma *p53* inhibe la proliferación celular mediante la inducción de apoptosis, arresto en la fase G1 o inducción de senescencia celular, por lo que mutantes en *p53* podrían relacionarse con una desregulación del ciclo celular [20, 22, 23]. Debido a que en más de la mitad de los cánceres en humanos existen

mutaciones en el gen de *p53*, se cree que juega un papel muy importante en la prevención del desarrollo de cáncer [20].

La expresión del gen *p53* fue estudiada principalmente por ensayos inmunohistoquímicos y el tipo de mutaciones que sufre éste en diferentes tipos de cáncer gástrico. La pérdida de la función de la proteína *p53* se puede deber a diferentes factores tales como la presencia de mutaciones, deleciones de ambos alelos y polimorfismos genéticos. Sin embargo, los diferentes trabajos enfocados al estudio de mutaciones o expresión proteica originaron resultados muy variables; en cáncer gástrico las mutaciones en este gen ocurren en el 40 al 70% de los cánceres gástricos humanos, pero la sobreexpresión se presenta en un 17 a 90% de tumores invasivos ya sean de tipo intestinal o difuso [23]. Esta variabilidad en cuanto al grado de expresión de *p53* y sus mutaciones dificultan la utilidad de este gen supresor de tumores como marcador diagnóstico o pronóstico del cáncer gástrico.

b) Oncogenes

En un inicio los oncogenes fueron identificados como genes transportados por virus que causan transformación de las células blanco. Los principales tipos de oncogenes virales tienen homólogos celulares que están implicados en funciones normales de la célula los cuales son denominados como protooncogenes, y en ciertos casos la mutación o activación aberrante de los mismos se asocia con el desarrollo del tumor [24].

Diferentes productos de oncogenes implicados en el desarrollo del cáncer gástrico tales como *k-Ras*, *c-Met*, *c-erbB-2* y *k-Sam* y uno de los mejor caracterizados es *c-Myc* se estudiaron [20].

Los genes de la familia *myc* son genes reguladores clave en la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular, y su desregulación contribuye a la generación de diferentes tipos de tumores humanos. Los controles fisiológicos que regulan la transcripción de los genes *myc* se encuentran alterados en la mayoría de los cánceres humanos, en los cuales los niveles de expresión del RNAm de *myc* son elevados [25]. Sin embargo, la desregulación de la expresión de estos genes no es suficiente para causar la transformación celular ya sea en ratones o en humanos lo que implica que se requieren mutaciones adicionales para la transformación celular. *Myc* coopera con

oncogenes que funcionan por otras vías para dar como resultado la transformación celular y tumorigénesis [25].

c-Myc es una fosfoproteína que funciona como factor transcripcional estimulando tanto la progresión del ciclo celular como la apoptosis. c-Myc juega un papel fundamental en la progresión normal del ciclo celular, especialmente en la transición de G0 a S. c-Myc puede ejercer su efecto sobre la progresión del ciclo celular por la activación de la transcripción de genes promotores del ciclo celular tales como *cdc25A*, *cdk4*, *cdk1*, *cdk2*, *E2F*, *ciclinas D1*, *D2*, *E* y *A*, así como de reprimir la expresión de genes implicados en el arresto del ciclo celular tales como *gas1*, *p15*, *p21*, *p27* y genes de la familia *gadd* (*gadd45*, *gadd143*) [26-29].

Actualmente, se proponen dos mecanismos mediante los cuales c-Myc tiene la capacidad de reprimir la transcripción de genes implicados en arresto celular [26].

1) Represión dependiente de secuencia iniciadora de la transcripción (*Inr*)

La secuencia *Inr* es una secuencia consenso débil que se encuentra en algunos promotores; c-Myc forma complejos con la proteína Max y el complejo Myc/Max se une a las regiones *Inr* impidiendo la transcripción mediada por el factor transcripcional Miz-1. (Figura 4). Mediante este mecanismo c-Myc inhibe la transcripción de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKIs) p15 y p27 permitiendo de esta manera la progresión del ciclo celular.

2) Mecanismo *Inr* independiente

En este tipo de represión no se requieren secuencias *Inr* en los promotores de los genes blanco, y se propone que mediante este mecanismo c-Myc impide la transcripción de los CKI p15 y p21. En este mecanismo se requieren factores accesorios para la formación de un complejo proteico integrado por Smad (2, 3 o 4), el factor transcripcional Sp1 y c-Myc; este complejo se une al promotor impidiendo la transcripción normalmente mediada por Sp1. (Figura 4).

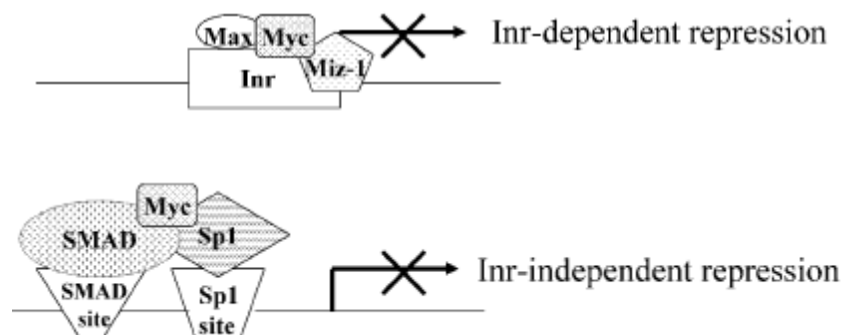


Figura 4. Mecanismos de represión transcripcional por c-Myc [26].

En cáncer gástrico se detectó la expresión del RNAm de *c-myc* en el 20 al 50% de los pacientes con este padecimiento; Sehwan y cols en 1999, evaluaron la expresión de la proteína c-Myc en tejido proveniente de cáncer gástrico encontrando sobreexpresión en el 47.4% de las muestras, además reportaron que la expresión de esta proteína fue más frecuente en cáncer pobremente diferenciado. En este estudio se asocia la sobreexpresión de c-Myc con incremento en la actividad proliferativa y pronóstico pobre [30].

En el 2001, An Gao Xu y cols., reportaron que la expresión de las proteínas Bcl-2 y c-Myc se incrementaron de forma progresiva a la gravedad de la patología desde gastritis activa crónica, úlcera gástrica y cáncer gástrico temprano y progresivo. La expresión de p53 se detectó solamente en cáncer gástrico. La expresión de c-Myc y p53 fue significativamente mayor en cáncer gástrico de tipo intestinal en comparación con el tipo difuso. En cáncer gástrico temprano se detectó un 50% de expresión de c-Myc y en cáncer gástrico tardío la expresión fue del 63.3% [31].

La expresión de c-Myc fue relacionada en asociación a la infección por *H. pylori* en cáncer gástrico, Gui-Fang Yang y cols., reportaron en el año 2004, que probablemente existen diferencias entre los mecanismos moleculares que originan el cáncer gástrico de tipo intestinal y el tipo difuso; en este trabajo se encontró una fuerte asociación entre el cáncer gástrico de tipo intestinal y la sobreexpresión de c-Myc, ciclina D1 y Bcl-x1 a través de la activación de NF-kB activado por la infección con *H. pylori* CagA+ [32].

c) Reactivación de la telomerasa

La telomerasa es una ribonucleoproteína conformada por una subunidad catalítica que actúa como una transcriptasa reversa conocida en el humano como hTERT y una secuencia de RNA (hTR) que utiliza como templado para la síntesis de las repeticiones teloméricas en los extremos cromosómicos [33-36]. Los telómeros son estructuras ribonucleoprotéicas que se encuentran en los extremos de los cromosomas eucariotes y están formados por repeticiones de hexanucleótidos ricos en guanina y en los mamíferos tiene la secuencia TTAGGG. Actualmente, se sabe que la longitud de los telómeros varía dependiendo de la edad, teniendo una longitud aproximada de 15 kb al nacimiento hasta menos de 5 kb en edad avanzada, en ratones la longitud telomérica es mayor y se encuentra en un rango de 25 a 40 kb. Existen diferentes proteínas capaces de reconocer estas repeticiones nucleotídicas para asociarse a los telómeros; dichas proteínas son de gran importancia para la protección de los telómeros. El extremo de los telómeros que abarca 150 a 200 nt de DNA de cadena sencilla forma una estructura de asa debido a la interacción con estas diferentes proteínas y se piensa que esta estructura en especial es la implicada en la protección de los extremos cromosómicos [37, 38].

Los telómeros son estructuras muy importantes en el proceso de proliferación celular debido a que mantienen la estabilidad cromosomal y conforme estas estructuras se van acortando la célula va deteniendo el proceso de división celular para evitar recombinaciones entre cromosomas que causen daños o alteraciones en el DNA, en dicho caso la célula entra en senescencia celular [38]. Existen diferentes vías en las que se relacionan los telómeros y proteínas como p53 en los procesos de senescencia, apoptosis y cáncer gástrico. De forma general, se sabe que el acortamiento progresivo de los telómeros provoca que se alcance un nivel crítico en el cual los telómeros pierden su funcionalidad en la protección de los cromosomas; la célula detecta esta disfuncionalidad como un daño al DNA y por lo tanto se activan mecanismos de control como la expresión de p53 que induce tres eventos; arresto celular en la fase G1, apoptosis y senescencia celular, aunque aún no se conocen a detalle los factores determinantes de estos procesos [39]. Cuando los telómeros se acortan hasta una fase de mortalidad 1 (M1), las células tendrían que entrar a senescencia celular, pero en ausencia de los puntos de control como p53 o pRb, la célula evita o evade la senescencia y continúa su replicación hasta llegar a un punto crítico en el que se presenta la fusión de cromosomas por los extremos desprotegidos y la generación de cromosomas dicéntricos o

mutaciones que afecten de forma determinante la función celular en la etapa de mortalidad 2 (M2); si en este punto se reactiva la enzima telomerasa se lleva a la immortalización celular como consecuencia del mantenimiento de los telómeros en cada división celular (Figura 5) [38, 39].

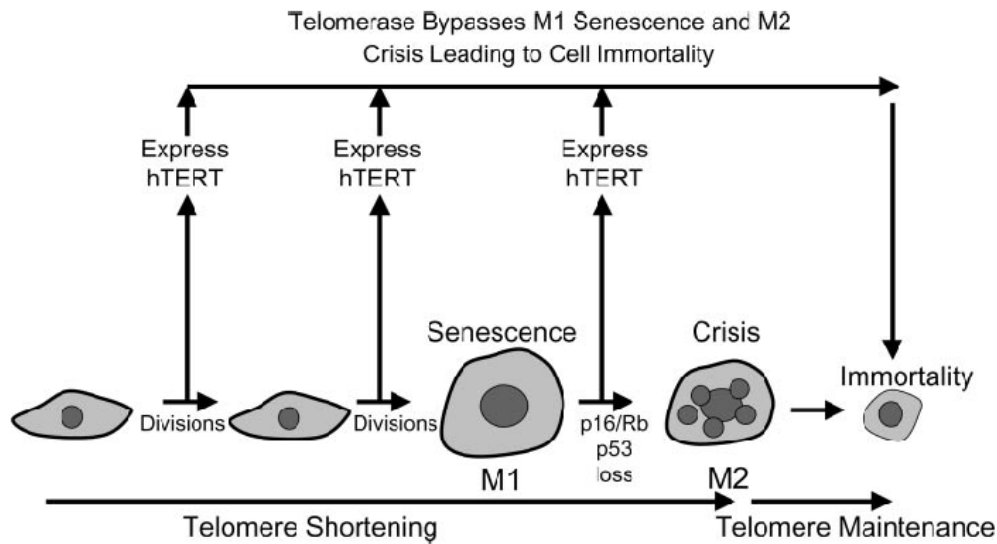


Figura 5. La expresión de hTERT resulta en la immortalización de células humanas [38].

Diferentes estudios mostraron que la telomerasa se encuentra inactiva en la mayoría de las células somáticas adultas, sin embargo, se detecta cierta actividad en células pertenecientes a tejidos que sufren alto recambio o en células de líneas germinales. Es de gran importancia mencionar que la detección de actividad de telomerasa es del 80 al 100% de tejidos provenientes de diferentes tipos de cánceres [40].

En cáncer gástrico se realizaron diferentes estudios para determinar la actividad y/o expresión de telomerasa; Hiyama y cols., En 1998, evaluaron la expresión *in situ* de hTR y expresión de telomerasa en cáncer gástrico y lesiones precancerosas y encontraron que la expresión de hTR se incrementa en etapas tempranas de la carcinogénesis; sin embargo, no encontraron correlación entre la expresión de hTR y la actividad de telomerasa; en este estudio se reporta un 87% de positividad en la actividad de telomerasa [41]. Por su parte, Yasui y cols., en el mismo año evaluaron la expresión de hTR y RNAm de *htert* además de determinar la actividad de la enzima

en carcinomas gástricos humanos. Reportaron 90% de positividad a la expresión de hTERT y la actividad de telomerasa encontrando una correlación del 100% entre estos dos parámetros; sin embargo, encontraron 75% de positividad a la expresión de hTR por lo que concluyen que la expresión del RNAm de hTERT es un parámetro que correlaciona directamente con la actividad de telomerasa y sugieren este parámetro como posible herramienta diagnóstica [42].

Estudios similares, reportan entre un 85 y 90% de positividad de telomerasa en cáncer gástrico lo que sugiere su utilidad como posible herramienta diagnóstica o pronóstica para cáncer gástrico [43, 44].

Diferentes estudios trataron de asociar la actividad de telomerasa con la infección por *H. pylori* para el desarrollo de cáncer gástrico; Kameshima y cols., en 2000, estudiaron dicha asociación en tejido canceroso y mucosa normal; encontraron que la actividad de telomerasa fue mayor en metaplasia intestinal de pacientes *H. pylori*+ en comparación con *H. pylori*- y sugieren que la infección por *H. pylori* influencia en la actividad de la telomerasa en tejidos gástricos con cáncer y no cancerosos [45]. En el mismo año, Kwon y cols., evalúan la sobreexpresión de hTR en biopsias provenientes de mucosa gástrica infectada por *H. pylori*, encuentran que la sobreexpresión de hTR se incrementaba de forma paralela al grado de infección por este microorganismo sugiriendo la participación del mismo en la expresión del RNA de la telomerasa en eventos tempranos que pudieran llevar al desarrollo de cáncer gástrico [46].

Por su parte, Chung y cols., en 2002, evaluaron la posible relación entre la infección por *H. pylori* y la expresión de telomerasa en muestras provenientes de tejido con metaplasia intestinal y los efectos de la erradicación del microorganismo, 79.1% de los pacientes fueron *H. pylori*+, la expresión de telomerasa se encontró en 18.6% de los pacientes; posterior a la erradicación del microorganismo se observó recuperación tisular en el grado de la metaplasia intestinal y la expresión de telomerasa disminuyó significativamente; estos resultados sugieren la asociación entre la expresión de telomerasa y la infección por *H. pylori* en tejido con metaplasia intestinal [47].

Shao y cols., en 2003, estudiaron la relación existente entre la expresión del RNAm de *htert*, la actividad de telomerasa y los reguladores del ciclo celular y su posible significancia clínica en

cáncer gástrico, encontrando una correlación entre la actividad de telomerasa, la expresión de RNAm de *htert* y la expresión de p53; sin embargo, con estos marcadores no fue posible encontrar una asociación con otros parámetros clínico patológicos [48]. Zhang y cols., en 2004, evalúan el incremento de la actividad de telomerasa y la expresión de *c-myc* en biopsias provenientes de tejido gástrico con metaplasia intestinal y cáncer gástrico de forma asociada a la infección por *H. pylori*; reportaron que tanto la expresión de telomerasa como la de *c-myc* fue significativamente mayor en metaplasia intestinal de sujetos *H. pylori* + en comparación con los controles no infectados; sus resultados sugieren un incremento coordinado en la actividad de telomerasa y la expresión de *c-myc* en cáncer gástrico y metaplasia intestinal en la infección por *H. pylori* [49].

d) Regulación de la expresión de Telomerasa

El estudio de los mecanismos que regulan la expresión y actividad de la telomerasa puede contribuir a factores diagnósticos, pronósticos o con utilidad para el tratamiento en cáncer gástrico; con el objetivo de mejorar los conocimientos a este respecto se estudiaron los mecanismos involucrados en la modulación epigenética en la actividad de la telomerasa. El control transcripcional del gen que codifica para la subunidad catalítica de la telomerasa es clave en la regulación de la actividad de esta enzima y analizando la secuencia reguladora en el extremo 5' de este gen muestra que tiene diferentes sitios de unión para factores transcripcionales, entre los que se encuentran c-Myc y Sp1 [50].

El análisis del gen *htert* muestra 29 secuencias correspondientes a cajas E (E boxes) en el promotor y 9 en el intrón 2; dichas secuencias podrían ser blanco de la unión de c-Myc [51].

En células humanas normales c-Myc induce la actividad de telomerasa en niveles similares a los observados en líneas celulares tumorales por lo que se sugiere que una alteración en la expresión de c-Myc podría contribuir a la actividad de telomerasa en células tumorales [51].

De igual manera al caso de c-Myc se determinó que en la región 5' del gen de *htert* existen cinco sitios de unión al factor transcripcional Sp1 en los cuales podría funcionar como activador de la expresión de este gen [50].

El factor transcripcional Sp1 es el representante de una familia de factores transcripcionales que reconocen secuencias ricas en GC en las regiones promotoras de una gran cantidad de genes [52], entre los cuales se encuentra el CKI p21 [53].

Recientemente, se ha propuesto que otro punto de control del ciclo celular en el paso de G2 a M mediado por p53 requiere de la presencia de Sp1 para reprimir la transcripción de ciclina B1 [54]. Estos hallazgos sugieren que la función activadora del factor transcripcional Sp1 pudiera verse modificada de forma opuesta como respuesta a diferentes estímulos para provocar la represión transcripcional de diferentes genes.

Diferentes trabajos estudiaron la asociación de este factor transcripcional con el desarrollo de cáncer gástrico; Zhang y cols., en un estudio del 2005, muestra un 53.9% de positividad a Sp1 en cáncer gástrico en comparación con 12.5% de mucosa normal, reportando, además, que el grado de expresión de esta proteína se correlacionó de forma inversa con el tiempo de supervivencia de los pacientes. También se demostró que Sp1 afecta la biología del cáncer gástrico induciendo la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG) en muestras de cáncer gástrico en las cuales se mostró una correlación entre la expresión de VEFG y Sp1 [55].

2. Justificación

Diversos estudios evaluaron diferentes marcadores moleculares de forma individual para determinar la asociación de *H. pylori* y cáncer gástrico; sin embargo, estos no demostraron ser de gran utilidad como herramientas diagnósticas y/o pronósticas; por lo que en el presente estudio proponemos el uso de marcadores en forma conjunta tales como: expresión de telomerasa, *c-myc* y *sp1*; los cuales podrían ser de mayor utilidad para este fin.

3. Hipótesis

- La expresión de *c-myc*, *sp1* y *htert* en tejido gástrico se incrementará de acuerdo al incremento de la carga bacteriana.
- La expresión de *c-myc*, *sp1* y *htert* en tejido gástrico será mayor en sujetos con cáncer gástrico con respecto a patologías precursoras.

4. Objetivo General

Determinar la expresión de *htert*, *sp1* y *c-myc* en biopsias gástricas de pacientes con cáncer gástrico, úlcera péptica y gastritis infectados con *Helicobacter pylori*.

5. Objetivos particulares

- Determinar la presencia de *Helicobacter pylori* en biopsias de pacientes con cáncer gástrico, úlcera péptica y gastritis por PCR tiempo real.
- Determinar la expresión de *htert*, *sp1* y *c-myc* en biopsias de pacientes con cáncer gástrico, úlcera péptica y gastritis infectados con *H. pylori* por RT PCR tiempo real.
- Determinar la correlación de la expresión de *htert*, *sp1* y *c-myc* en biopsias de pacientes con cáncer gástrico y la infección con *H. pylori*.

6. Metodología

6.1. Iniciadores y sondas TaqMan para la cuantificación de la expresión de los genes *c-myc*, *sp1* y *htert*

Los iniciadores y sondas TaqMan para la cuantificación de la expresión de los genes *c-myc*, *sp1* y *htert* fueron obtenidos de Applied Biosystems (Gene TaqMan Expresión Assays) correspondientes a los números de identificación Hs00905030_m1, Hs00916518_m1 y Hs99999022_m1, respectivamente. El control endógeno utilizado fue el gen ribosomal *18S* (Applied Biosystems, Human RPLP TaqMan Endogenous Control, 4333761F).

6.2. Iniciadores y sondas Taqman para la cuantificación de *H. pylori*

Los iniciadores y sondas TaqMan para la cuantificación de *H. pylori* fueron diseñados para amplificar una región de 102 pb del gen *ureB*, las secuencias sintetizadas fueron las siguientes:

Forward: 5'-TGCCACCACTTGGATAAAAGC-3'.

Reverse: 5'-TCCCCATGTCATGCAAAGTGT-3'.

Sonda TaqMan: 5'-TGATTCAAGGATCCGCC-3'.

De igual forma se diseñaron iniciadores y sonda para amplificar una región de 129 pb del gen *flaA*.

Forward: 5'-CTCGTAAAGCGATTCAATCTGACAT-3'.

Reverse: 5'-GCCCTACTTGGAATTCTTTGTT-3'.

Sonda TaqMan: 5'-TTCGTTTGATTCAAGGTTT-3'.

El diseño de estas secuencias se realizó con el programa Primer Express v 2.0. Las sondas se marcaron con 5-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5' y una molécula no fluorescente en el extremo 3' (Non fluorescent quencher NFQ) (Applied Biosystems, Custom Taqman Assays). Para la cuantificación de *H. pylori* en las biopsias gástricas se utilizaron los iniciadores para *ureB* debido a la sensibilidad incrementada con respecto a los diseñados para *flaA*.

6.3. Cepas bacterianas y líneas celulares

La cepa de *H. pylori* 26695 (ATCC 700392) se utilizó y fue cultivada en medio *Haemophilus* Test Medium (HTM), suplementado con 8% de suero de caballo, durante 48 hrs en condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂), posteriormente, la cepa fue cosechada en solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM (TE) y almacenada a -20°C para posterior extracción de DNA.

Para la determinación de especificidad de los iniciadores y sonda TaqMan diseñados para la detección de *H. pylori*, se utilizaron las siguientes cepas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Proteus mirabilis* (aislamiento clínico, HIM 68), *Pseudomonas aeruginosa* (aislamiento clínico), *Enterobacter cloacae* (aislamiento clínico, HIM5), *Citrobacter freundii* (aislamiento clínico, INER 74), *Klebsiella oxytoca* (ATCC 700324), *Klebsiella pneumoniae* (aislamiento clínico, HIM65), *Proteus vulgaris* (aislamiento clínico, HIM255), *Enterobacter cloacae* (aislamiento clínico, HIM5), *Campylobacter jejuni* (aislamiento clínico). Las cepas correspondientes a aislamientos clínicos fueron identificadas bioquímicamente utilizando el equipo semiautomatizado MicroScan (Dade Behring). Las cepas fueron cultivadas en gelosa sangre de carnero (GSC) a 37°C durante 24 hrs, posteriormente, se cosecharon en solución amortiguadora TE y se almacenaron a -20°C para su posterior extracción de DNA.

La línea celular de adenocarcinoma gástrico AGS (ATCC CRL-1739) fue cultivada en medio RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) a 37°C hasta un 80% de confluencia y posteriormente la monocapa fue empleada para la obtención de RNA total con el reactivo TRIzol de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

6.4. Extracción de RNA y DNA a partir de biopsias gástricas humanas

La extracción simultánea de RNA y DNA se realizó con el reactivo TRIzol conforme las instrucciones del fabricante con mínimas modificaciones. Las biopsias fueron homogeneizadas en 1 mL de TRIzol utilizando un mortero de vidrio, las incubaciones se realizaron a 4°C y la precipitación del RNA se realizó con 1 volumen de isopropanol (SIGMA), 1/10 de volumen de

acetato de sodio 3M y 1 µg/mL de glicógeno durante 20 minutos a -20°C, posteriormente, se realizó un proceso de purificación al RNA obtenido utilizando el kit Total RNA Safe kit (BIO 101) siguiendo las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones, se partió de un volumen de 20 µL del RNA total extraído con Trizol, se agregaron 400 µL de la solución 1 y 100 µL de la solución 2, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, se recuperaron aproximadamente 450 µL del sobrenadante y se precipitó el RNA con un volumen de isopropanol durante 2 min a temperatura ambiente, se centrifugó durante 5 min a 14,000 rpm para recuperar el botón de RNA y se resuspendió en 100 µL de la solución 3 incubando 5 min a TA, posteriormente, se resuspendió la matriz de la suspensión 4 agitando en córtex y se adicionaron 20 µL de la resina a la solución de RNA, se agitó en vortex por 10 seg y se centrifugó para separar la resina, el sobrenadante obtenido se almacenó a -20°C.

El DNA de las biopsias se extrajo siguiendo las instrucciones del fabricante (Trizol Invitrogen) sin modificaciones. Los ácidos nucleicos obtenidos fueron cuantificados por espectrofotometría (Nanodrop 1000, ThermoSpectronic, BioMate) a 260 y 280 nm.

6.5. Extracción de DNA bacteriano

La extracción de DNA proveniente de las cepas bacterianas mencionadas se realizó con la técnica reportada por Cheng, 2006 [56], brevemente, se tomaron 200 µL de las suspensiones bacterianas y se lavaron en dos ocasiones con TE, se resuspendió el paquete celular en 200 µL de TE, se agregaron 100 µL de fenol (Sigma) y se mezcló en vortex durante 1 min para favorecer la lisis bacteriana; posteriormente, se centrifugó el lisado y se recuperó el sobrenadante. Se realizó una extracción fenol-cloroformo, la fase acuosa se trató con RNAsa (50 µg) durante 10 min a 37°C, se eliminó la enzima con una extracción con cloroformo y finalmente el DNA se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 1 décimo de volumen de acetato de amonio 7.5 M durante 2 hrs a -20°C. El DNA se lavó en dos ocasiones con etanol al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas. Se evaluó la integridad del DNA obtenido por electroforesis en agarosa al 1% y se realizó la cuantificación espectrofotométrica (Nanodrop 1000, ThermoSpetronic, BioMate).

6.6. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

La síntesis de cDNA a partir de RNA total se realizó empleando la enzima Superscript II (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante; brevemente, en un tubo eppendorf estéril se llevó a cabo la reacción a un volumen final de 20 μ L mediante la adición de 10 μ L de agua para PCR (SIGMA), 1 μ L de dNTP's (Roche) 10 mM, 1 μ L de hexanucleótidos (Roche) 10 mM y 1 μ L de RNA total (1 μ g); dicha mezcla se calentó durante 5 minutos a 65°C y posteriormente, se colocó en hielo durante 2 minutos, se adicionaron 4 μ L del amortiguador de la enzima 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂) y 2 μ L de DTT 0.1M, el tubo se incubó 2 minutos a temperatura ambiente (TA) y posteriormente, se adicionó 1 μ L de la enzima Superscript II (200 U), los componentes fueron incubados durante 10 minutos a TA y posteriormente, durante 50 min a 42°C. La reacción se detuvo calentando a 70°C durante 15 minutos.

6.7. Controles para la cuantificación de *H. pylori* por PCR tiempo real

Para evaluar el número de genomas bacterianos presentes en las biopsias gástricas se crearon controles para la amplificación, se clonaron los productos de PCR de los fragmentos correspondientes a *flaA* (129 pb) y *ureB* (102 pb) en el vector TOPO TA cloning (Invitrogen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

Las células competentes utilizadas fueron preparadas de forma química con el siguiente método, se inocularon 3 mL de caldo Luria con 100 μ L de la suspensión de la cepa *E. coli* DH5 α , se incubaron las bacterias en agitación a 37°C durante 18 hrs, pasado este tiempo se tomaron 500 μ L del cultivo anterior y se inoculó un matraz con 250 mL de caldo Luria, se incubó el cultivo aproximadamente 2 hrs a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.6 a 600 nm. Una vez alcanzada esta DO, se realizó la cosecha del cultivo y se resuspendió en 11 mL de la solución RF1 (2.4 g de RbCl, 0.30 g de CaCl₂, 1.98 g de MnCl, 30 mL de Glicerol y 6 mL de Acetato de potasio 1M a un volumen final de 200 mL), se incubó la suspensión en hielo durante 15 min, pasado este tiempo se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 2.6 mL de la solución RF2 (0.24 g de RbCl, 2.2 g de CaCl₂, 30 mL de glicerol, 4 mL MOPS 0.5 M y 30 mL de glicerol a un

volumen final de 200 μ L). Las células fueron distribuidas en tubos de microcentrífuga estériles de 1.5 mL en alícuotas de 200 μ L y fueron congeladas en nitrógeno y almacenadas a -70°C , hasta su uso.

Los amplicones se generaron en un PCR de punto final utilizando los iniciadores forward y reverse diseñados para los genes *ureB* y *flaA* de *Helicobacter pylori* y utilizando como DNA templado el proveniente de la cepa tipo de *H. pylori* 26695. Para la clonación se preparó una reacción con 2 μ L del vector y 4 μ L del producto de PCR, incubando durante 5 min a TA. Para la transformación se utilizaron células competentes de la cepa *E. coli* DH5 α preparadas con cloruro de rubidio como se mencionó anteriormente, se utilizaron 5 μ L de la mezcla anterior y 200 μ L de las células competentes, se incubó la mezcla en hielo durante 30 minutos pasado este tiempo se incubaron las células a 42°C durante 2 min y nuevamente 5 min en hielo; posteriormente, se agregaron 250 μ L de caldo luria y se incubaron las células durante 1 hr a 37°C en agitación suave, pasado este tiempo se transfirieron 100 μ L de la suspensión bacteriana a una placa de agar luria suplementado con X-gal (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), IPTG (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), las placas se incubaron toda la noche a 37°C ; pasado el tiempo de incubación se seleccionaron 10 colonias blancas y se inocularon en 5 mL de caldo Luria con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se incubaron durante 24 hrs. a 37°C y finalmente se confirmó la presencia del inserto en las clonas seleccionadas por PCR de punto final con los iniciadores específicos para *ureB* y *flaA* y electroforesis en agarosa al 2%. Una vez determinada la presencia del inserto en las cepas, se realizó una extracción del plásmido y la secuenciación del fragmento clonado con los iniciadores M13 forward y reverse. Las cepas transformadas se almacenaron en caldo luria con 30% de glicerol a -70°C hasta su uso.

6.8. PCR tiempo real para expresión génica

Para determinar la expresión de los genes *c-myc*, *sp1* y *htert* se realizó la extracción del RNA total de las muestras y la síntesis del cDNA como se mencionó anteriormente y se realizó la amplificación del cDNA con los iniciadores y sonda TaqMan específicos para cada gen. La reacción se realizó en placas de 384 pozos en el equipo ABI PRISM 7900H (Applied Biosystems) utilizando el programa SDS v2.2.1. Cada reacción se realizó en un volumen final de 20 μ L y las

concentraciones finales de los componentes fueron: Universal Master Mix 1X (Applied Biosystems), iniciadores específicos para cada gen 900 nM, sonda TaqMan específica 250 nM y cDNA. La amplificación se realizó con el protocolo universal recomendado por la compañía que comprende desnaturalización a 95°C durante 15 seg, alineamiento y extensión a 60°C durante un minuto por 40 ciclos.

Los valores de fluorescencia relativa obtenidos se normalizaron de acuerdo a la referencia pasiva carboxi-X-rodamina (ROX) y fueron graficados en función del número de ciclo para determinar el valor de Ct para cada muestra.

Los valores de Ct para cada muestra se interpolaron en una curva patrón realizada con cantidades conocidas de cDNA sintetizado a partir de RNA total de la línea celular AGS para determinar el valor de la expresión de cada gen en las muestras estudiadas.

Los valores de Ct obtenidos para cada gen fueron normalizados con la expresión del gen 18S RNA ribosomal para realizar la comparación entre grupos.

6.9. PCR tiempo real para cuantificación de *H. pylori*

Para determinar la cantidad de bacterias presentes en las muestras se realizó la extracción de DNA de las biopsias gástricas y se realizó la amplificación del DNA con los iniciadores y sonda TaqMan específicos para el gen *ureB* de *H. pylori*. La reacción se realizó en placas de 384 pozos en el equipo ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems) utilizando el programa SDS 2.2. Cada reacción se realizó en un volumen final de 20 µL y las concentraciones finales de los componentes son: Universal Master Mix 1X (Applied Biosystems), iniciadores específicos 500 nM, sonda TaqMan específica 250 nM y 500 ng de DNA. La amplificación se realizó desnaturalizando a 95°C durante 10 min y posteriormente 40 ciclos de 95°C 15 seg, alineamiento y extensión a 57°C durante un minuto.

Los valores de fluorescencia relativa obtenidos se normalizaron de acuerdo a la referencia pasiva y fueron graficados en función del número de ciclo para determinar el valor de Ct para cada muestra. Los valores de Ct de cada muestra se interpolaron en una curva estándar de DNA plasmídico conteniendo el producto de PCR del gen *ureB* equivalente a 10^2 a 10^8 copias del mismo.

6.10. Especificidad de iniciadores y sonda TaqMan para *H. pylori*

Para determinar la especificidad de los iniciadores y sondas diseñados para la detección y cuantificación de *H. pylori* se realizaron ensayos de especificidad por PCR tiempo real con cepas bacterianas mencionadas anteriormente. Brevemente, se utilizaron 1 y 10 ng de DNA genómico de las cepas mencionadas en metodología (cepas bacterianas y líneas celulares), las condiciones del PCR fueron las detalladas en el párrafo anterior.

6.11. Biopsias gástricas

Como parte de un estudio multidisciplinario, en estudios de proyectos anteriores se utilizaron biopsias gástricas de la región cuerpo de sujetos sometidos a endoscopia en quienes se identificaron lesiones compatibles con cáncer gástrico, gastritis y metaplasia intestinal reclutados en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCSNSZ) del 2001 al 2005 y en el servicio de endoscopia del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) en el año 2006. El diagnóstico endoscópico se confirmó con el patológico. Las biopsias se almacenaron en solución para preservación de RNA (RNAlater, Ambion) a 4°C hasta su procesamiento en un tiempo menor a 7 días.

7. Resultados

7.1. Análisis *In silico*

7.1.1. Iniciadores y sondas TaqMan expresión de *c-myc*, *sp1* y *htert*

La búsqueda en diferentes casas comerciales se realizó para solicitar los iniciadores y sondas TaqMan prediseñados que permitieran de forma específica llevar a cabo la cuantificación de la expresión de los genes *c-myc*, *sp1* y *htert* por PCR tiempo real. La casa comercial de Applied Biosystems [57] tiene diseñados pares de iniciadores y sondas TaqMan específicos para el RNAm de cada uno de estos tres genes. Estos ensayos están diseñados en las uniones exón-exón para asegurar la discriminación entre el RNAm y DNA genómico, un análisis para elegir el ensayo que permitiera cuantificar todos los mensajeros específicos del gen en estudio se realizó.

De forma general, el análisis realizado para elegir el ensayo adecuado comprendió la búsqueda de las secuencias reportadas en el GenBank [58] correspondientes a los mensajeros para *c-myc*, *htert* y *sp1* y el posterior alineamiento múltiple de estas secuencias utilizando los programas CLUSTAL W [59] y ALIGN 1.02.

Una vez realizado el alineamiento se localizaron las secuencias correspondientes a las uniones exón-exón mediante el uso de una herramienta del GenBank (Graph) y se determinó la unión que tuviera el menor polimorfismo en cada gen.

Para descartar falsos negativos debidos al procesamiento alternativo de los mensajeros, se realizó una búsqueda de reportes de variantes de los transcritos debidas a estos cambios por modificaciones post transcripcionales.

a) *c-myc*

En el caso del RNAm de *c-myc* se analizaron 6 secuencias identificadas como V00568, NM_002467, BC000141, BC000917, BC058901 y K02276 obtenidas en GenBank. El transcrito consta de 3 exones como se muestra en la imagen obtenida del GenBank Graph (Figura 6).

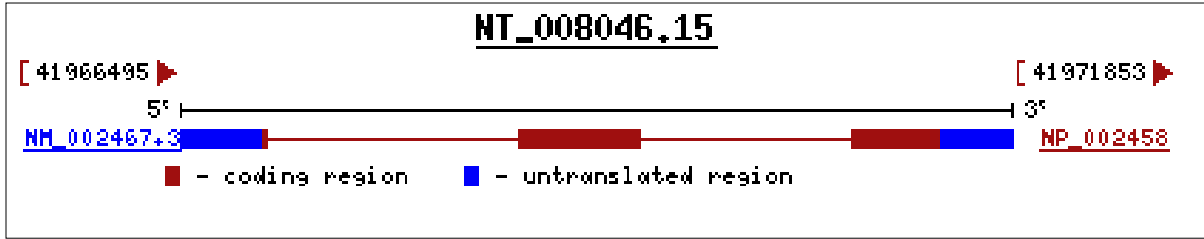


Figura 6. Representación gráfica del gen *c-myc* (línea negra) NT_008046.15 y el RNAm reportado en el que se muestran las regiones codificantes (rojo) y no codificantes (azul).

Después de realizar el alineamiento múltiple de las secuencias anteriores se identificaron las uniones exón-exón y se evaluó el polimorfismo en dichas secuencias.

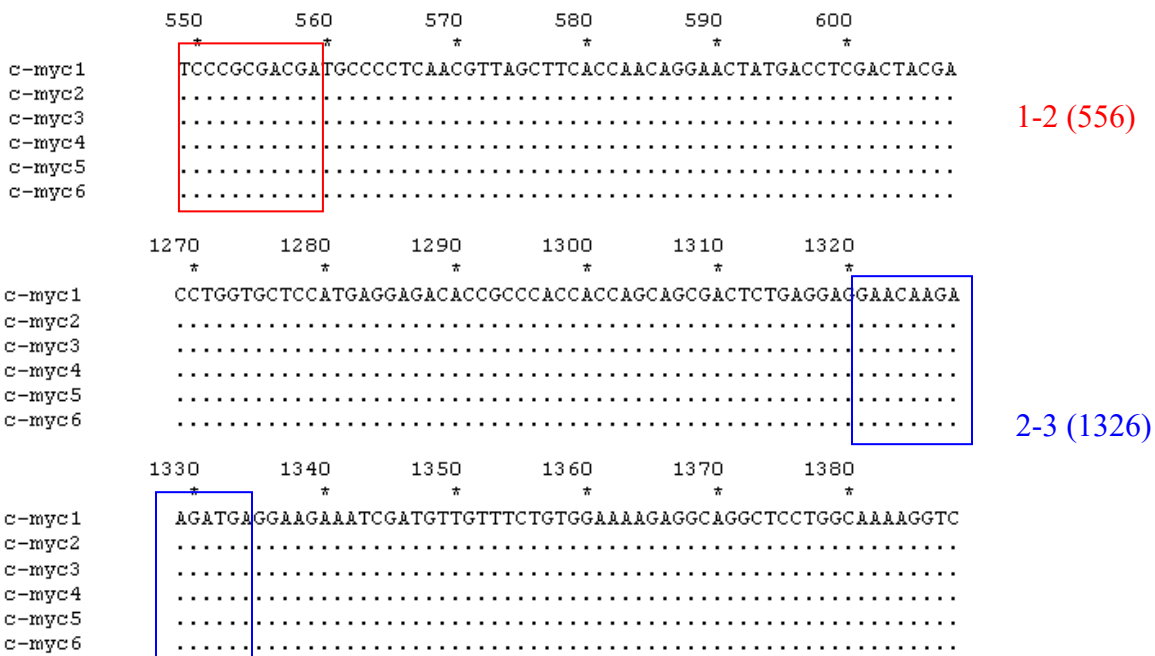


Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias reportadas para los transcritos del gen *c-myc* y localización de las uniones exón-exón (recuadros).

Como se observa en la Figura 7, las uniones exón-exón (en recuadros) y las secuencias cercanas a la unión son idénticas en todas las secuencias reportadas (representadas por puntos) por lo que la prueba a utilizar podría ser dirigida a cualquiera de las dos uniones exón-exón.

Posteriormente, se evaluó si existía algún reporte de procesamiento alternativo en el caso del transcrito de *c-myc*; no se encontró reporte de “splicing” alternativo para este gen, sin embargo, se reportan dos isoformas de la proteína correspondientes al uso alternativo de codón de inicio y se han nombrado como isoformas Myc1 y Myc2; sin embargo, no se reporta diferencia en la funcionalidad de dichas isoformas [60, 61]. Los ensayos disponibles diseñados por la compañía, específicos para el RNAm de *c-myc* se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Ensayos comerciales para cuantificar la expresión del gen *c-myc* por RT PCR.

#	ID Ensayo	Gen	Localización en el cromosoma (NCBI)	Unión exón-exón	Amplicon (pb)
1	Hs00153408_m1	<i>v-myc</i> Oncogen homólogo viral mielocitomatosis (aviar)	Chr. 8 - 128819676 – 128822629	2-3	107
2	Hs00905030_m1		Chr. 8 - 128817670 – 128820447	1-2	87
3	Hs00905027_m1*		Chr. 8 - 128817869– 128820200	2-3	84
4	Hs01562521_m1*		Chr. 8 - 128816947- 128818051	1-2	66

* Ensayos diseñados específicamente para la amplificación de las regiones sin traducir de los extremos 5' o 3' del RNAm. En rojo se destaca el ensayo utilizado en este estudio.

Posterior al análisis realizado de los transcritos del gen *c-myc*, se eligió el ensayo número 2 en el que la sonda TaqMan es complementaria a la unión de los exones 2 y 3, el producto obtenido es de 87 pb (se muestra en rojo en la tabla 1).

b) *sp1*

En el caso del gen correspondiente al factor transcripcional *sp1* se analizaron 7 secuencias del RNAm reportadas en el GenBank identificadas como: NM_138473, AJ272134, AF252284, AF255682, BQ072120, BC043224, BC062539 con las cuales se realizó el alineamiento múltiple. Este gen consta de 6 exones como se muestra en la Figura 8.

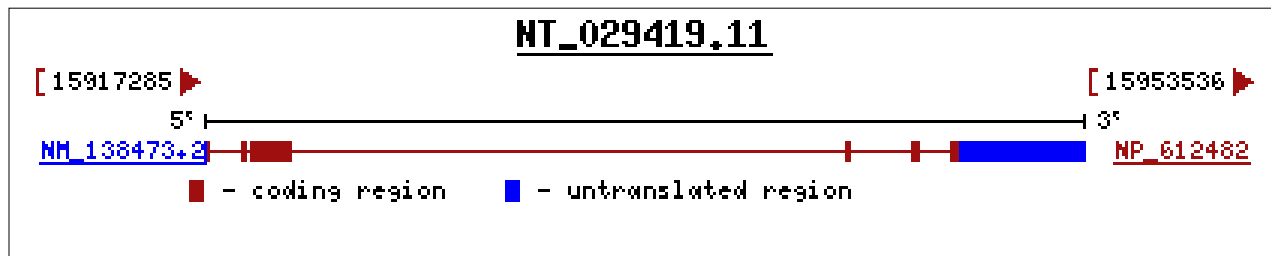


Figura 8. Representación gráfica del gen *spI* (línea negra) NT_029419.11 y el RNAm reportado en el que se muestran las regiones codificantes (rojo) y no codificantes (azul).

Posteriormente en el alineamiento múltiple se localizó la posición de la unión exón-exón en las secuencias mencionadas para evaluar el polimorfismo.

Como se observa en la Figura 9, las regiones correspondientes a las uniones exón-exón son altamente conservadas, aunque en algunos de los casos no se cuenta con la secuencia completa por lo que se optaría por elegir sondas dirigidas a la unión 1-2, 2-3 ó 5-6. Debido a que no existen reportes de variantes de transcritos de *spI* debidas a procesamiento alternativo y con los datos proporcionados por el fabricante que se muestran en la tabla siguiente; se eligió el ensayo 3 en el que la sonda TaqMan es complementaria a la secuencia correspondiente a la unión de los exones 1 y 2 (se muestra en rojo en la tabla 2).

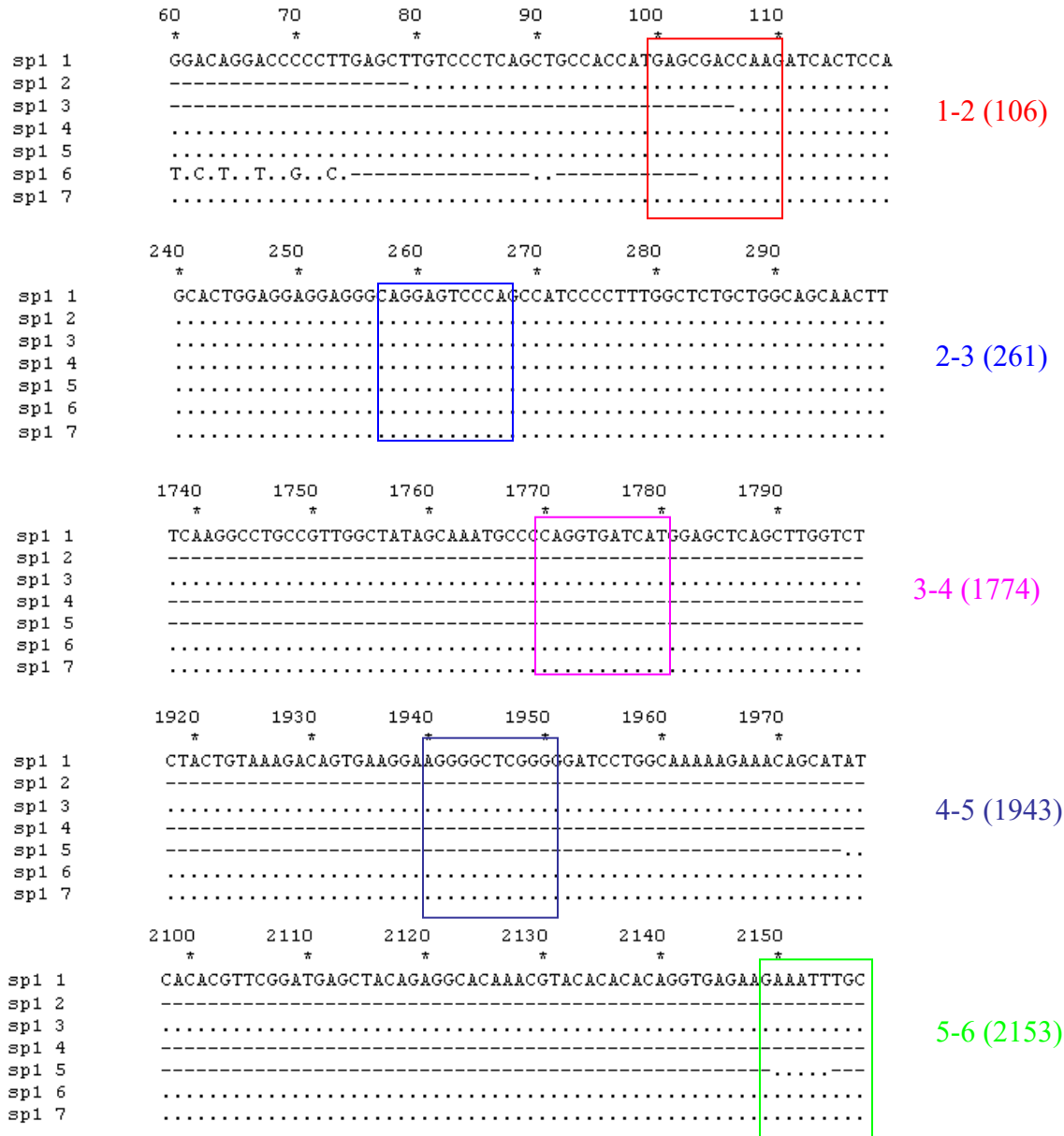


Figura 9. Alineamiento múltiple de las secuencias de los transcritos del gen *sp1* y localización de las uniones exón-exón (recuadros).

Tabla 2. Ensayos comerciales para cuantificar la expresión del gen *sp1* por PCR tiempo real.

#	ID Ensayo	Gen	Localización en el cromosoma (NCBI)	Unión exón-exón	Amplicon (pb)
1	Hs00412720_m1	Sp1 factor de transcripción	Chr. 12 - 52062266 – 52086804	3-4	62
2	Hs00412721_m1		Chr. 12 - 52086636 – 52089612	4-5	79
3	Hs00916518_m1		Chr. 12 - 52060246 – 52061864	1-2	122
4	Hs00916521_m1		Chr. 12 - 52089413 – 52096497	5-6	72

En rojo se destaca el ensayo utilizado en este estudio.

c) *htert*

Para el gen de la transcriptasa reversa de la telomerasa humana *htert* se obtuvieron 9 secuencias del GenBank identificadas: NM_003219, NM_198255, NM_198254, NM_198253, AF015950, AF018167, AB085628, AB086379, AB086950.

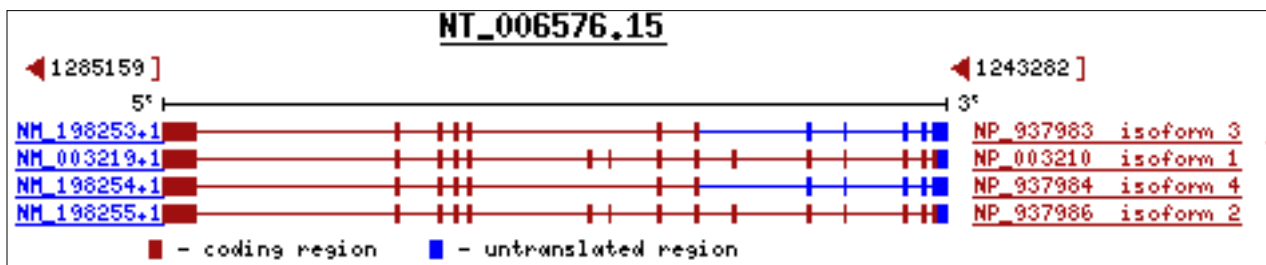


Figura 10. Representación gráfica del gen *htert* (línea negra) NT_006576.15 y las variantes del RNAm reportado en el que se muestran las regiones codificantes (rojo) y no codificantes (azul).

En la Figura 10 se muestra una representación gráfica del gen *htert* y de las 4 isoformas del transcrito; sin embargo, existen reportes en los que se han identificado hasta 9 transcritos diferentes [62-64]. La única forma funcional de la proteína corresponde a la variante 1 del transcrito que se ha reportado en la que se encuentran íntegros los 16 exones del RNAm [62]; sin embargo, la diferenciación de tales variantes no fue de relevancia en patologías tales como adenocarcinoma gástrico [64], por lo que no consideramos la posibilidad de evaluar la expresión específica de esta variante, además de que para hacerlo se requerirían múltiples pares de iniciadores y sondas.

Posterior al análisis y con las diferentes pruebas para la cuantificación de la expresión de este gen se decidió utilizar en ensayo # 4 (se muestra en rojo en la tabla 3) dirigido a la unión de los exones 3 y 4 donde se encuentra la secuencia conservada en todas las variantes de los transcritos descritos a la fecha. Los diferentes pares de iniciadores diseñados por la casa comercial se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3. Ensayos comerciales para cuantificar la expresión del gen *htert* por PCR tiempo real.

#	ID Ensayo	Gen	Localización en el cromosoma (NCBI)	Unión exón-exón	Amplicon (pb)
1	Hs00972650_m1	Telomerasa Transcriptasa reversa (<i>htert</i>)	Chr. 5 - 1333273 – 1335739	3-4	57
2	Hs00972651_m1		Chr. 5 - 1332406 – 1333453	4-5	83
3	Hs00972656_m1		Chr. 5 - 1319579 – 1321748	7-8 9-10	79
4	Hs99999022_m1		Chr. 5 - 1333273 – 1335739	3-4	94
5	Hs00972644_m1		Chr. 5 - 1311713 – 1313715	9-10 12-13	85
6	Hs00972645_m1		Chr. 5 - 1308402 – 1311774	10-11 13-14	71
7	Hs00972646_m1		Chr. 5 - 1307483 – 1308526	11-12 14-15	125
8	Hs00972649_m1		Chr. 5 - 1335544 – 1347781	2-3	79
9	Hs00162669_m1		Chr. 5 - 1313589 – 1317707	11-12	85
10	Hs00972643_m1		Chr. 5 - 1317519 – 1319650	10-11	97
11	Hs00972655_m1		Chr. 5 - 1321635 – 1324319	8-9	77
12	Hs00972654_m1		Chr. 5 - 1324234 – 1325395	7-8	101
13	Hs00972653_m1		Chr. 5 - 1324234 – 1325395	6-7	86

En rojo se destaca el ensayo utilizado en este estudio.

7.1.2. Iniciadores y sondas TaqMan para la cuantificación de *H. pylori* por PCR tiempo real

Los genes *flaA* y *ureB* de se utilizaron como blanco para el diseño de los iniciadores y sondas específicas para *H. pylori*.

La búsqueda de las secuencias reportadas se realizó para estos genes en *H. pylori* en el GenBank y el alineamiento múltiple de dichas secuencias con los programas CLUSTAL W y ALIGN 1.02. Una secuencia consenso para ambos genes se obtuvo y se utilizó el programa Primer Express v2.0 (Applied Biosystems) para identificar las mejores opciones de secuencias de iniciadores y sonda TaqMan®.

Dicho programa tiene condiciones definidas para el diseño de iniciadores que corresponden con las características generales tales como Tm de los iniciadores alrededor de 60° C, y de la sonda TaqMan alrededor de 70° C (aproximadamente 10°C mayor a la Tm de los iniciadores); el contenido de G-C va de un intervalo de 30 a 80%, la longitud de los iniciadores de 9 a 40 nt siendo óptima de 20 nt, además de que se analizan los iniciadores y la sonda para evitar que sean complementarios entre sí y además asegurar que no forman estructuras secundarias; la longitud del amplicón generado debe ser entre 50 y 150 pb.

De acuerdo con estos criterios el programa muestra las posibles combinaciones de iniciadores y sondas; posteriormente, se seleccionaron las combinaciones con un mayor “puntaje”¹ proporcionado por el programa y se utilizó el programa BLAST [65] para evaluar la especificidad de la sonda y los iniciadores. Se seleccionaron los iniciadores y la sonda que alinearan con un menor número de secuencias inespecíficas para cada gen y las características de los pares seleccionados se muestran tabla 4.

a) *flaA*

Tabla 4. Características de los iniciadores diseñados a partir de la secuencia del gen *flaA*.

Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Longitud (nt)	Tm (°C)	% G-C
<i>Forward</i>	CTCGTAAAGCGATTCAATCTGACAT	25	60	40
<i>Reverse</i>	GCCCCTACTTGGAATTCCTTGTT	23	59	43
Sonda TaqMan®	TTCGTTTGATTCAAGGTTT	19	68	32

¹ Número o valor asignado dependiendo del cumplimiento con los criterios establecidos inicialmente por el programa.

Representación esquemática del sitio de alineamiento de los iniciadores y la sonda TaqMan en el gen *flaA* (El amplicón tiene una longitud de 130 pb, T_m de 76°C y % G-C=40).

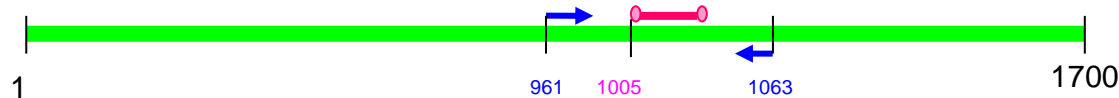


b) *ureB*

Tabla 5. Características de los iniciadores diseñados a partir de la secuencia del gen *ureB*.

Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Longitud (nt)	T _m (°C)	% G-C
<i>Forward</i>	TGCCACCACTTGGATAAAAGC	21	59	48
<i>Reverse</i>	TCCCCATGTCATGCAAAGTGT	21	60	48
Sonda TaqMan®	TGATTCAAGGATCCGCC	19	68	53

Representación esquemática del sitio de alineamiento de los iniciadores y la sonda TaqMan en el gen *ureB* (El amplicón tiene una longitud de 103 pb, T_m de 79°C y % G-C=47.)



7.2. PCR tiempo real y el intervalo dinámico

7.2.1. Intervalo dinámico para la expresión de c-myc, sp1 y htert

El intervalo dinámico se refiere a las concentraciones de templado en las cuales se determina con precisión el valor de Ct, este se determina en ensayos por triplicado con diferentes diluciones del templado. En este caso se utilizó cDNA sintetizado a partir de RNA total de células AGS. Para el resultado final se construye una gráfica de log de la concentración inicial contra los valores obtenidos de Ct y debe ser cercana a una línea recta [66] Posterior a la extracción del RNA total se realizó la síntesis de cDNA como se menciona en la metodología, los componentes y condiciones de reacción se señalan en la Figura 11.

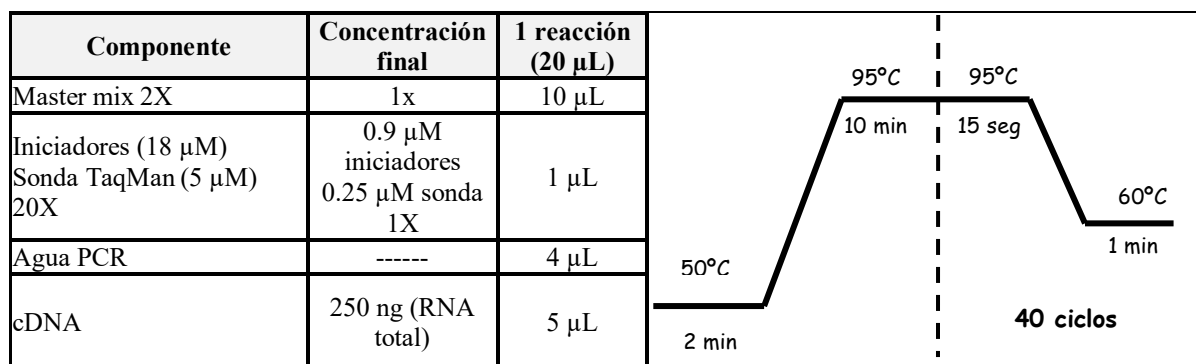


Figura 11. Componentes y condiciones de reacción para cuantificación de la expresión de *c-myc*, *sp1* y *htert* por PCR tiempo real.

Los iniciadores y sondas TaqMan se probaron para la amplificación del cDNA para *c-myc*, *sp1*, *htert* y se utilizó como gen normalizador la expresión del gen del rRNA *18S*.

Las cantidades utilizadas para los genes estudiados se muestran a continuación en las tablas 6, 7, 8 y 9, los valores del Ct en función del log de la cantidad de DNA en la gráfica permiten el cálculo de la eficiencia del método con el valor de la pendiente en el intervalo estudiado.

Para cada punto de la recta se obtuvieron valores de Ct por triplicado en todos los casos, se determinó el valor de la pendiente en la gráfica de Ct vs log Cantidad de DNA y con este valor se hizo el cálculo de la eficiencia de la reacción con la siguiente ecuación:

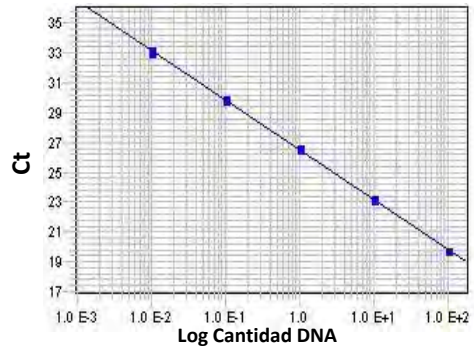
$$E = \left(10^{-\frac{1}{m}}\right) - 1$$

Donde E es el valor correspondiente a la eficiencia y m es el valor de la pendiente de la recta [66, 67].

De esta manera se determinaron las cantidades mínimas y máximas de DNA necesarias para detectar de forma precisa la expresión de los genes *c-myc*, *sp1*, *htert* y *rRNA 18S* para los ensayos a partir de biopsias gástricas.

Tabla 6. Cantidades de cDNA de AGS utilizadas para determinar el intervalo dinámico de los iniciadores y sonda TaqMan para la expresión génica de *c-myc*, (izquierda) gráfica de Ct en función del log de la cantidad de DNA.

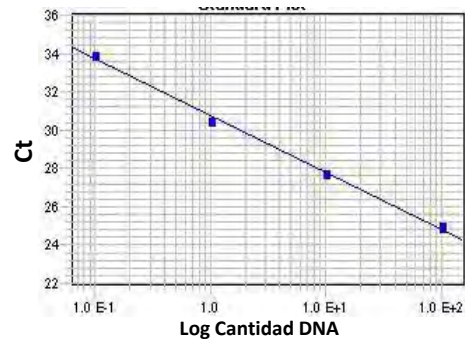
Gen	Cantidad cDNA	Ct	Ct promedio	DE
<i>c-myc</i>	100 ng	19.725	19.754	0.034
		19.745		
		19.792		
	10 ng	23.122	23.168	0.054
		23.228		
		23.156		
	1 ng	26.613	26.613	0.017
		26.630		
		26.597		
	100 pg	29.863	29.937	0.068
		29.949		
		29.998		
	10 pg	33.063	33.096	0.108
		33.008		
		33.216		



Pendiente -3.345267
 R² 0.9995852
 Intercepto 26.51364
 Eficiencia 99.03 %

Tabla 7. Cantidades de cDNA de AGS utilizadas para determinar el intercambio dinámico de los iniciadores y sonda TaqMan para la expresión génica de *sp1*, (izquierda) gráfica de Ct en función del log de la cantidad de DNA.

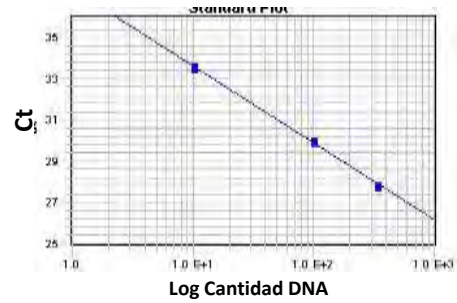
Gen	Cantidad cDNA	Ct	Ct promedio	DE
<i>sp1</i>	100 ng	24.900	24.989	0.084
		25.066		
		25.001		
	10 ng	27.725	27.727	0.032
		27.696		
		27.759		
	1 ng	30.527	30.485	0.045
		30.489		
		30.437		
	100 pg	33.896	33.936	0.049
		33.923		
		33.991		



Pendiente -30.764162
 R² 0.9963935
 Intercepto 2.9600718
 Eficiencia 117 %

Tabla 8. Cantidades de cDNA de AGS utilizadas para determinar el intervalo dinámico de los iniciadores y sonda TaqMan para la expresión génica de *htert*, (izquierda) gráfica de Ct en función del log de la cantidad de DNA.

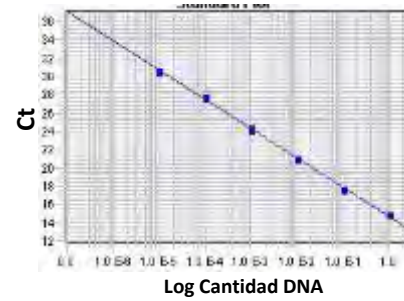
Gen	Cantidad cDNA	Ct	Ct promedio	DE
<i>htert</i>	330 ng	27.791	19.754	0.034
		27.822		
		27.909		
	100 ng	29.940	23.168	0.054
		30.004		
		30.066		
	10 ng	33.675	26.613	0.017
		33.454		
		33.590		



Pendiente -3.7391875
R² 37.35527
Intercepto 0.9977224
Eficiencia 85.11 %

Tabla 9. Cantidades de cDNA de AGS utilizadas para determinar el intervalo dinámico de los iniciadores y sonda TaqMan para la expresión génica de *rRNA 18S*, (izquierda) gráfica de Ct en función del log de la cantidad de DNA.

Gen	Cantidad cDNA	Ct	Ct promedio	DE
<i>rRNA 18S</i>	1 ng	14.889	14.892	0.009
		14.884		
		14.902		
	100 pg	17.611	17.650	0.037
		17.683		
		17.656		
	10 pg	21.075	21.031	0.046
		21.035		
		20.982		
	1 pg	24.412	24.299	0.1345
		24.334		
		24.150		
	100 fg	27.689	27.699	0.0417
		27.745		
		27.664		
	10 fg	30.466	30.599	0.1269
		30.613		
		30.718		
	1 fg	34.884	34.698	0.2348
		34.434		
		34.777		



Pendiente -3.1986532
R² 14.698312
Intercepto 0.99899507
Eficiencia 105 %

Una vez obtenidas las curvas de amplificación para los genes estudiados se verificó que el tamaño del amplicón obtenido correspondiera al esperado por electroforesis en agarosa al 2 % como se muestra en la Figura 12.

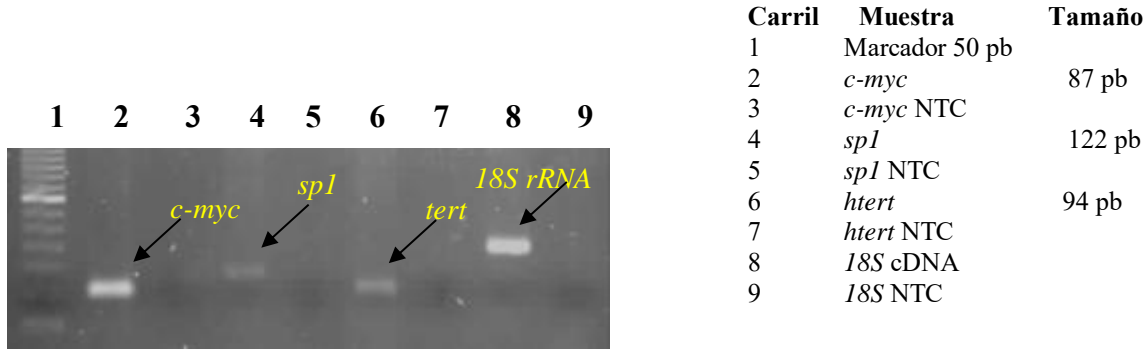


Figura 12. Gel de agarosa al 2% en TBE 0.5X (100V, 1h), tinción con bromuro de etidio. NTC= Control de reactivos. Se señalan los amplicones generados con el tamaño esperado.

7.2.2. Cuantificación de *H. pylori*

a) Condiciones de amplificación por PCR tiempo real de los iniciadores y sondas para *ureB* y *flaA*

Para llevar a cabo la detección y cuantificación de *H. pylori* en las biopsias gástricas se realizó el diseño de iniciadores y sondas TaqMan para amplificar de forma específica regiones de los genes *flaA* y *ureB* de este microorganismo como se mostró anteriormente.

En primer lugar se llevó a cabo la extracción de DNA de la cepa tipo de *H. pylori* 26695 (ATCC 700392) con la metodología reportada por Cheng [56]. El DNA obtenido se utilizó para el ensayo de PCR tiempo real, las condiciones se muestran en la Figura 13.

Componente	Concentración final	1 reacción (20 µL)	
Master mix 2X	1x	11 µL	
Iniciadores (10 µM)	0.5 µM	1 µL (c/u)	
Sonda TaqMan (5 µM)	0.25 µM	1 µL	
Agua PCR	-----	4 µL	
DNA	100 ng	2 µL	40 ciclos

Figura 13. Componentes y condiciones de reacción para cuantificación de *H. pylori* por PCR tiempo real.

Los resultados de la amplificación se muestran en la Tabla 10 y la Figura 14. La cantidad de DNA bacteriano utilizado para el ensayo fue la misma para *ureB* y *flaA* (100ng), la amplificación se realizó por duplicado.

Tabla 10. Valores de Ct obtenidos por PCR tiempo real para la determinación de los genes *flaA* y *ureB* de *H. pylori*.

Gen	Curva	Muestra	Ct	Ct promedio	DE
<i>flaA</i>	A	1	23.713335	23.771	0.081
		2	23.828627		
<i>ureB</i>	B	1	19.155552	19.125	0.042
		2	19.094809		

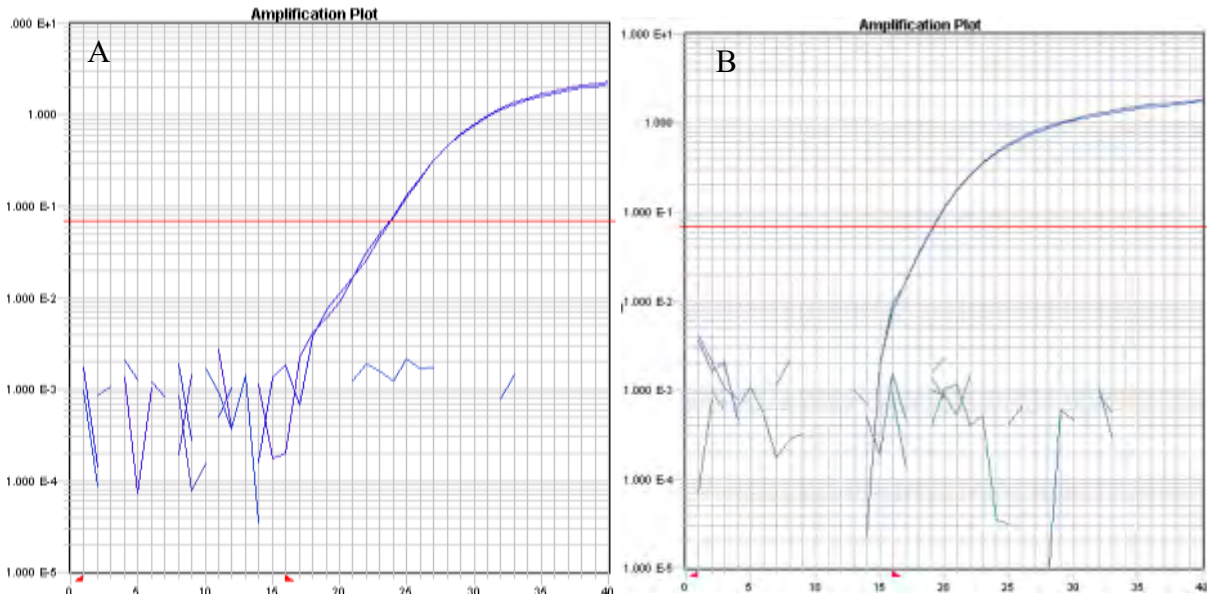


Figura 14. Curva de amplificación correspondiente a los genes *flaA* (A) y *ureB* (B) de *H. pylori* a partir de 100 ng de DNA de la cepa tipo 26695.

El tamaño de los amplicones obtenidos se confirmó por electroforesis en agarosa al 2% como se muestra en la Figura 15.



Carril	Muestra	Gen	Tamaño
1	Marcador 100 pb		
2	DNA 1 <i>Hp</i>	<i>flaA</i>	129 pb
3	DNA 2 <i>Hp</i>	<i>flaA</i>	129 pb
4	DNA 1 <i>Hp</i>	<i>ureB</i>	102 pb
5	DNA 2 <i>Hp</i>	<i>ureB</i>	102 pb

Figura 15. Gel de agarosa al 2% en TBE 0.5X, (100V, 1h).

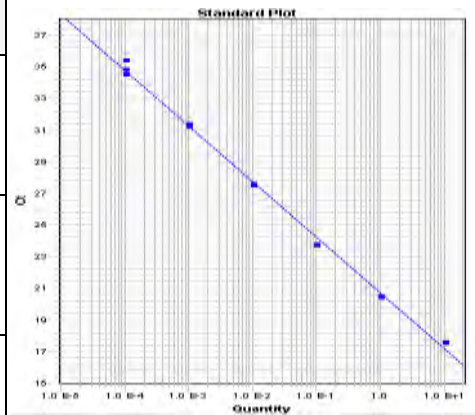
En la tabla 10 y la Figura 14 se observa que utilizando la misma cantidad de DNA bacteriano, el valor de Ct es diferente para *flaA* y *ureB*, un valor menor de Ct indica que se requiere una menor cantidad de DNA inicial para llegar a un valor de fluorescencia determinado (Threshold Cycle), en el caso de *ureB* el valor obtenido de Ct es alrededor de 19, mientras que para *flaA* el Ct fue de

23, por lo que el uso de los iniciadores diseñados para la detección de *ureB* muestran una mayor sensibilidad en la detección de *H. pylori*.

b) Intervalo dinámico para *ureB* utilizando DNA genómico de *H. pylori*

La determinación del intervalo dinámico para la amplificación con los iniciadores para *ureB* utilizando cantidades conocidas del DNA genómico de *H. pylori*. En la Figura 16 se muestran las cantidades utilizadas y los valores de Ct obtenidos, las amplificaciones se realizaron por triplicado.

Gen	Cantidad DNA	Muestra	Ct	Ct promedio	DE
<i>ureB</i>	100 ng	1	20.045673	20.109	0.158
		2	19.992302		
		3	20.289434		
	10 ng	1	17.632877	17.619	0.014
		2	17.605818		
		3	17.619722		
	1 ng	1	20.531088	20.511	0.026
		2	20.481285		
		3	20.520336		
	100 pg	1	23.797132	23.765	0.028
		2	23.747242		
		3	23.750507		
	10 pg	1	27.638166	27.598	0.037
		2	27.589624		
		3	27.564745		
	1 pg	1	31.450172	31.360	0.079
		2	31.300434		
		3	31.330313		
	100 fg	1	34.850666	34.956	0.467
		2	34.549885		
		3	35.46684		



Pendiente = -3.5160685
 Intercepto = 20.694056
 $R^2 = 0.99701375$
 E = 96.2%

Figura 16. Determinación del intervalo dinámico de los iniciadores y sonda TaqMan para amplificación del gen *ureB* de *H. pylori* por PCR tiempo real.

Como se observa en la Figura 25 es posible detectar cantidades de 1 pg de DNA de *H. pylori* de forma reproducible utilizando estos iniciadores, inclusive hasta 100 fg de DNA.

Debido a que se conoce el tamaño del genoma de *H. pylori* es posible calcular el número de genomas equivalentes por esta cantidad de DNA mediante el uso de la siguiente ecuación.

$$m = \left[n \left[1.096 \times 10^{-21} \frac{g}{pb} \right] \right]$$

Donde m equivale a la masa en gramos correspondiente al valor de n (pares de bases del genoma).

De esta manera sabemos que 100 fg de DNA de *H. pylori* equivalen aproximadamente a 50 genomas, sin embargo, como se observa en la Figura 16, la DE de los valores de Ct obtenidos con 100 fg de DNA es de 0.467 y el intervalo aceptable de variación entre triplicados es de 0.16

Mediante la determinación del intervalo dinámico es posible también evaluar la eficiencia de la reacción mediante la ecuación siguiente:

$$E = \left[10^{(-1/m)} \times 100 \right] / 2 = \left[10^{(-1/-3.5160685)} \times 100 \right] / 2 = 96.2\%$$

Para realizar un ensayo cuantitativo de PCR tiempo real es aceptable una eficiencia de hasta el 92% [66-68], por lo que la eficiencia obtenida de la reacción se encuentra en el intervalo aceptable.

c) Controles para curva estándar para la cuantificación de *H. pylori*

De acuerdo a los métodos reportados para cuantificación por PCR tiempo real se realizan curvas estándar a partir de DNA genómico [66, 67], sin embargo, siempre existe la posibilidad de que el valor calculado en cuanto al número de genomas no sea tan preciso, esto debido a la presencia de contaminantes tales como RNA o incluso a la degradación en bajo grado del DNA que proporciona un valor erróneo en la cuantificación espectrofotométrica.

Por esta razón decidimos construir estándares que nos proporcionaran un valor más exacto en la cuantificación de la bacteria.

Como se menciona en la metodología se clonaron los productos de PCR correspondientes a la amplificación de *ureB* y *flaA* con los iniciadores diseñados en un plásmido TOPO (invitrogen), posterior a la clonación y transformación de *E. coli* DH5 α , se seleccionaron las clonas positivas para confirmar la presencia del inserto por PCR y posteriormente por secuenciación.

En la Figura 17 se muestran los resultados de las clonas positivas para *ureB* y *flaA*.

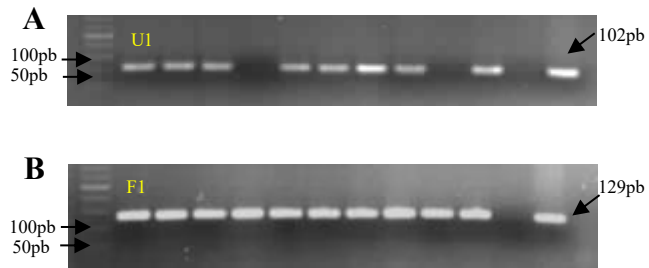


Figura 17. Los productos de PCR correspondientes a las clonas positivas para *ureB* se muestran (A) y *flaA* (B). De estos resultados se seleccionó una de las clonas de *ureB* (U1) y una de *flaA* (F1) para la secuenciación.

Los resultados de la secuenciación se alinearon en BLAST para confirmar la presencia de los insertos en las clonas seleccionadas, los resultados para *ureB* (U1) y *flaA* (F1) se muestran en la Figura 18.

A

```
>[gb|DQ141576.1] Helicobacter pylori urease B gene, partial cds
Length=1704
Score = 191 bits (103), Expect = 4e-46
Identities = 103/103 (100%), Gaps = 0/103 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 1      TCCCCATGTCATGCAAAGTGTCTTCAGCCGCAATGGTTTGAGGGCGGATCCTTGAATCAG 60
            |||
Sbjct 1060   TCCCCATGTCATGCAAAGTGTCTTCAGCCGCAATGGTTTGAGGGCGGATCCTTGAATCAG 1001
Query 61     CGAACTGAACATCTTCTTTAATGCTTTTTATCCAAGTGGTGGCA 103
            |||
Sbjct 1000   CGAACTGAACATCTTCTTTAATGCTTTTTATCCAAGTGGTGGCA 958
```

B

```
>[gb|AE000511.1] Helicobacter pylori 26695, complete genome
Length=1667867
Features in this part of subject sequence:
  flagellin A (flaA)
Score = 241 bits (130), Expect = 6e-61
Identities = 130/130 (100%), Gaps = 0/130 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 1      GCCCCTACTTGGAAATTCCTTGTGGTGAATTGACCAGACAATAACGCTTGCCCGTTATAA 60
            |||
Sbjct 637733  GCCCCTACTTGGAAATTCCTTGTGGTGAATTGACCAGACAATAACGCTTGCCCGTTATAA 637674
Query 61     GTAGTCGTATTACCGATATTGTCTAAACCTTGAATCAAACGAACGATGTCAGATTGAATC 120
            |||
Sbjct 637673  GTAGTCGTATTACCGATATTGTCTAAACCTTGAATCAAACGAACGATGTCAGATTGAATC 637614
Query 121    GCITTACGAG 130
            |||
Sbjct 637613  GCITTACGAG 637604
```

Figura 18. Los resultados del alineamiento de las secuencias de las clonas de *ureB* (A) y *flaA* (B) se muestran en el programa BLAST.

d) Intervalo dinámico para *ureB* y *flaA* utilizando controles para curva estándar

Una vez confirmada la presencia de los productos de PCR en los plásmidos se cultivó la clona correspondiente y se realizó la extracción de DNA plasmídico conforme se señala en la parte metodológica.

El DNA plasmídico fue utilizado para determinar el intervalo dinámico y calcular de forma precisa el número mínimo de bacterias detectadas por PCR tiempo real. Los cálculos para determinar el número de genomas en el ensayo se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Cálculo de genomas de *H. pylori* por gramo de DNA plasmídico con el inserto específico para *ureB* y *flaA*

<i>flaA</i>	<i>ureB</i>
Producto = 129 pb	Producto = 102 pb
Vector de clonación = 3890 pb	Vector de clonación = 3890 pb
Vector + Inserto = 4019 pb	Vector + Inserto = 3992 pb
$m = [n] \left[1.096 \times 10^{-21} \frac{g}{pb} \right]$ $m = [4019 pb] \left[1.096 \times 10^{-21} \frac{g}{pb} \right] = 4.4 \times 10^{-18} g / genoma$	$m = [n] \left[1.096 \times 10^{-21} \frac{g}{pb} \right]$ $m = [3992 pb] \left[1.096 \times 10^{-21} \frac{g}{pb} \right] = 4.37 \times 10^{-18} g / genoma$

El ensayo de PCR tiempo real para *ureB* y *flaA* se realizó bajo las mismas condiciones de amplificación que el DNA genómico, como muestra la Figura 13. Los resultados de intervalo dinámico se muestran en la tabla 12 y la Figura 19.

Tabla 12. Valores de Ct para los controles estándar de *flaA* y *ureB*. Se muestra el número de genomas detectados con cada uno de los genes.

Cantidad DNA (g)	Tubo ID	<i>ureB</i>				<i>flaA</i>			
		Número de copias	Ct	Ct promedio	DE	Número de copias	Ct	Ct promedio	DE
4.00E-09	1	9.15E+07	15.2027	15.2013	0.0019	9.09E+07	15.1496	15.16455	0.0211
			15.1999				15.1795		
4.00E-10	2	9.15E+06	17.815	17.85315	0.0539	9.09E+06	19.5227	18.7068	1.1533
			17.8913				17.8909		
4.00E-11	3	9.15E+05	21.401	21.40705	0.0085	9.09E+05	21.3383	21.2704	0.0961
			21.4131				21.2025		
4.00E-12	4	9.15E+04	24.6381	24.6294	0.0123	9.09E+04	24.5035	24.60005	0.1365
			24.6207				24.6966		
4.00E-13	5	9.15E+03	28.0308	27.9766	0.0761	9.09E+03	33.0476	33.1412	0.1323
			27.9224				33.2348		
4.00E-14	6	9.15E+02	31.6574	31.4243	0.3290	9.09E+02	33.4985	33.5943	0.1354
			31.1912				33.6901		
4.00E-15	7	9.15E+01	35.0277	34.87885	0.2105	9.09E+01	37.2748	37.49185	0.3069
			34.73				37.7089		

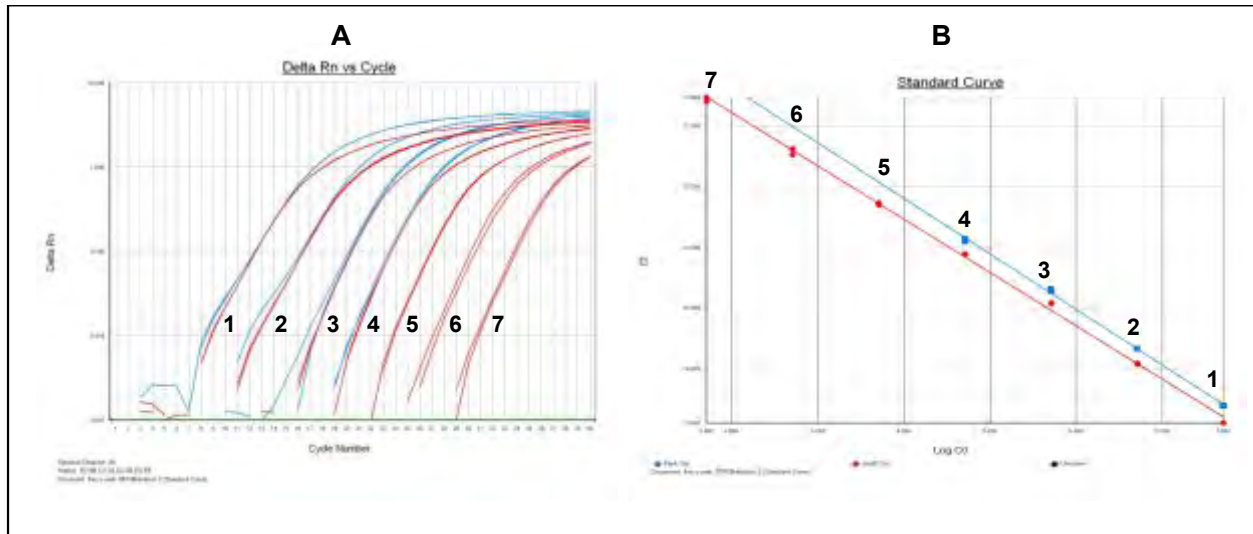


Figura 19. (A) Curvas de amplificación de DNA plasmídico para *ureB* (rojo) y *flaA* (azul), los números corresponden a las cantidades mencionadas en la tabla 12. (B) Curva de intervalo dinámico para *ureB* (rojo) y *flaA* (azul).

De acuerdo a lo observado en la Figura 19, los valores de eficiencia de la amplificación para *ureB* y *flaA* son 92% y 86.8% respectivamente, el intervalo donde se mantiene una tendencia lineal de los resultados es de 90 hasta 90 millones de copias para *ureB* y de 90 mil a 90 millones de copias para *flaA*. Con los valores obtenidos el control utilizado para la cuantificación de *H. pylori* en las biopsias gástricas fue el de *ureB*.

Para evaluar la interferencia del DNA humano en la reacción de PCR tiempo real para la detección del gen *ureB* de *H. pylori* se realizó una curva desde 10 a 1000 millones de copias del gen en presencia de 500 ng de DNA humano, los resultados se muestran en la Figura 20.

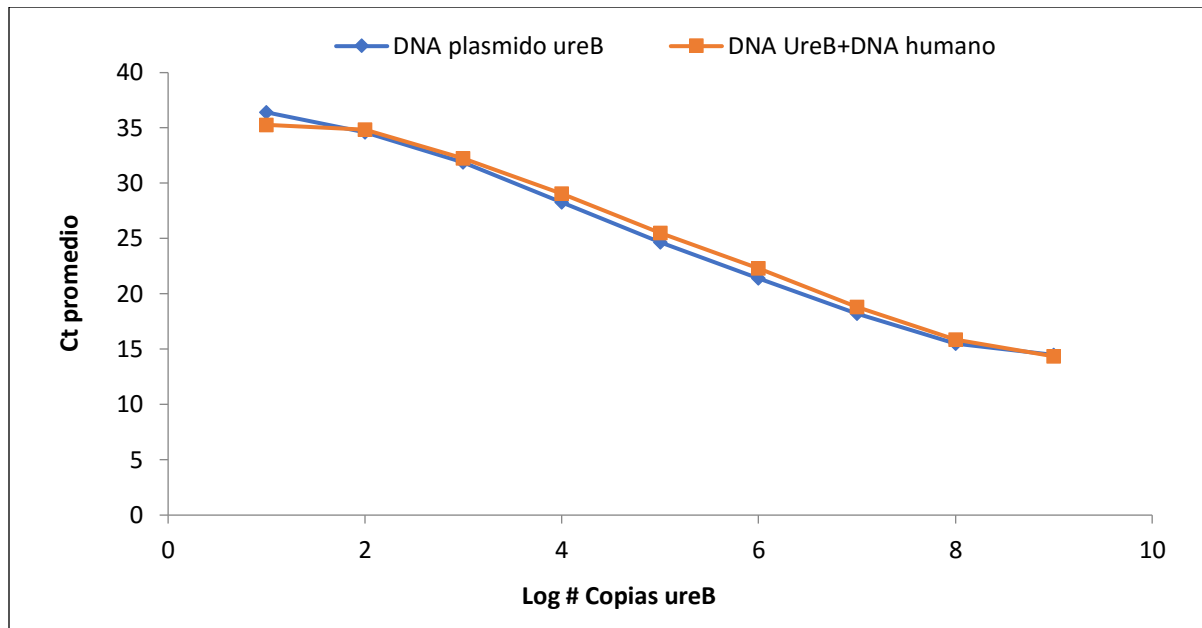


Figura 20. Curvas de amplificación de DNA plasmídico para *ureB* en presencia de DNA genómico humano (rojo) y en ausencia de DNA humano (azul)

El valor de Ct mantiene una relación lineal desde 100 copias hasta 100 millones de copias del gen *ureB*, independiente de la presencia de DNA humano en la reacción de amplificación.

e) Especificidad de los iniciadores y sonda TaqMan para *ureB* y *flaA*

La especificidad de los iniciadores y sondas TaqMan se determinó para la detección de *H. pylori* utilizando diferentes cepas tipo y aislamientos clínicos identificados previamente, se probaron dos diferentes cantidades de DNA genómico de las bacterias y la amplificación se realizó por duplicado, los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Valores de Ct obtenidos en el ensayo de especificidad de *ureB*, se utilizaron 1 ng y 100 ng de DNA genómico de las bacterias evaluadas.

Bacteria	Ct prom (1 ng)	Ct prom (10 ng)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ND	37.03885
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	38.785	37.3398
<i>Proteus mirabilis</i>	ND	36.5008
<i>Citrobacter freundii</i>	ND	38.3029
<i>Campylobacter jejuni</i>	ND	ND
<i>Escherichia coli</i>	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	35.4911	33.85315
<i>Enterococcus faecalis</i>	ND	33.67085
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ND	ND
<i>Enterobacter cloacae</i>	ND	ND
<i>Proteus vulgaris</i>	38.5	36.4933

Los valores obtenidos muestran que en el caso de *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* y *S. aureus* se observa una señal positiva alrededor del ciclo 38 para los dos primeros microorganismos y cerca del 35 para *S. aureus*. En el caso de *flaA* todos los resultados fueron negativos, tanto para 1 ng como 100 ng de DNA.

7.3. Población de estudio

Para el estudio se utilizaron biopsias gástricas de la región de cuerpo de sujetos con diagnóstico patológico de gastritis y biopsias de la lesión en sujetos con metaplasia intestinal y cáncer gástrico. Las muestras fueron obtenidas en el servicio de gastroenterología del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición ‘Salvador Zubirán’ (INCMNSZ) con el apoyo y asesoría del Dr. Sergio Ponce de León. Subdirector de

Consulta Externa de esta Institución. Las biopsias fueron colocadas inmediatamente en solución para preservación de RNA (RNA later) y almacenadas a 4° C hasta su procesamiento, se realizó la extracción simultánea de RNA y DNA de las muestras como se detalla en metodología (6.4). Las biopsias de 48 pacientes se trabajaron, las patologías se muestran en la tabla 14, del total de sujetos estudiados se incluyeron 30 varones y 18 mujeres. El valor promedio de edad es 54.6 años con un intervalo de 24 a 91 años.

Tabla 14. Número de muestras estudiadas por patología.

Patología	n
Gastritis crónica Leve (GCL)	12
Gastritis crónica Moderada (GCM)	14
Gastritis crónica Severa (GCS)	3
Metaplasia intestinal (MI)	5
Cáncer gástrico (CG)	14
Total (N)	48

Los criterios utilizados para la clasificación patológica son de acuerdo a lo reportado por Lauren.

7.4. Expresión de *c-myc*, *sp1* y *htert* en biopsias gástricas

Para la expresión de los genes *c-myc*, *sp1* y *htert* por PCR tiempo real se amplificaron 100 ng de DNA de cada muestra y los valores fueron normalizados en base a la expresión del gen 18S rRNA. Cada muestra se amplificó por triplicado y los resultados de los valores de Ct se interpolaron en la curva estándar correspondiente. Los resultados normalizados para cada uno de los genes se muestran en la tabla 15 en función de la patología.

El valor que se muestra corresponde o representa el porcentaje de expresión del gen problema en función del gen control endógeno *18S rRNA*.

Las biopsias 9, 32, 34, 36, 3 y 22 fueron negativas para las tres determinaciones mientras que las biopsias 7, 14, 23, 24, 25, 28, 33, 35 y 39 que representan en conjunto el 29.2% de las muestras estudiadas resultaron positivas a uno de los marcadores.

Tabla 15. Valores promedio normalizados de la expresión de *c-myc*, *sp1* y *htert* por muestra

ID	<i>c-myc</i>	<i>htert</i>	<i>sp1</i>	Patología	
1	5.02	5.83	3.27	Gastritis crónica leve	
8	2.11	2.07	1.03		
11	0.63	0.82	0.52		
12	3.37	2.56	0.99		
14	4.60	0.00	0.00		
18	0.54	0.24	0.65		
24	0.72	0.00	0.90		
25	4.07	0.00	0.00		
26	4.41	9.42	4.22		
40	1.56	38.80	7.29		
42	0.39	0.39	0.50		
10	1.18	0.67	0.69		Gastritis crónica moderada
16	2.77	2.66	1.41		
20	0.62	1.30	0.77		
21	0.97	1.63	1.61		
27	0.39	4.82	0.55		
28	9.03	0.00	0.00		
30	0.81	0.67	0.70		
35	0.00	237.62	0.00		
38	2.41	6.38	3.87		
41	2.24	0.00	5.53		
46	3.17	73.17	3.38		

ID	<i>c-myc</i>	<i>htert</i>	<i>sp1</i>	Patología
15	1.19	1.96	1.11	Gastritis crónica severa
19	1.78	1.68	1.59	
4	2.95	3.15	2.53	Metaplasia Intestinal
13	2.49	2.49	1.98	
37	1.82	4.49	0.31	
39	0.00	235.93	0.00	
47	3.39	31.22	3.38	
7	7.61	0.00	0.00	Cáncer gástrico
23	35.51	0.00	0.00	
31	2.69	16.60	2.72	
33	3.32	0.00	0.00	
43	11.07	0.00	4.00	
20L	0.85	5.36	0.64	
23L	3.34	5.03	0.74	
24L	0.53	7.07	0.08	
25L	0.94	79.13	0.31	
28L	1.09	5.65	0.44	
30L	1.13	9.94	0.55	
31L	7.17	76.42	1.09	
32L 1	0.72	30.18	0.26	

7.5. Cuantificación de *H. pylori* en biopsias gástricas

La reacción de PCR para identificar y cuantificar *H. pylori* en las biopsias se realizó a partir de 100 ng de DNA total aislado de las biopsias gástricas, el valor de Ct se interpoló en una curva estándar realizada con diferentes cantidades de la construcción para el gen *ureB* (TOPO-*ureB*), y el valor final se expresó en cantidad de bacterias por 500 ng de DNA total de la muestra como se muestra en la tabla 16. Los valores de genomas por muestra se presentan en función de la patología estudiada tal como en el caso de la expresión génica.

Las biopsias 9, 25 y 43 fueron negativas a la presencia de *Helicobacter pylori* (no se muestran en la tabla 16).

Tabla 16. Cantidad de genomas en las biopsias gástricas de los sujetos estudiados

ID	<i>Hp</i> (bacterias / 500 ng DNA)	Patología	ID	<i>Hp</i> (bacterias / 500ng DNA)	Patología
1	109	Gastritis crónica leve	3	66,930	Gastritis crónica severa
8	137		15	2,071,500	
11	780,382		19	303,108	
12	3,845		4	51	Metaplasia Intestinal
14	25,447		13	1,723	
18	134		37	107	
24	19		39	70	
26	10		47	3,061,170	
40	190		7	10	Cáncer gástrico
42	503		22	27	
10	213,529		23	1,338	
16	2,042,110	31	175		
20	2,858	33	119		
21	4,395	20L	188		
27	13	23L	4,736		
28	628,576	24L	27,758		
30	23	25L	19		
32	5,855,040	28L	48,357		
34	73	30L	99,655		
35	112	31L	206		
36	1,117,930	32L	12		
38	601				
41	14,853,300				
46	80,194				

7.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se obtuvo la mediana y se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar las diferencias por patología para cada parámetro estudiado, tanto la expresión génica como la densidad bacteriana. En la Tabla 17 se muestran las medianas y el valor *P* y en la Figura 21 se muestran las gráficas de los resultados, la mediana y los percentiles. No se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados.

Tabla 17. Comparación de la expresión de *c-myc*, *sp1* y *htert* y de la carga bacteriana de *H. pylori* en las patologías estudiadas (Se muestra la mediana del valor de expresión relativa de cada gen).

Patología	<i>c-myc</i>	<i>htert</i>	<i>sp1</i>	<i>Hp</i> (bacterias/500 ng DNA)
Gastritis Crónica Leve	1.84	0.6	0.77	135
Gastritis Crónica Moderada	0.89	0.98	0.69	42,294
Gastritis Crónica Severa	1.19	1.68	1.11	30,310
Metaplasia Intestinal	2.49	4.49	1.98	107
Cáncer Gástrico	1.91	5.5	3.36	181
Valor de <i>p</i>*	0.41	0.25	0.77	0.037

*Prueba de Kruskal-Wallis para comparación de medianas (a dos colas).

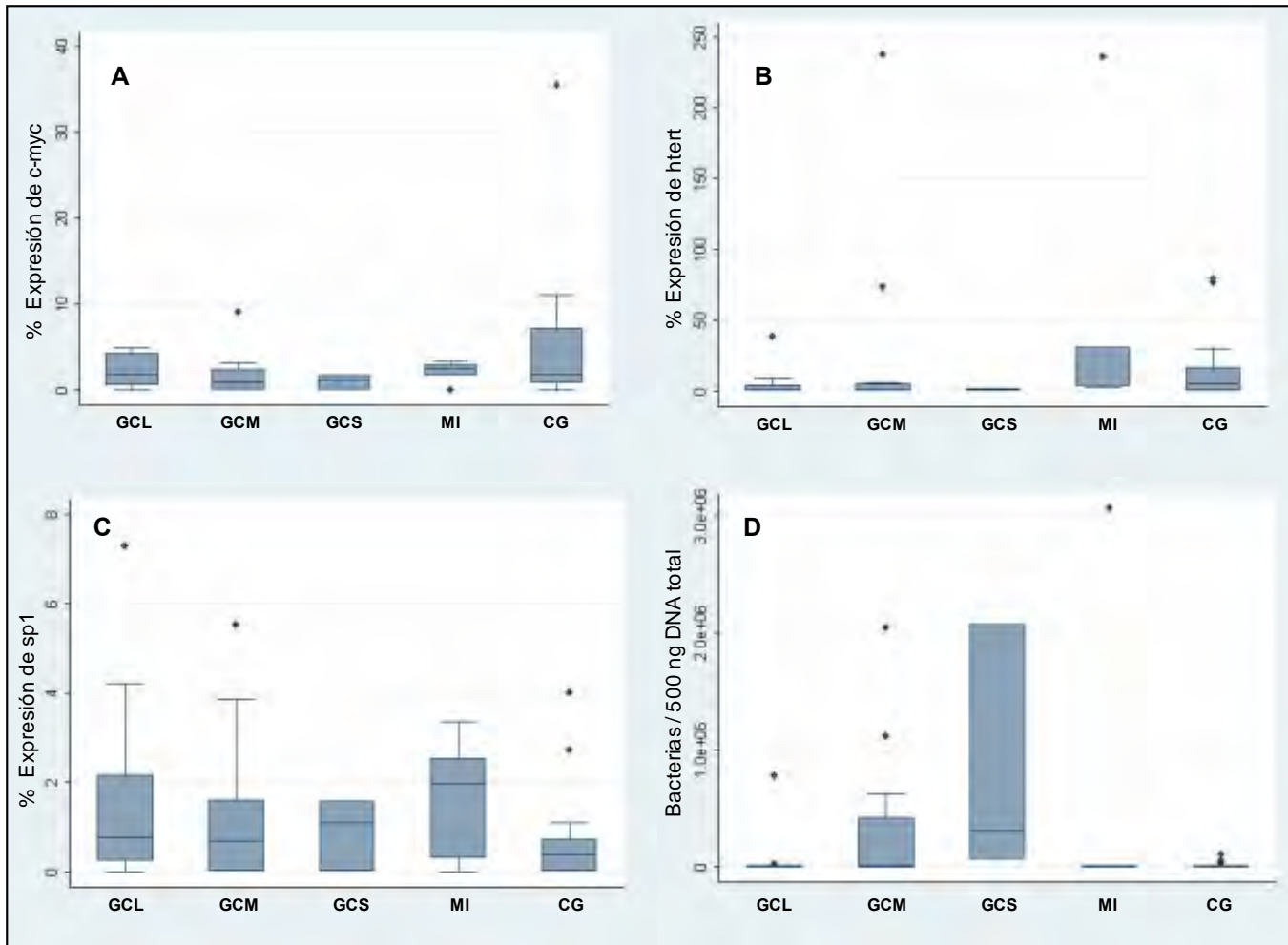


Figura 21. Gráfica de percentiles, mediana y desviación estándar de los grupos gastritis crónica leve, moderada, severa, metaplasia intestinal y cáncer gástrico (A) Porcentaje de expresión del gen *c-myc*, (B) *htert*, (C) *sp1*, (D) número de bacterias por 500 ng de DNA total. GCL=Gastritis Crónica Leve, GCM=Gastritis Crónica Moderada, GCS=Gastritis Crónica Severa, MI= Metaplasia Intestinal, CG= Cáncer gástrico.

Posteriormente un análisis considerando los grupos de gastritis crónica leve, moderada y severa como una sola categoría se realizó, el valor de P se muestra en la Tabla 18. En la Figura 22 se muestran las gráficas de caja correspondiente a los percentiles por grupo.

Tabla 18. Comparación de la expresión de *c-myc*, *sp1* y *htert* y de la carga bacteriana de *H. pylori* en las patologías estudiadas (Se muestra la mediana del valor de expresión relativa de cada gen).

Patología	<i>c-myc</i>	<i>htert</i>	<i>sp1</i>	<i>Hp</i> (bacterias/500 ng DNA)
Gastritis Crónica *	1.18	0.82	0.7	2,857
Metaplasia Intestinal	2.49	4.49	1.98	107
Cáncer Gástrico	1.91	5.5	3.36	181
Valor de <i>p</i>**	0.33	0.075	0.42	0.33

*Agrupa gastritis crónica leve, moderada y severa.

**Prueba de Kruskal-Wallis para comparación de medianas (a dos colas).

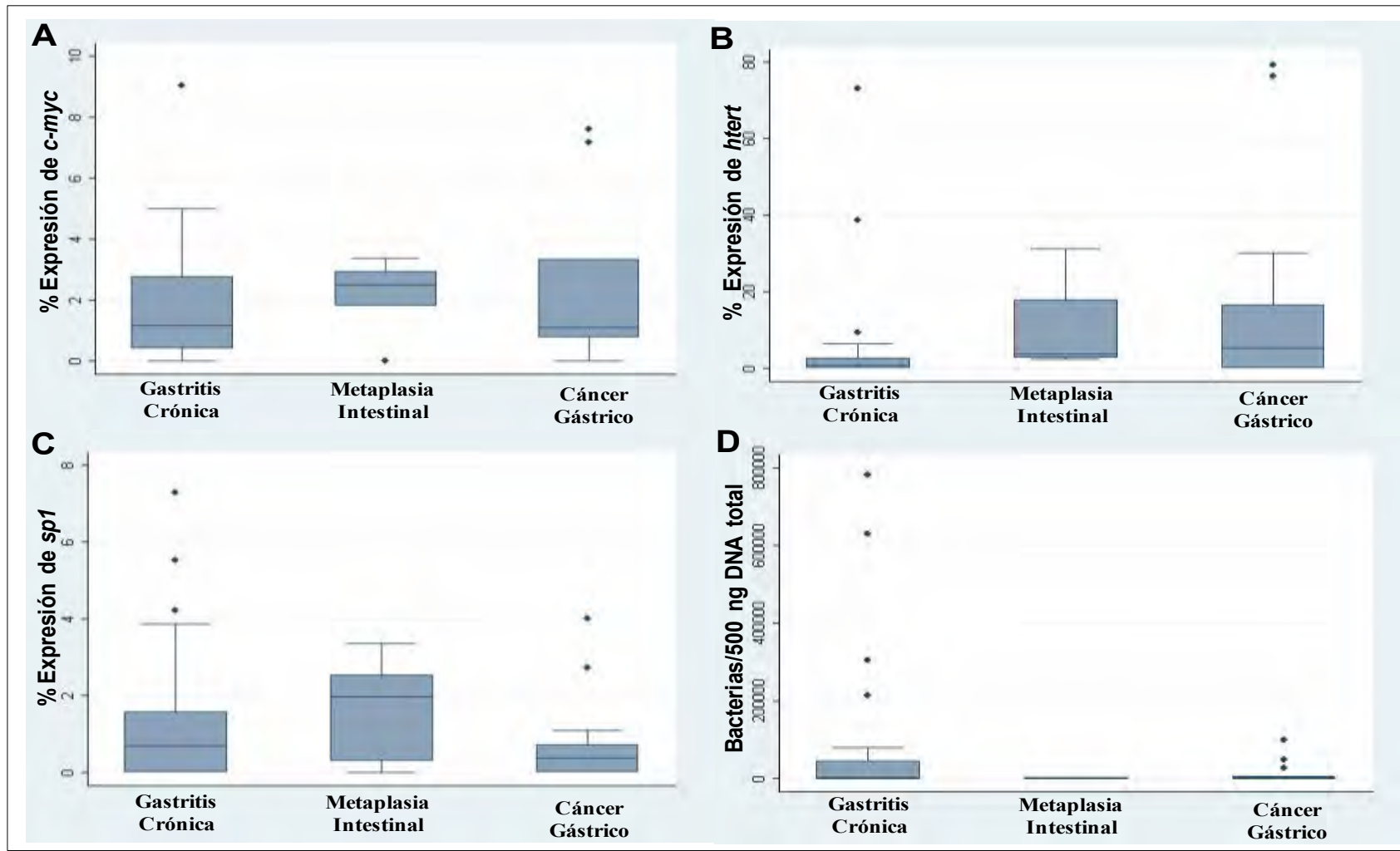


Figura 22. Gráfica de percentiles, mediana y desviación estándar de los grupos gastritis crónica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico (A) Porcentaje de expresión del gen *c-myc*, (B) *htert*, (C) *sp1*, (D) número de bacterias por 500 ng de DNA total.

Se realizó la comparación con la prueba de suma de intervalos de una patología contra otra para cada factor estudiado, los resultados del valor de *P* se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Comparación de la expresión de *c-myc*, *sp1* y *htert* y de la carga bacteriana de *H. pylori* en las patologías estudiadas (Se muestra el valor de *p* de la comparación entre las patologías con la prueba de Log-Rank).

Patología 1 vs Patología 2	<i>c-myc</i>	<i>htert</i>	<i>sp1</i>	<i>Hp</i> (bacterias/500 ng DNA)
Gastritis Crónica vs Metaplasia Intestinal	0.45	0.025	0.57	0.54
Gastritis Crónica vs Cáncer Gástrico	0.15	0.19	0.27	0.15
Metaplasia Intestinal vs Cáncer Gástrico	0.82	0.58	0.3	0.71

En ninguno de los análisis realizados se observaron diferencias significativas entre las patologías estudiadas, esto puede ser debido a que en algunos de los grupos el valor de *n* es pequeño.

8. Discusión

Métodos de detección molecular *H. pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria que se encuentra distribuida en todo el mundo e infecta cerca del 50% de la población; la inflamación gástrica generada a causa de la infección crónica por este microorganismo incrementa el riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico [1, 10].

El cáncer gástrico es la segunda enfermedad maligna más común a nivel mundial, el diagnóstico inicial generalmente es tardío debido a que en cerca del 80% de los pacientes permanecen asintomáticos durante las fases tempranas de la enfermedad, además de que no existe una herramienta eficaz para el diagnóstico temprano. Diferentes riesgos han sido asociados al desarrollo de la enfermedad y su patogénesis es multifactorial, un postulado en relación al desarrollo de esta patología involucra una serie de cambios histológicos que comienzan con gastritis crónica atrófica y avanzan a metaplasia, displasia y cáncer. La progresión de los cambios histológicos mencionados se ha descrito como consecuencia de la infección crónica por *H. pylori* [11], además de que existe evidencia epidemiológica de la asociación de la infección por esta bacteria y el desarrollo de cáncer gástrico [20].

El objetivo principal de este trabajo fue determinar la expresión de *htert*, *sp1* y *c-myc* en biopsias gástricas de pacientes con cáncer gástrico, úlcera péptica y gastritis crónica infectados con *H. pylori* para generar herramientas diagnósticas útiles en la detección temprana del cáncer gástrico; para ello el primer paso se desarrolló una técnica específica y sensible para detectar la presencia de la bacteria en el tejido infectado.

En la actualidad se han establecido diferentes métodos diagnósticos para detección de la infección de *H. pylori* tales como cultivo, prueba rápida de ureasa, serología, detección de antígeno en heces y métodos moleculares como PCR [68].

H. pylori es un microorganismo difícil de recuperar en cultivo, los métodos moleculares son útiles debido a que el cultivo se vuelve prescindible [69]. La detección por PCR es más sensible y específica en comparación con los métodos mencionados anteriormente, además de que ninguna de estas técnicas determina de forma precisa la cantidad de microorganismos presentes en la muestra como el PCR tiempo real.

Existen diferentes métodos de detección y cuantificación de *H. pylori* por PCR tiempo real reportados, en el presente trabajo se diseñaron iniciadores y sondas de detección de *H. pylori* por PCR tiempo real específicas para los genes *flaA* y *ureB* de la bacteria. El método diseñado mostró una sensibilidad de 90 copias para *ureB* y 90,000 copias para *flaA*, (Tabla 12, Figura 19); también reportamos la especificidad de los iniciadores y sondas contra diferentes cepas tipo; en el caso de *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* y *S. aureus* se obtuvo una señal de amplificación después del ciclo 35 con 1 ng de DNA bacteriano (Tabla 13); sin embargo, estas concentraciones de DNA son superiores a lo que encontraríamos en el estómago; es necesario recordar que *H. pylori* es una bacteria capaz de sobrevivir en este ambiente pero otro tipo de bacterias transitorias no tienen la capacidad de colonizar en este nicho .

Michal Mikulaa y cols. en 2003 [70] reportaron un ensayo para detectar el gen SSA (specie-specific-antigen) de *H. pylori* por PCR tiempo real con una sensibilidad de 10 fg de DNA genómico /200 ng del DNA huésped (equivalente a 5 bacterias). Dicho ensayo fue diseñado con SYBR green como agente intercalante y aunque la sensibilidad reportada es mejor a la que nosotros obtuvimos en el presente estudio, no se reportan resultados de especificidad frente a otro tipo de bacterias además de que la cuantificación de DNA se realizó a partir de DNA total de la bacteria, en algunos casos se reportó que la confiabilidad de la cuantificación espectrofotométrica es menor en caso de utilizar DNA genómico frente a DNA plasmídico [66, 67].

Otros autores reportan ensayos de PCR tiempo real para detectar genes de la bacteria tales como *16S rRNA* o *ureC* con sensibilidades inferiores a lo que nosotros encontramos para la detección del gen *ureB* [69, 71]. Alrededor de las 1,000 bacterias en ambos estudios.

El método diseñado para la detección de *H. pylori* en biopsias gástricas ofrece una herramienta confiable y sensible para el diagnóstico oportuno de la infección y este método fue empleado para evaluar la correlación entre la carga bacteriana y la expresión de genes asociados al desarrollo del cáncer gástrico.

Efecto de la densidad de *H. pylori*

Diferentes trabajos han sido publicados en relación al estudio del efecto de la densidad de *H. pylori* en diferentes sitios anatómicos del estómago y la severidad de la patología desarrollada, sin embargo, los resultados son controversiales.

La relación entre la carga bacteriana y el desarrollo de úlcera duodenal en sujetos con gastritis infectados por *H. pylori* que se ha evaluado en diferentes estudios concuerdan en que la cantidad de bacterias que infectan la región de antro del estómago tiene un efecto determinante en el desarrollo de la úlcera duodenal [72, 73]; sin embargo, algunos estudios determinaron que no sólo la carga bacteriana es un factor esencial para el desarrollo de la patología, es necesario considerar factores de patogenicidad propios de la bacteria, tales como la presencia de *cagA*. Hamlet y cols [74] concluyen que la carga bacteriana y el fenotipo de las cepas infectantes (presencia del gen *cagA*) juegan un papel determinante en el desarrollo de la úlcera duodenal. Por su parte Stolte y cols [75] sugieren que además de determinar la densidad bacteriana, existen otros parámetros de importancia para determinar el desarrollo de úlcera duodenal, tales como el recambio celular del epitelio faveolar, la disminución en la producción de moco y el grado de actividad de la gastritis. Otros estudios reportan que no hay asociación significativa entre el desarrollo de úlcera duodenal y la densidad de *H. pylori* [76]; sin embargo, los parámetros que se utilizan para evaluar esta asociación son hallazgos histopatológicos, los cuales mostraron no ser la mejor herramienta para definir esta asociación, debido a la baja sensibilidad y subjetividad en la interpretación [77].

No hay trabajos publicados que estudien el efecto de la densidad bacteriana de *H. pylori* en el desarrollo de adenocarcinoma gástrico. En el presente trabajo nosotros estudiamos la cantidad de bacterias presentes en biopsias gástricas provenientes de pacientes con gastritis crónica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico; en las tablas 17 y 18 se muestra que no encontramos diferencias significativas entre la cantidad de genomas de la bacteria presentes en las biopsias de estas diferentes patologías. Lo que sugiere que su carga no está involucrada de forma directa y quizás el efecto que cause en el epitelio o producción de los factores de virulencia sean más relevantes que el número *per se*.

En la Figura 22 se observa que en las biopsias provenientes de gastritis crónica, la mediana de número de genomas por 500 ng de DNA total es de alrededor de 2,000, mientras que el valor equivalente para metaplasia intestinal y cáncer gástrico es de 100 y 200 aproximadamente, esto podría relacionarse a lo reportado previamente; en la fase aguda de la infección por *H. pylori* hay un incremento en la colonización y proliferación bacteriana [5, 8]; sin embargo, en la secuencia descrita por Correa [10], la inflamación del tejido va generando cambios en el epitelio y se considera que estos cambios alteran la capacidad de colonización de la bacteria en este nicho, por lo que se esperaría una disminución en la cantidad de genomas detectados en tejido con metaplasia y en adenocarcinoma.

De manera descriptiva, este estudio nos muestra que la carga bacteriana muestra una tendencia al aumento de acuerdo a la progresión de la severidad de la gastritis, no así para metaplasia o cáncer gástrico.

Expresión de *c-myc* y cáncer gástrico

El cáncer gástrico es un proceso de patogenia multifactorial que se presenta en etapas. Diferentes alteraciones se han estudiado que están implicadas en el desarrollo de esta patología, se propone que una acumulación de mutaciones llevaría al desarrollo de esta patología. Las principales alteraciones estudiadas en este tipo de neoplasia se presentan en genes supresores de tumores, oncogenes, activación de la telomerasa e inestabilidad cromosómica y moléculas de adhesión celular cada uno en estudios independientes [19].

Entre los oncogenes más estudiados se encuentra *c-myc*. Los controles fisiológicos que regulan la transcripción de los genes *myc* se encuentran alterados en la mayoría de los cánceres humanos, en los cuales los niveles de expresión del RNAm de *c-myc* son elevados [25]. En cáncer gástrico se describió incrementada su expresión a nivel proteico y se asoció también con un pronóstico desfavorable para la recurrencia de la enfermedad después del tratamiento [30], de igual forma fue reportado un incremento en la expresión de esta proteína en la progresión del desarrollo de cáncer gástrico desde gastritis crónica [31].

Recientemente Park y cols [78] reportaron cuantificación del número de copias del gen *c-myc* por PCR tiempo real en biopsias y plasma de pacientes con cáncer gástrico y compararon estos resultados con estudios de hibridación *in situ* fluorescente; se encontró una diferencia significativa entre la proporción Myc/GAPDH en plasma de sujetos con cáncer gástrico vs voluntarios sanos, y dichos valores correlacionaron con los obtenidos en tejido, los autores sugieren que la medición del *c-myc* por PCR tiempo real es una útil herramienta no invasiva de detección para el diagnóstico de cáncer gástrico o para el seguimiento de recurrencia de la enfermedad.

En diferentes tipos de cánceres que evaluaron la expresión de *c-myc* a nivel de RNAm, en cáncer de próstata se encontró una positividad a la expresión del RNAm en aproximadamente 58% de los tumores estudiados [79], en adenocarcinoma de esófago se encontró un 84% [80], en tumores lipomatosos de 44.8% [81]. Sin embargo, no existen aún estudios que reporten la expresión de RNAm de *c-myc* en patologías gástricas precursoras de cáncer gástrico, por lo que en el presente trabajo se evaluó la expresión de *c-myc* por RT-PCR tiempo real en biopsias de pacientes con gastritis crónica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico; en los resultados mostrados en las Figuras 21 y 22 se observó que no existen diferencias significativas en la expresión del gen *c-myc* en las patologías estudiadas. Si comparamos los resultados de los sujetos con gastritis vs metaplasia intestinal y cáncer gástrico, se observa una tendencia al aumento en la expresión de *c-myc*, dicha diferencia no es significativa y correlaciona con lo reportado por Masahide y cols [82], para carcinoma hepatocelular en el cual no existe correlación entre la expresión del RNAm de *c-myc* y la progresión de la enfermedad.

Con los resultados obtenidos no se descarta el papel de *c-myc* en la progresión de patologías precursoras al cáncer gástrico, se establece la hipótesis de que probablemente la expresión de este oncogen podría estar implicada en procesos tardíos del cáncer, tal como la metástasis, ya sea directamente o favoreciendo la expresión de otras moléculas implicadas en metástasis [83].

Expresión de *sp1* y cáncer gástrico

Sp1 es una proteína que posee características estructurales que le permiten actuar como un factor transcripcional y regular la expresión de diferentes genes implicados en desarrollo, proliferación celular, angiogénesis, etc [52].

Diferentes autores determinaron la expresión de Sp1 en cáncer gástrico a nivel de proteína; entre ellos, Zhang y cols en 2005 [49], evaluaron su expresión en tejido gástrico por inmunohistoquímica en sujetos normales y pacientes con cáncer, encontraron 4.2 veces más positividad a la proteína en un 12.5% de los sujetos normales y en 53% de los sujetos con cáncer gástrico; por su parte Yao y cols [84] reportaron un 24% de sobreexpresión y un 54% de expresión débil de Sp1 en tejido gástrico proveniente de cáncer gástrico; además, reportó una correlación con la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

En el presente trabajo nosotros evaluamos la expresión de *sp1* a nivel de RNAm por una técnica cuantitativa en tejido gástrico de pacientes con patologías progresivas a cáncer gástrico, no encontramos diferencias significativas a nivel de los grupos estudiados lo que nos sugiere que la expresión de este factor transcripcional no refleja un incremento con la progresión o bien sólo es debido a la proliferación celular por la inflamación o por la generación del tumor. Aún no existen reportes de la expresión de *sp1* en gastritis crónica o en metaplasia intestinal, este es el primer trabajo que reporta estos resultados.

Expresión de telomerasa y cáncer gástrico

La telomerasa es una enzima que, mediante su actividad de transcriptasa reversa, mantiene la longitud de los telómeros en cada división celular, esta enzima encuentra inactiva en la mayoría de las células somáticas adultas, sin embargo, se detecta cierta actividad en células pertenecientes a tejidos que sufren alto recambio o en células de líneas germinales; la actividad de telomerasa en el 80 al 100% fue detectado de tejidos provenientes de diferentes tipos de cánceres [40].

Entre un 85 a 90% de positividad se encontró un incremento en la expresión del gen y la proteína en cáncer gástrico, por diferentes autores que evaluaron la expresión del RNAm de la subunidad catalítica de la telomerasa (*htert*), esta subunidad codificada por el gen *htert* en humanos, es indispensable para la actividad de la enzima [41-44]. En el presente trabajo evaluamos la expresión del RNAm de *htert* en tejido gástrico de sujetos con gastritis crónica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico, no encontramos diferencias significativas en relación a la patología, previos reportes han determinado que existe una diferencia en la expresión de *htert* a nivel de RNAm [42] y proteína [85], en tejido de cáncer gástrico en relación con tejido no canceroso, dichos estudios han comparado tejido de mucosa normal vs tejido canceroso, sin embargo en una población de sujetos como la de nuestro país donde las conductas sociales cada vez contribuyen más fuertemente al desarrollo de gastritis, el considerar biopsias de sujetos con un proceso de gastritis leve podría darnos una evidencia más acorde a nuestra realidad.

Aunque en el análisis estadístico de los resultados no se encontraron diferencias significativas en la expresión de *htert* en los grupos estudiados, en la Figura 22 se observa que si existe un incremento en los grupos con metaplasia intestinal y cáncer gástrico, sin embargo en el grupo de gastritis crónica existen resultados con desviaciones muy altas, tal vez estas desviaciones pudieran sugerir sujetos con mayor riesgo inicial de llegar a l desarrollo de cáncer gástrico, para determinar esto se podría realizar un estudio de seguimiento de los casos con gastritis crónica y evaluar la expresión de *htert*.

Existen estudios que evaluaron previamente de forma individual los factores que nosotros estudiamos de manera integral en el presente trabajo, se definió la expresión de *htert*, *sp1* y *c-myc* en cáncer gástrico en otros trabajos de forma aislada, en el presente se describe el comportamiento de la expresión a nivel de RNA de estos tres genes y se estudió la existencia de una asociación de la misma con la cantidad de bacterias presente en la mucosa gástrica proveniente de sujetos con diferentes patologías, se observaron tendencias claras al incremento en la expresión de estos genes en patologías tales como metaplasia intestinal y cáncer gástrico. Este estudio sugiere que la medición conjunta de marcadores nos permitirá tener una mayor certeza en el seguimiento de padecimientos tales como cáncer gástrico.

9. Conclusiones

- La carga de *H. pylori* fue diferente en los sujetos con gastritis, metaplasia intestinal y cáncer gástrico.
- La expresión de *c-myc*, *spl* y *htert* mostró una tendencia al incremento conforme el grado de la patología gástrica aumentaba en severidad.
- El análisis de múltiples marcadores moleculares en la progresión a cáncer gástrico permitió identificar sujetos con mayor riesgo a padecer patologías más severas.

10. Perspectivas

En estudios posteriores se propone estudiar el efecto conjunto de un grupo mayor de genes en la progresión de enfermedades gástricas asociadas a *H. pylori*, con la finalidad de poder identificar los estadios tempranos del desarrollo de cáncer gástrico.

11. Referencias

1. Marshall, B.J., One Hundred Years of discovery and rediscovery of *Helicobacter pylori* and its association with peptic ulcer disease, in *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, H.T. Mobley, Editor. 2001, ASM Press: Washington DC. p. 19-24.
2. Kelly, D.J., One Microaerobic physiology: Aerobic respiration, Anaerobic respiration, and Carbon dioxide metabolism, in *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, H.T. Mobley, Editor. 2001, ASM Press: Washington, D.C. p. 113-124.
3. Versalovic, J., *Helicobacter*, en *Manual of Clinical Microbiology*, P.R. Murray, Editor. 2003, ASM Press: Washington, DC. p. 915-923.
4. Koneman, E.W., Curved Gram-Negative Bacilli and Oxidase-Positive Fermenters: Campylobacteriaceae and Vibrionaceae, en *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, E.W. Koneman, Editor. 1997, Lippincott Williams & Wilkins. p. 303-338.
5. Hocker, M., Hohenberger P., *Helicobacter pylori* virulence factors--one part of a big picture. *Lancet*, 2003. 362(9391): p. 1231-3.
6. Torres, J., et al., A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis*, 1998. 178(4): p. 1089-94.
7. 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.
8. Blaser, M.J. and J. Parsonnet, Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J Clin Invest*, 1994. 94(1): p. 4-8.
9. Globocan. *CANCER*Mondial. 2002; En: <http://www-dep.iarc.fr/>.
10. Suerbaum, S. and P. Michetti, *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*, 2002. 347(15): p. 1175-86.
11. Ohata, H., et al., Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. *Int J Cancer*, 2004. 109(1): p. 138-43.

12. Zhang, C., et al., *Helicobacter pylori* infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2005. 11(6): p. 791-6.
13. Leung, W.K., et al., Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: results of a randomised trial on *Helicobacter pylori* eradication. *Gut*, 2004. 53(9): p. 1244-9.
14. Lamarque, D. and J. M. Peek R, Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 2003. 8 Suppl 1: p. 21-30.
15. Spohn, G., Motility, Chemotaxis, and Flagella, in *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, H.T. Mobley, Editor. 2001, ASM Press: Washington, D.C. p. 239-248.
16. Montecucco, C. and R. Rappuoli, Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(6): p. 457-66.
17. Testerman, T.L., Adherence and colonization, in *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, H.T. Mobley, Editor. 2001, ASM Press: Washington, D.C. p. 381-417.
18. Stein, M., The *cag* pathogenicity island, en *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, H.T. Mobley, Editor. 2001, ASM Press: Washington, D.C. p. 381-417.
19. Shang, J. and A.S. Pena, Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2005. 11(27): p. 4131-9.
20. Asaka, M., Gastric Cancer, en *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, H.T. Mobley, Editor. 2001, ASM Press: Washington, D.C. p. 381-417.
21. IARC. IARC Monographs Vol. 61 *Helicobacter pylori* Infection. 2008; En: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol61/mono61-8.pdf>.
22. Mills, A.A., p53: link to the past, bridge to the future. *Genes Dev*, 2005. 19(18): p. 2091-9.
23. Fenoglio-Preiser, C.M., et al., TP53 and gastric carcinoma: a review. *Hum Mutat*, 2003. 21(3): p. 258-70.
24. Lewin, B., Oncogenes y Cancer, in *Genes VII*, B. Lewin, Editor. 2001, Oxford University Press: Madrid, España. p. 875-912.
25. Adhikary, S. and M. Eilers, Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. 6(8): p. 635-45.

26. Gartel, A.L. and K. Shchors, Mechanisms of *c-myc*-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res*, 2003. 283(1): p. 17-21.
27. Vermeulen, K., Z.N. Berneman, and D.R. Van Bockstaele, Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*, 2003. 36(3): p. 165-75.
28. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 2003. 36(3): p. 131-49.
29. Lutz, W., J. Leon, and M. Eilers, Contributions of Myc to tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1602(1): p. 61-71.
30. Han, S., et al., c-Myc expression is related with cell proliferation and associated with poor clinical outcome in human gastric cancer. *J Korean Med Sci*, 1999. 14(5): p. 526-30.
31. Xu, A.G., et al., Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and C-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2001. 7(3): p. 403-6.
32. Yang, G.F., et al., Expression of nuclear factor-kappa B and target genes in gastric precancerous lesions and adenocarcinoma: association with *Helicobacter pylori* cagA (+) infection. *World J Gastroenterol*, 2004. 10(4): p. 491-6.
33. Morin, G.B., The implications of telomerase biochemistry for human disease. *Eur J Cancer*, 1997. 33(5): p. 750-60.
34. Lingner, J. and T.R. Cech, Telomerase and chromosome end maintenance. *Curr Opin Genet Dev*, 1998. 8(2): p. 226-32.
35. Blackburn, E.H., Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett*, 2005. 579(4): p. 859-62.
36. Ulaner, G.A., Telomere maintenance in clinical medicine. *Am J Med*, 2004. 117(4): p. 262-9.
37. Blasco, M.A., Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*, 2005. 6(8): p. 611-22.
38. Shay, J.W. and W.E. Wright, Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, 2005. 26(5): p. 867-74.

39. Artandi, S.E. and L.D. Attardi, Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 331(3): p. 881-90.
40. Shay, J.W. and S. Bacchetti, A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, 1997. 33(5): p. 787-91.
41. Hiyama, T., et al., *In situ* mRNA hybridization technique for analysis of human telomerase RNA in gastric precancerous and cancerous lesions. *Jpn J Cancer Res*, 1998. 89(11): p. 1187-94.
42. Yasui, W., et al., Expression of telomerase catalytic component, telomerase reverse transcriptase, in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res*, 1998. 89(11): p. 1099-103.
43. Maruyama, Y., et al., Telomere length and telomerase activity in carcinogenesis of the stomach. *Jpn J Clin Oncol*, 1997. 27(4): p. 216-20.
44. Nakamura, Y., et al., Quantitative reevaluation of telomerase activity in cancerous and noncancerous gastrointestinal tissues. *Mol Carcinog*, 1999. 26(4): p. 312-20.
45. Kameshima, H., et al., *Helicobacter pylori* infection: augmentation of telomerase activity in cancer and noncancerous tissues. *World J Surg*, 2000. 24(10): p. 1243-9.
46. Hur, K., et al., Overexpression of human telomerase RNA in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Jpn J Cancer Res*, 2000. 91(11): p. 1148-53.
47. Chung, I.K., et al., *Helicobacter pylori* and telomerase activity in intestinal metaplasia of the stomach. *Korean J Intern Med*, 2002. 17(4): p. 227-33.
48. Shao, J.C., et al., Relationship between the expression of human telomerase reverse transcriptase gene and cell cycle regulators in gastric cancer and its significance. *World J Gastroenterol*, 2003. 9(3): p. 427-31.
49. Zhang, G.X., et al., Coordinate increase of telomerase activity and c-Myc expression in *Helicobacter pylori*-associated gastric diseases. *World J Gastroenterol*, 2004. 10(12): p. 1759-62.
50. Liu, L., et al., Genetic and epigenetic modulation of telomerase activity in development and disease. *Gene*, 2004. 340(1): p. 1-10.
51. Cerni, C., Telomeres, telomerase, and *myc*. An update. *Mutat Res*, 2000. 462(1): p. 31-47.

52. Suske, G., The Sp-family of transcription factors. *Gene*, 1999. 238(2): p. 291-300.
53. Koutsodontis, G., A. Moustakas, and D. Kardassis, The role of Sp1 family members, the proximal GC-rich motifs, and the upstream enhancer region in the regulation of the human cell cycle inhibitor p21WAF-1/Cip1 gene promoter. *Biochemistry*, 2002. 41(42): p. 12771-84.
54. Innocente, S.A. and J.M. Lee, p53 is a NF-Y- and p21-independent, Sp1-dependent repressor of cyclin B1 transcription. *FEBS Lett*, 2005. 579(5): p. 1001-7.
55. Zhang, J., et al., Transcription factor Sp1 expression in gastric cancer and its relationship to long-term prognosis. *World J Gastroenterol*, 2005. 11(15): p. 2213-7.
56. Cheng, H.R. and N. Jiang, Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol Lett*, 2006. 28(1): p. 55-9.
57. AppliedBiosystems. *Gene Expression Assays*. 2008; En: <http://www.allgenes.com>.
58. GenBank®. *Gene Database*. 2007; En: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
59. CLUSTAL-W. *Multiple Sequence Alignment program for DNA or proteins*. 2007; En: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>.
60. Hann, S.R. and R.N. Eisenman, Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol Cell Biol*, 1984. 4(11): p. 2486-97.
61. Spotts, G.D., et al., Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol Cell Biol*, 1997. 17(3): p. 1459-68.
62. Wick, M., D. Zubov, and G. Hagen, Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene*, 1999. 232(1): p. 97-106.
63. Ulaner, G.A., et al., Tissue-specific alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) influences telomere lengths during human development. *Int J Cancer*, 2001. 91(5): p. 644-9.
64. Barclay, J.Y., A.G. Morris, and C.U. Nwokolo, HTERT mRNA partially regulates telomerase activity in gastric adenocarcinoma and adjacent normal gastric mucosa. *Dig Dis Sci*, 2005. 50(7): p. 1299-303.
65. BLAST. *Nucleotide BLAST*. 2007; En: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

66. Dorak, M.T. Fundamentos PCR Tiempo Real. 2009; En: <http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>.
67. AppliedBiosystems. Relative Quantification Getting Started Guide. 2008; En: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041435.pdf.
68. Ruzsovcics, A., B. Molnar, and Z. Tulassay, Review article: Deoxyribonucleic acid-based diagnostic techniques to detect *Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther, 2004. 19(11): p. 1137-46.
69. He, Q., et al., Real-time quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol, 2002. 40(10): p. 3720-8.
70. Mikula, M., et al., Quantitative detection for low levels of *Helicobacter pylori* infection in experimentally infected mice by real-time PCR. J Microbiol Methods, 2003. 55(2): p. 351-9.
71. Rinttila, T., et al., Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. J Appl Microbiol, 2004. 97(6): p. 1166-77.
72. Khulusi, S., et al., *Helicobacter pylori* infection density and gastric inflammation in duodenal ulcer and non-ulcer subjects. Gut, 1995. 37(3): p. 319-24.
73. Alam, K., et al., Increased density of *Helicobacter pylori* on antral biopsy is associated with severity of acute and chronic inflammation and likelihood of duodenal ulceration. Am J Gastroenterol, 1992. 87(4): p. 424-8.
74. Hamlet, A., et al., Duodenal *Helicobacter pylori* infection differs in cagA genotype between asymptomatic subjects and patients with duodenal ulcers. Gastroenterology, 1999. 116(2): p. 259-68.
75. Stolte, M., et al., Relationships between the degree of *Helicobacter pylori* colonisation and the degree and activity of gastritis, surface epithelial degeneration and mucus secretion. Z Gastroenterol, 1995. 33(2): p. 89-93.
76. Nai, G.A., A.C. Parizi, and R.L. Barbosa, Association between *Helicobacter pylori* concentration and the combining frequency of histopathological findings in gastric biopsies specimens. Arq Gastroenterol, 2007. 44(3): p. 240-3.

77. Kobayashi, D., et al., Gastric mucosal density of *Helicobacter pylori* estimated by real-time PCR compared with results of urea breath test and histological grading. *J Med Microbiol*, 2002. 51(4): p. 305-11.
78. Park, K.U., et al., MYC quantitation in cell-free plasma DNA by real-time PCR for gastric cancer diagnosis. *Clin Chem Lab Med*, 2009. 47(5): p. 530-6.
79. Latil, A., et al., htert expression correlates with MYC over-expression in human prostate cancer. *Int J Cancer*, 2000. 89(2): p. 172-6.
80. Tselepis, C., et al., Upregulation of the oncogene c-myc in Barrett's adenocarcinoma: induction of c-myc by acidified bile acid *in vitro*. *Gut*, 2003. 52(2): p. 174-80.
81. Schneider-Stock, R., et al., Elevated telomerase activity, c-MYC-, and hTERT mRNA expression: association with tumour progression in malignant lipomatous tumours. *J Pathol*, 2003. 199(4): p. 517-25.
82. Ikeguchi, M. and Y. Hirooka, Expression of c-myc mRNA in hepatocellular carcinomas, noncancerous livers, and normal livers. *Pathobiology*, 2004. 71(5): p. 281-6.
83. Ma, L., et al., miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*, 2010. 12(3): p. 247-56.
84. Yao, J.C., et al., Association between expression of transcription factor Sp1 and increased vascular endothelial growth factor expression, advanced stage, and poor survival in patients with resected gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(12 Pt 1): p. 4109-17.
85. Yasui, W., et al., Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in normal mucosa and precancerous lesions of the stomach. *Jpn J Cancer Res*, 1999. 90(6): p. 589-95.