

Bioquímia

Volumen
Volume **30**

Número
Number **1**

Enero-Marzo
January-March **2005**

Artículo:

Relación entre la infección por *Helicobacter pylori* y el desarrollo de metaplasia en pacientes con gastritis crónica

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Medigraphic.com

Relación entre la infección por *Helicobacter pylori* y el desarrollo de metaplasia en pacientes con gastritis crónica[§]

Rodolfo Ocádiz-Delgado,* Sergio Sobrino-Cossío,** Lilia García-García,* Alberto Marroquín-Chavira,* Ruth Hernández-Mote,*** Patricio Gariglio*

RESUMEN

La metaplasia gástrica es una consecuencia de la gastritis crónica (GC). Los pacientes con esta condición frecuentemente están infectados por *Helicobacter pylori* (*Hp*), teniendo un mayor riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico. Se han descrito diferentes marcadores de patogenicidad de *Hp* tales como los genes *ureC*, *vacA* y *cagA*. Existen evidencias de que las citotoxinas y enzimas codificadas por estos genes son responsables del daño directo a la mucosa epitelial. Con base en lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue establecer una relación entre la presencia de las cepas patógenas de *Hp* y la progresión de metaplasia en pacientes con el GC. Detectamos la presencia de cepas positivas para los genes *ureC*, *cagA* y *vacA* en pacientes con GC, y utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), analizamos 130 muestras de cardias y antró gástrico obtenidas a partir de 65 pacientes con diagnóstico de GC (edad promedio: 43.3 años). Encontramos que el 92% de los pacientes con GC fueron positivos a *Hp*; el 6% de los pacientes con GC fueron diagnosticados con esófago de Barrett, el 50% de estos pacientes fueron positivos ya sea para cepas *ureC*(+), *cagA*(+) y/o *vacA*(+). En este estudio se observó que los pacientes diagnosticados con GC, los cuales estaban infectados con cepas de alta patogenicidad, presentaron una marcada tendencia a desarrollar metaplasia. Estos resultados sugirieron que las cepas de alta patogenicidad de *Hp*, combinada con GC son factores de riesgo para el desarrollo de una condición precancerosa.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, gastritis crónica, metaplasia, esófago de Barrett.

ABSTRACT

*Gastric metaplasia progression is a consequence of chronic gastritis (CG). Patients with this condition are frequently infected by Helicobacter pylori (Hp) and show several symptoms including gastric ulcer formation. In addition, they present an increased risk for the development of gastric adenocarcinoma. Various pathogenicity markers for Hp such as *ureC*, *vacA* and *cagA* genes have been described. Evidence indicates that direct injury to the epithelial mucosa is caused by cytotoxins and enzymes codified by these genes. The aim of this study was to establish a relationship between the presence of pathogenic Hp strains and metaplasia progression in patients with CG. For better understanding the progression of gastroesophageal metaplasia, we detected the presence of Hp *ureC*, *cagA* and *vacA* positive strains in patients with CG. Using the polymerase chain reaction (PCR), we have analyzed 130 samples obtained from 65 patients with CG (mean age: 43.3 years), including samples from two anatomical areas: cardia and gastric antral. We have detected that 92% of CG patients are Hp positive compared to approximately 50% in normal persons older than 40 years (reported previously by other groups); 6% of the CG patients were diagnosed as Barrett's Esophagus positive, 50% of these patients were positive for either *ureC*(+), *cagA*(+) and/or *vacA*(+) Hp strains. A strong tendency to develop metaplasia was observed in those patients diagnosed with CG that were infected with high-pathogenicity-strains in both anatomical areas. These results suggest that infection with high-pathogenicity Hp strains, combined with CG can be considered a major risk factor to develop a precancerous condition.*

Key words: *Helicobacter pylori*, *chronic gastritis*, *metaplasia*, *Barrett esophagus*.

* Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN).

** Unidad de Endoscopía, Servicio de Gastroenterología, Hospital General de México-SS.

*** Departamento de Patología, Hospital Infantil de México-SS.

México D.F., México

[§]Trabajo ganador del Premio CARPERMOR 2004 en la categoría B.

Correspondencia:

Dr. Patricio Gariglio. Profesor Titular Departamento de Genética y Biología Molecular CINVESTAV-IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco. CP 07360 México, D.F. México. Fax: (52-55) 50 61 33 32. e-mail: vidal@mail.cinvestav.mx

Recibido: 28-09-2004

Aceptado: 08-12-2004

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*Hp*) es un patógeno bien reconocido como causante de la gastritis crónica activa (GC) en seres humanos y desempeña un papel significativo en el desarrollo y recurrencia de las úlceras gástricas y duodenales, del cáncer gástrico y del linfoma gástrico primario de células B.¹⁻⁷ Debido a que la incidencia del adenocarcinoma de cardias gástrico se ha incrementado rápidamente en los Estados Unidos, Europa Occidental y en México,⁸⁻¹⁰ y dado que se asocia a la infección por *Hp*, la Organización Mundial de la Salud declaró en 1994 a la infección por *Hp* como agente cancerígeno del grupo 1 (una causa definitiva de neoplasias en humanos, similares al tabaco).¹¹ Su distribución mundial, la alta prevalencia (> 50% en población normal de más de 40 años) y la importancia de padecimientos asociados, hacen que la detección y la eliminación de *Hp* sea un medio útil para el tratamiento y control de enfermedades gastroduodenales. Interesantemente, su erradicación da lugar a una marcada reducción en el índice de la recurrencia de úlceras duodenales y gástricas.¹² Además, la diferencia en la virulencia entre cepas bacterianas pueden explicar porqué apenas una minoría de pacientes infectados desarrolla carcinoma gástrico, sugiriendo la participación de otros factores directa o indirectamente asociados (estado nutricional, alteraciones de proto-oncogenes y anti-oncogenes).^{13,14} Se sospecha que existen diferentes propiedades que comúnmente se asocian a *Hp*, mismas que participan en el proceso patogénico de la gastritis así como en la formación de úlceras. Estas propiedades incluyen: la adhesión de la bacteria al epitelio gástrico y la producción de enzimas y de citotoxinas. Se ha descrito también que la producción de la ureasa es uno de los mecanismos que *Hp* utiliza para sobrevivir y colonizar la mucosa gástrica. También se identificó un gen que codifica para un polipéptido importante involucrado con la actividad de la ureasa denominado *ureC* y que está presente en la mayoría de las cepas de *Hp*.¹⁵ El gen A del antígeno asociado a citotoxina (*cagA*) de *Hp* codifica para una proteína de 138-kDa la cual está involucrada en la producción de una toxina vacuolizante.^{6,16-18} La presencia de cepas *Hp cagA(+)* y la respuesta serológica a la proteína *cagA* están asociadas al desarrollo de úlcera péptica y cáncer gástrico.^{16,19,20} Se ha reportado que la infección por cepas *cagA(+)* induce una respuesta inflamatoria que se distingue por una gran densidad de células polimorfonucleares en la mucosa gástrica.²¹ Otro factor de virulencia, producido por aproximadamente el 50% de las cepas de *Hp*,

es una citotoxina codificada por el gen *vacA* la cual induce la formación de vacuolas en células cultivadas *in vitro*, mientras que *in vivo*, esta citotoxina tiene la capacidad de inducir a apoptosis y la subsecuente regeneración epitelial con cambios celulares importantes.²²⁻²⁴ La evidencia muestra un daño directo a la mucosa epitelial mediada por citotoxinas y por enzimas codificadas por estos tres genes, los cuales están desempeñando probablemente un papel importante en la carcinogénesis gástrica.²⁵⁻²⁷ En este sentido, el esófago de Barrett (EB) es una complicación del reflujo gastrosesofágico crónico (RGC) en el cual el epitelio normal estratificado del esófago es reemplazado por un epitelio columnar metaplásico especializado.^{28,29} Este cambio puede progresar a displasia y se asocia con un riesgo incrementado en 125 veces desarrollando un adenocarcinoma gástrico.³⁰ Actualmente, se estima que del 8 al 12% de los pacientes con GC desarrollarán EB. En estos pacientes, la prevalencia de adenocarcinoma gástrico es del 7 a 16%.^{31,32} Existen datos histológicos y citométricos que sugieren una progresión secuencial de la metaplasia especializada de Barrett a displasia y finalmente a adenocarcinoma gástrico relacionado con la presencia de cepas de *Hp*.^{33,34} El objetivo de este estudio fue desarrollar un método endoscópico-reacción en cadena de la polimerasa (E-PCR) para la detección de *Hp* y establecer una correlación entre la incidencia de metaplasia, EB y la presencia de cepas de *Hp ureC*, *cagA* y *vacA* positivas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se incluyeron en este estudio 65 pacientes sin tratamiento previo, los cuales acudieron a endoscopía gastroduodenal superior. La población consistió de 46 hombres y 19 mujeres con una edad promedio de 43.3 años (rango de 26 a 76 años) (*Cuadro I*).

Endoscopía y recolección de biopsias

Al menos 5 biopsias de antro gástrico y 4 de cardias fueron colectadas de cada uno de los pacientes para: determinación de la prueba rápida de la ureasa (una muestra de antro), análisis histológico (dos muestras de antro y dos de cardias) y dos muestras más para análisis molecular por PCR. Las muestras destinadas para PCR fueron congeladas inmediatamente a -70°C hasta su procesamiento. La zona escogida para el análisis molecular fue determinada por la disponibilidad de tejido y por la experiencia del endoscopista.

Tanto el equipo endoscópico (Olympus GIF-IT), así como los fórceps para la toma de muestra fueron cuidadosamente desinfectados por inmersión en una solución de glutaraldehído al 2% (Cidex; Ltd., Livingstone, Escocia) durante 15 min, se enjuagaron en agua y fueron secados después de cada sesión de endoscopía.

Análisis histopatológico

Todas las muestras fueron fijadas en una solución amortiguada de formol al 10% e incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 5 μ m para tinción con hematoxilina-eosina y posteriormente ser revisadas histológicamente. Las muestras fueron clasificadas de acuerdo al grado de severidad de gastritis. También, se realizaron tinciones con Giemsa para detectar a *Hp*. La clasificación y grado de gastritis se realizó de acuerdo con el sistema de Sydney.³⁵ La clasificación de los pacientes con EB se llevó a cabo mediante la identificación de células características y de la presencia de metaplasia en el cardias (*Cuadro I*). Las biopsias de antro gástrico fueron analizadas mediante la prueba rápida de la ureasa (CU-test),³⁶ los resultados fueron capturados después de 30 minutos de incubación.

Definición de los casos

Los pacientes fueron clasificados como positivos para *Hp* con base en: la prueba rápida de la ureasa, identificación histológica y la detección mediante PCR de uno o más genes detectados.

Análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los tejidos fueron congelados en nitrógeno líquido y posteriormente homogenizados en 1 mL de DNAzol

(Invitrogen; EUA) por cada 50 mg de tejido con un mortero de teflón. El homogenizado fue centrifugado durante 10 minutos a 10,000 X g a 4°C. El sobrenadante fue recuperado (0.5 mL) y los ácidos nucleicos fueron precipitados añadiendo 0.5 mL de etanol absoluto. Las muestras fueron centrifugadas a 4,000 X g durante 2 minutos a temperatura ambiente. Las pastillas fueron lavadas con 1 mL de etanol al 95%. Las muestras de ADN fueron resuspendidas en 100 μ L de solución amortiguadora TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA). Finalmente, las muestras fueron cuantificadas en un espectrofotómetro Perkin-Elmer MBA 2000 y almacenadas a 4°C hasta su análisis.

ADN genómico de cepas de referencia de *Hp*

Se aislaron y caracterizaron bioquímicamente cepas de *Hp* de referencia. Estas cepas fueron crecidas en caldo brucella (Difco, EUA) como se ha descrito previamente.³⁷ El ADN fue purificado y amplificado para determinar el límite de detección mediante PCR. Se realizaron diluciones seriadas de ADN purificado en solución amortiguadora TE estéril y fueron amplificadas de acuerdo a lo indicado más adelante. Como controles negativos se incluyó ADN obtenido de cepas de *E. coli* (HB101; DH5 α), así como ADN de muestras no relacionadas con problemas gástricos (linfocitos humanos normales, o ADN de biopsias de cáncer cervical).

Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía Invitrogen (EUA). Las secuencias pre-validatedas,^{15-17,19,38} las temperaturas de alineamiento (Tm), así como el tamaño de los productos de PCR esperados se muestran en el *cuadro I*. Los oligonucleótidos dirigidos contra el gen *ureC*, fueron derivados de la secuencia depositada en bancos genómicos (EMBL

Cuadro I. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de secuencias específicas para *Helicobacter pylori*.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Tm	Producto de amplificación (pb)
<i>ureC-1s</i>	aag ctt tta ggg gtg tta ggg gtt t	55°C	294 bp
<i>ureC-2as</i>	aag ctt act ttc taa cac taa cgc		
<i>cagA-1s</i>	aat aca cca acg cct cca ag	59°C	400 bp
<i>cagA-2as</i>	ttg ttg cgg ctt ttg ctc tc		
<i>vacA-1s</i>	tgc aat ccg aac tga ctc aaa atg cgc tt	60°C	449 bp
<i>vacA-2as</i>	gtg att aac ccg cct gta ccg ata cga acc		

s: sentido; as: antisentido

número de acceso X57132 y GenBank número de acceso M60398).^{15,38} Los oligonucleótidos para el gen *cagA*, fueron seleccionados a partir de regiones de secuencias consenso (GenBank número de acceso L11714 y EMBL número de acceso X70039)^{16,17}. Para la amplificación de *vacA*, los oligonucleótidos fueron seleccionados a partir de la secuencia del gen (GenBank, número de acceso AF049652).³⁹

Condiciones de amplificación

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer modelo Gene Amp PCR System 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Connecticut, EU). Las mezclas de reacción incluyeron 0.2 μ M de cada oligonucleótido, utilizando soluciones premezcladas (Supermix, Invitrogen, EUA) que contenían 0.2 μ M de cada deoxinucleótido trifosfato: dATP, dGTP, dCTP y dTTP; 20 mM Tris-HCl pH 7.4; 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ y 2.2 unidades de Taq ADN polimerasa. Se analizó 1 μ g de ADN de cada muestra por reacción. Las condiciones de amplificación para cada uno de los genes fueron, para *ureC*: 2 min desnaturación a 94°C, 2 min alineamiento a 55°C, y 2 min de polimerización a 72°C durante 35 ciclos. Para el gen *cagA*: 1 min para la desnaturación a 94°C, 1 min de alineamiento a 59°C, y 1 min de síntesis a 72°C durante 35 ciclos. Para el gen *vacA*, los ciclos fueron: 30 segundos a 94°C para la desnaturación, 1 min a 60°C para el alineamiento y 1 min a 72°C para la síntesis durante 30 ciclos.⁴⁰ Como control positivo se utilizó ADN purificado a partir de una cepa de *Hp* (bioquímicamente caracterizada), mientras que como controles negativos se utilizó ADN obtenido a partir de un paciente sin infección por *Hp* y un tubo contenido agua en lugar de ADN. Todos los ensayos fueron llevados a cabo al menos en tres ocasiones por separado.

Detección y análisis de los productos de PCR para los genes *ureC*, *cagA* y *vacA*.

Fueron analizados 10 μ L de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (Sigma, EUA; en solución amortiguadora TAE 1x, teñidos con bromuro de etidio). La especificidad de cada fragmento amplificado fue corroborada mediante digestión con endonucleasas de restricción por 1 h a 37°C en solución amortiguadora recomendada por el fabricante (Invitrogen, EUA). Para el gen *ureC*, el producto de PCR de 294 pares de bases (pb) fue digerido con la enzima *SphI* generando fragmentos de

restricción de 168 y 126 pb. Para el gen *cagA*, el producto de 400 pb fue digerido con la enzima *HindIII*, la cual generó fragmentos de 195, 159 y 46. Finalmente, para el producto de PCR de *vacA* de 449 pb se empleó la enzima *BamHI* la cual generó fragmentos de 243 y 206 pb. Las muestras digeridas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%, teñidas con bromuro de etidio.⁴⁰

RESULTADOS

Pacientes.

En el cuadro II se muestran las características clínicas de los 65 pacientes con alteraciones gástricas que se incluyeron en este estudio. Se observó una mayor proporción de hombres que de mujeres (46H/19M). El 77% de los pacientes mostraron metaplasia intestinal así como presencia de células polimorfonucleares.

Ensayos de amplificación (PCR).

Sensibilidad. Para determinar el límite inferior de detección de nuestros ensayos, se realizaron diluciones seriadas (10 ng to 0.1 pg) de ADN obtenido a partir de cepas de referencia de *Hp* (Figura 1), amplificando hasta 1 pg de ADN bacteriano utilizando nuestras condiciones.

Especificidad. En muestras controles de cepas de referencia o biopsias de pacientes positivos a *Hp*, se obtuvieron los productos de PCR esperados (294-, 400- y 449-pb; *ureC*, *cagA* y *vacA*, respectivamente) (Figura 2). En el caso de los ensayos empleando ADN genómico humano así como de *E. coli*, no se obtuvo ningún producto de amplificación de acuerdo a lo esperado (datos no mostrados).

Detección de secuencias de *Hp*. Muestras de antro gástrico así como de cardias fueron analizadas para la detección de infección por *Hp*. Independientemente del genotipo detectado, *Hp* se localizó infectando ambas zonas anatómicas pues se localizaron los genes *ureC*, *cagA*, *vacA* solos o sus combinaciones (Cuadro III, Figura 3). También se detectaron diferentes cepas con genotipos distintos en el 92% de los pacientes analizados. Las secuencias *ureC*, *cagA* y *vacA* fueron detectadas en forma individual en el 2%, 2% y 15%, respectivamente en antro gástrico, y en el 9%, 5% y 0% en cardias como se indica en el cuadro III y en la figura 3. Fueron detectadas frecuentemente infecciones mixtas en ambos sitios anatómicos; interesantemente, la frecuencia de infecciones con genotipos triples fue del doble en cardias (38%) en comparación con antro gástrico

Cuadro II. Características clínicas de pacientes con gastritis crónica incluidos en este estudio (n= 65).

Característica	
Edad promedio (años)	43.3 (rango: 26-76)
Sexo (hombre:mujer)	46:19
Fumadores	37 %
Alcoholismo	22 %
Hallazgos endoscópicos	
Gastritis	
Severa	62%
Media	25%
Leve	13%
Evolución (meses)	14.7 (rango: 3-30)
Esófago de Barrett	6 % (4/65)
Células polimorfonucleares	
Antro	34%
Cardias	26%
Metaplasia intestinal	
Antro	40%
Cardias	37%
Gastritis crónica en antro	82 %
Gastritis crónica en cardias	79 %

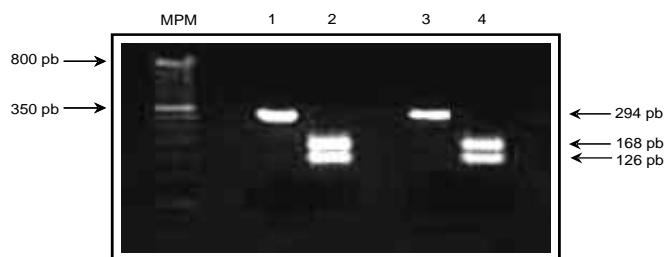


Figura 1. Sensibilidad de los protocolos de PCR. La sensibilidad para la detección de *Hp* fue determinada analizando diluciones seriadas de ADN genómico obtenido a partir de cepas control de *Hp*. Los ADNs templados fueron amplificados utilizando oligonucleótidos específicos para *vacA* (fragmento de 449 pb) (ver material y métodos). Los carriles 1 a 6 representan las diferentes cantidades de ADN templado: 10, 1 y 0.1 ng; 10, 1 y 0.1 pg respectivamente. En el carril MPM (marcador de peso molecular) se incluyó un marcador escalera de 100 pb (New England Biolabs, EUA).

(18%). Además, para confirmar la autenticidad de los productos de PCR, se realizaron ensayos con endonucleasas de restricción obteniéndose en todos los casos los tamaños esperados (Figura 4).

Concordancia de los hallazgos

Considerando las características clínicas, histológicas y genéticas de las muestras gástricas, intentamos es-

tablecer una relación entre los perfiles clínicos, la presencia de *Hp* y la detección de diferentes secuencias relacionadas con actividad patogénica.

DISCUSIÓN

Este estudio describe la detección de cepas positivas a secuencias *ureC*, *cagA* y *vacA* en dos sitios anatómicos en pacientes mexicanos (Cuadro III y Figura 5). Hemos detectado a las tres principales cepas patogénicas de *Hp*, empleando un método que demuestra ser altamente sensible y específico. El análisis mediante PCR del ADN obtenido a partir de biopsias gástricas no requiere el cultivo de la bacteria y por lo tanto se disminuye el tiempo invertido para cada ensayo, además, nuestros resultados proporcionan evidencia directa de la presencia de genotipos específicos en la mucosa gástrica. Es posible también, determinar la cantidad aproximada de copias de genes bacterianos. Otro aspecto interesante de nuestro estudio fue que el 92% de los pacientes fueron positivos para *Hp* (considerando ya sea uno de los tres genes o su combinación). Además, el 50% de los pacientes con EB fueron positivos a la infección (Cuadro III), sugiriendo que *Hp* juega un papel importante en el desarrollo del EB.

La detección del microorganismo fue claramente positiva en ambas zonas anatómicas (antro/cardias) de los pacientes, sugiriendo que la infección parece no ser sitio-específica o bien, que existe un intercambio de cepas entre ambos sitios. De manera interesante, las muestras positivas para *vacA* fueron detectadas solamente en antro gástrico y no en cardias (15/0 %; Cuadro III, Figura 3), sugiriendo que tal intercambio no sucede. Los pacientes positivos a *vacA* fueron más frecuentes que los pacientes positivos a *ureC* o *cagA*. La combinación de genes *ureC*-*vacA* fue el hallazgo más común en el grupo de pacientes positivos para dos genes. Otra observación es el número importante de casos positivos a los tres genes (57% antro/ 74% cardias). Estos pacientes se encuentran probablemente en un riesgo incrementado para desarrollar neoplasia por lo que sugerimos un seguimiento médico intensivo con el propósito de prevenir el desarrollo de EB y/o cáncer gástrico. Desafortunadamente, no pudimos establecer si estas infecciones fueron producidas por una sola cepa positiva para los tres genes o si existió una infección múltiple con bacterias que contenían cada uno de estos genes. Se han descrito estudios similares detectando a los genotipos *vacA* y *cagA* sugiriendo una relación entre infecciones múltiples y desarrollo de úlcera.^{6,41,42} La presencia de *Hp* en

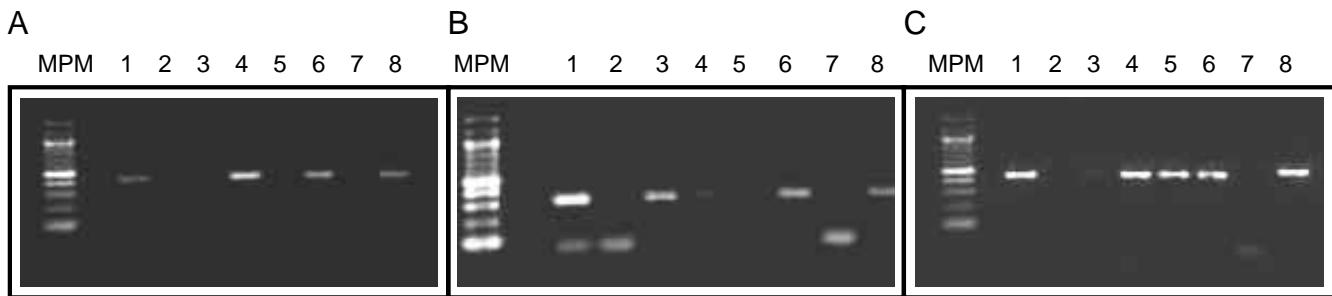


Figura 2. Amplificación por PCR de genes de *Hp*. Se muestran los productos de PCR: Panel A: *cagA* (400 pb); Panel B: *ureC* (294 pb) y Panel C: *vacA* (449 pb). Carriles 1 (A, B, C): Muestras correspondientes a pacientes positivos a EB; carriles 2-6: Muestras de pacientes con GC (EB negativos); carriles 7: ADN de *E. coli* incluido en el ensayo como control negativo; carriles 8: cepas control de *Hp*. MPM: marcador de peso molecular, escalera de 100 pb (New England Biolabs, EUA).

Cuadro III. Detección molecular de cepas positivas para *ureC*, *cagA* and *vacA* de *H. pylori* en biopsias de pacientes con GC (n = 65).

- *Helicobacter pylori* (positivos para)

	Antro gástrico	Cardias
<i>ureC</i> +	2%	9%
<i>cagA</i> +	2%	5%
<i>vacA</i> +	15%	0%
<i>ureC/cagA</i> +	6%	8%
<i>ureC/vacA</i> +	8%	9%
<i>cagA/vacA</i> +	6%	5%
<i>ureC/vacA/cagA</i> +	18 %	38%
Detección de <i>H. pylori</i> por zona anatómica	57%	74%
Pacientes negativos a <i>H. pylori</i> por zona anatómica	43%	26%
Pacientes positivos a <i>H. pylori</i> (Total)	92 %	
Pacientes negativos a <i>H. pylori</i> (Total)	8 %	
EB- <i>H. pylori</i> +	50%	

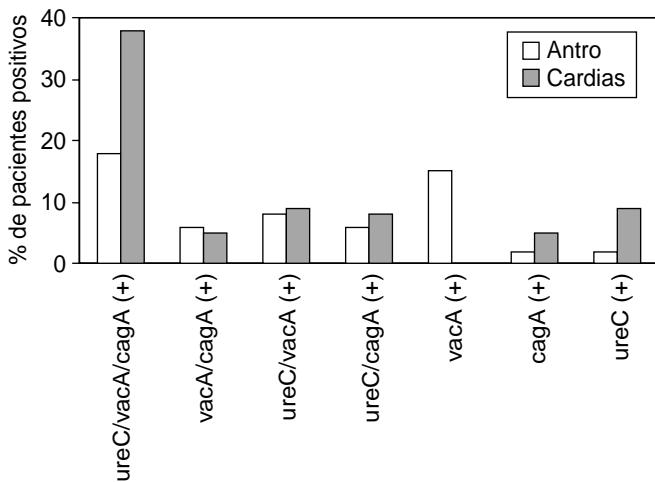


Figura 3. Detección de cepas de *Hp* en dos sitios anatómicos. La amplificación de genes de *Hp* se llevó a cabo en biopsias obtenidas de antro gástrico y cardias de acuerdo a lo descrito en material y métodos. La presencia de secuencias de los genes *cagA* y *ureC* es más frecuente en muestras de cardias. Por otro lado, *vacA* fue más frecuentemente detectado en antro gástrico. De los pacientes incluidos en este estudio, el 92% fue positivo a la infección por *Hp*.

la mucosa gástrica conduce al desarrollo de gastritis crónica y eventualmente a gastritis atrófica la cual está asociada con enfermedades como úlcera péptica, carcinoma gástrico y linfoma tipo MALT (*Figura 6*). La infección con ciertos genotipos de *Hp* (p.ej. cepas positivas a *cagA* y *vacA*) está relacionada con alta morbilidad, mientras que otras variantes positivas a *cagA* parecen ser menos patógenas.^{43, 44}

El mecanismo de inflamación asociado a *vacA* puede ser proporcional a la cantidad de toxina producida, de acuerdo a su actividad *in vitro*, por lo que la secuencia señal de *vacA* (que codifica para el péptido señal de la proteína que induce vacuolas) puede ser un marcador de toxicidad. Por otro lado, la función de la proteína *cagA* todavía no ha sido elucidada por completo. La citotoxina *cagA* ha sido asociada con la inducción de IL-8 en el epitelio gástrico, por lo que la erradicación de bacterias reduce la expresión de IL-8 así como el infiltrado de neutrófilos; aunque el estatus de *cagA* ha sido realizado en forma serológica, esta proteína puede ser un buen marcador de potencial ulcerogénico⁴³. Previamente, Torres y cols.

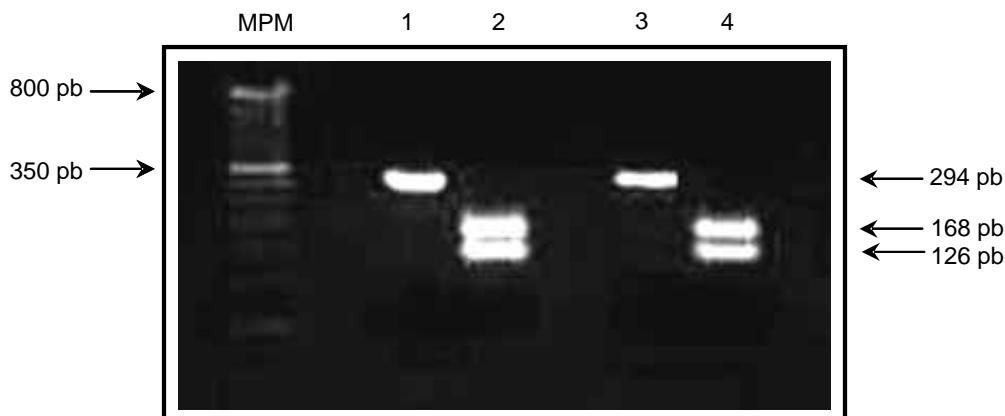


Figura 4. Análisis de los productos de PCR mediante enzimas de restricción. Los productos de PCR (294 pb) fueron digeridos con la endonucleasa de digestión *SphI* para confirmar la especificidad de amplificación. Carriles 1-2: Cepas de referencia. Carriles 3-4: ADN de un paciente positivo a EB. Carriles 1 y 3: Controles sin digerir. Carriles 2 y 4: Muestras digeridas con *SphI*. MPM: marcador de peso molecular (ADN escalera de 50-pb, Invitrogen, EU).

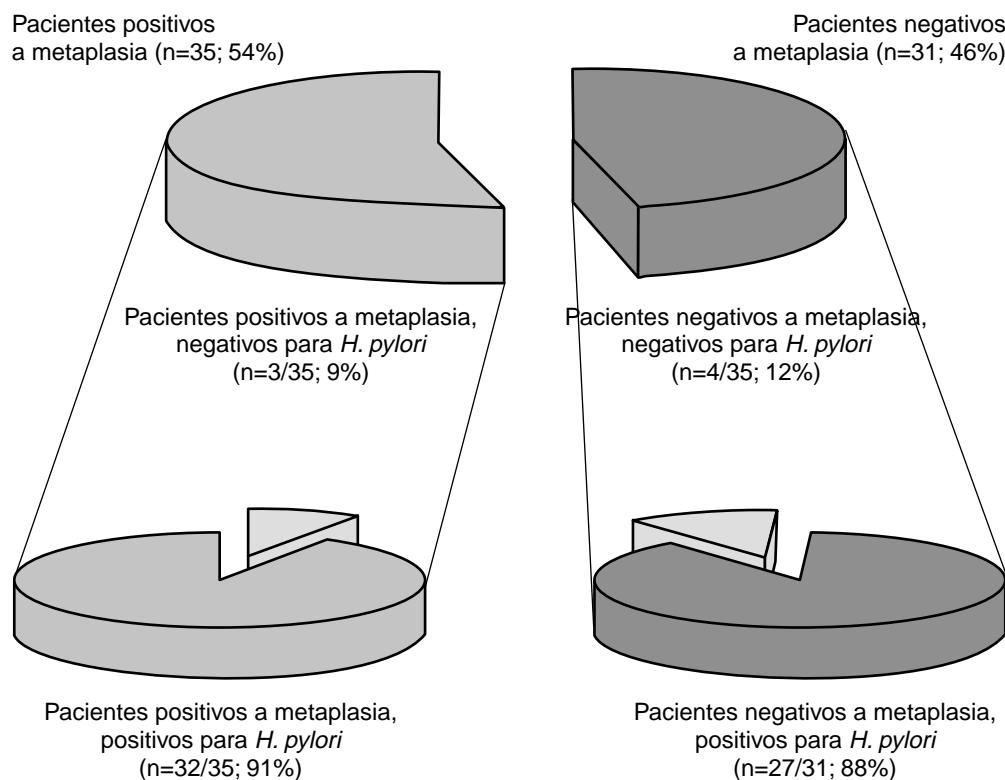


Figura 5. Distribución de pacientes considerando la relación entre el desarrollo de metaplasia y la infección por *Hp*.

(1998),⁴⁵ reportaron en un estudio seroepidemiológico la distribución de la infección por *Hp* en México. Este estudio sugiere que la infección por esta bacteria es común, comienza en etapas tempranas de la vida y se asocia a condiciones socioeconómicas bajas. Dos estudios más proponen que el riesgo de pacientes con diagnóstico de EB para desarrollar adenocarcinoma es de 30 a 42 veces mayor que la población general.⁴⁶ El incremento en la incidencia de adenocarcinoma del esófago sugiere que el epitelio de Barrett, definido

como la presencia de metaplasia intestinal en el esófago, es el precursor de la lesión al desarrollar de displasia y posible progresión a cáncer.⁴⁷ Esta progresión (y regresión en algunos casos) probablemente refleja la modulación de los procesos pre-cancerosos los cuales pueden evolucionar en ambas direcciones con una intensidad variable con respecto al tiempo. Estos procesos son afectados probablemente por factores medio-ambientales de acuerdo a estudios que sugieren la participación de irritantes tales como consumo exce-

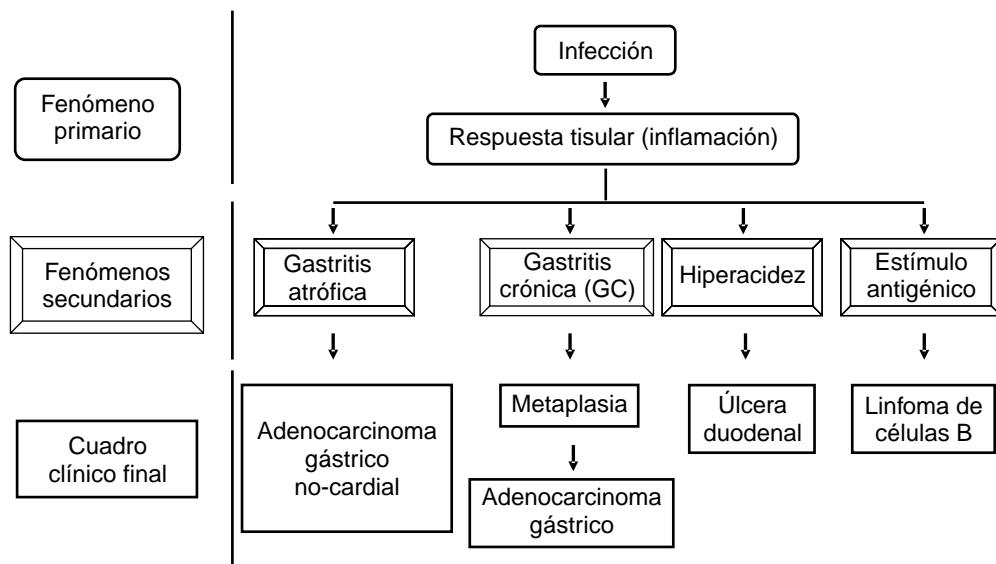


Figura 6. Relación entre la colonización por *Hp* y GC en el tracto gastrointestinal en pacientes con desarrollo de metaplasia. La interacción entre el hospedero y una población bacteriana en particular determina el cuadro clínico. La infección por *Hp* incrementa el riesgo para desarrollar úlcera péptica, metaplasia, adenocarcinoma gástrico, cáncer gástrico no-cardial y linfoma no-Hodgkin de células B.

sivo de sal, precursores mutagénicos como son los nitratos y la infección por *Hp* en los casos de progresión por un lado, y por otro, los inhibidores en los eventos de regresión como son el ácido ascórbico y el β -caroteno.⁴⁸ Hallazgos recientes muestran la complejidad del microambiente gástrico el cual probablemente determinará el grado de lesiones precursoras en mucosa.⁴⁹ Además, Peek y cols. (1999),⁵⁰ demostraron *in vitro* que en células de epitelios gástricos la disminución de la viabilidad, la progresión a G2-M y la inducción de apoptosis están asociados con la co-incubación con cepas positivas a *cagA*. Estos fenómenos fueron mediados en parte por la expresión de *vacA* y por genes miembros de la familia *cag*. Interesantemente, observamos una tendencia de los pacientes positivos a *Hp* a desarrollar metaplasia. De los 25 pacientes diagnosticados con metaplasia, el 88% fueron positivos a la infección por *Hp*. Estos casos estuvieron relacionados con cepas de alta patogenicidad detectadas en los dos sitios anatómicos en estudio.

Los hallazgos principales de este trabajo fueron: (1) la infección provocada por más de una cepa de *Hp* es frecuente en México, (2) la infección múltiple está comúnmente asociada con la progresión a metaplasia, (3) la detección del microorganismo fue claramente positiva en ambas zonas anatómicas (43% en antro gástrico/26% en cardias) y (4) el 50% de los pacientes con EB fueron positivos para *Hp*. Concluimos que los pacientes con metaplasia e infección con cepas de *Hp* positivas para *ureC*, *cagA* y *vacA* presentan un riesgo incrementado para generar inestabilidad genómica conduciendo a aneuploidía y subsecuentemente a

adenocarcinomas. Los pacientes con factores de riesgo múltiples como: tabaquismo, gastritis crónica, HLA, EB e infección por *Hp* deberían ser analizados en búsqueda de mutaciones en proto-oncogenes y/o genes supresores de tumor con el propósito de prevenir el desarrollo de lesiones malignas.⁴⁹

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Ing. Luz Ma. Rangel por su ayuda en la preparación de este manuscrito y al Biól. Enrique García Villa, a la Q.F.I. María Teresa Hernández, a la Biól. Elizabeth Alvarez, a la M. en C. María Guadalupe Aguilar González y a la Sra. Guadalupe Villasana (CINVESTAV-IPN, México) por su apoyo técnico.

REFERENCIAS

1. Graham DY. *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 1989; 96: 615-625.
2. Figura N, Guglielmetti P, Rossolini A, Barberi A, Cusi G, Musmanno RA, Russi M, Quaranta S. Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 225-226.
3. Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JWG, Stacey AR, Wald N, Sitas F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Br Med J* 1991; 302: 1302-1305.
4. Genta RM, Hammer HW, Graham DY. Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: frequency, distribution and response to triple therapy. *Hum Pathol* 1993; 24: 577-583.
5. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 720-741.
6. González-Valencia G, Atherton JC, Muñoz O, Dehesa M, Mardrazo-de la Garza A, Torres J. *Helicobacter pylori vacA* and

- cagA* genotypes in Mexican adults and children. *J Infect Dis* 2000; 182: 1450-1454.
7. Luman W, Zhao Y, Ng HS, Ling KL. *Helicobacter pylori* infection is unlikely to be transmitted between partners: evidence from genotypic study in partners of infected patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 521-528.
 8. Torres J, Perez-Perez GI, Leal-Herrera Y, Muñoz O. Infection with *cagA+* *Helicobacter pylori* strains as a possible predictor of risk in the development of gastric adenocarcinoma in Mexico. *Int J Cancer* 1998; 78: 298-300.
 9. Peek RM, Vaezi MF, Falk GW, Goldblum JR, Perez-Perez, GI, Richter JE Blaser MJ. Role of *Helicobacter pylori* *cagA+* strains and specific host immune responses on the development of premalignant and malignant lesions in the gastric cardia. *Int J Cancer* 1999; 82: 520-524.
 10. Guarner J, Mohar A. The association between *Helicobacter pylori* and gastric neoplasia. Epidemiologic evidence. *Rev Gastroenterol Mex* 2000; 65: 20-24.
 11. World Health Organization Agency for Research on Cancer (WHO/IARC) Meeting Lyon, France, 1994: 7-14.
 12. Hentschel E, Brandstatter G, Dragosics B, Hirschl AM, Nemec H, Schutze K, et al. Effect of ranitidine and ampicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. *N Engl J Med* 1993; 328: 308-312.
 13. Lee SA, Kang D, Shim KN, Choe JW, Hong WS, Choi H. Effect of diet and *Helicobacter pylori* infection to the risk of early gastric cancer. *J Epidemiol* 2003; 13: 162-168.
 14. Jorge O, Cuello Carrion FD, Jorge A, Ciocca DR. *Helicobacter pylori* infection affects the expression of PCNA, p53, c-erbB-2 and Bcl-2 in the human gastric mucosa. *Rev Esp Enferm Dig* 2003; 95: 89-96, 97-104.
 15. Labigne A, Cussac V, Corcoux P. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol* 1991; 173: 1920-1931.
 16. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone E, Papini E, Xiang Z, Figura N, Rappuoli R. Molecular characterization of the 128 kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5791-5795.
 17. Tummuru MKR, Coker TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 1993; 61: 1799-1809.
 18. Censini S, Lange C, Xiang Z, et al. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14559-14564.
 19. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollen A, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2752-2756.
 20. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111-2115.
 21. Crabtree JE, Wyatt JI, Sobala GM, Miller G, Tompkins DS, Primrose JN, Morgan AG. Systemic and mucosal humoral responses to *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Gut* 1993; 34: 1339-1343.
 22. Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1988; 26: 93-99.
 23. Cover TL, Glupezynski Y, Lage AP, Burette A, Tummuru MKR, Perez-Perez GI, et al. Serologic detection of infection with *cagA+* *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1496-1500.
 24. Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 1771-1777.
 25. Scotiniotis IA, Rokkas T, Furth EE, Rigas B, Shiff SJ. Altered gastric epithelial cell kinetics in *Helicobacter pylori*-associated intestinal metaplasia: implications for gastric carcinogenesis. *Int J Cancer* 2000; 85: 192-200.
 26. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, Van Asbroeck M, Sousa JC, et al. Typing of *Helicobacter pylori* *vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1271-1276.
 27. Yoshida H, Hirota K, Shiratori Y, Nihei T, Amano S, Yoshida A, et al. Use of a gastric juice-based PCR assay to detect *Helicobacter pylori* infection in culture-negative patients. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 317-320.
 28. Barrett R. Chronic peptic ulcer of the esophagus and esophagitis. *Br J Surg* 1950; 38: 175-182.
 29. Bogomoletz WV. The pathology of Barrett's esophagus: An Overview. *Endoscopy* 1993; 25: 632-634.
 30. Spechler SJ. Barrett's esophagus: current opinion. *Gastroenterology* 1992; 8: 573-578.
 31. Naef AP, Savary M, Ozzello L. Columnar-lined lower esophagus: an acquired lesion with malignant predisposition. Report on 140 cases of Barrett's esophagus with 12 adenocarcinomas. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1975; 70: 826-835.
 32. Spechler SJ, Robbins AH, Rubins HB, Vincent ME, Heeren T, Doos WG, et al. Adenocarcinoma and Barrett's esophagus: an overrated risk? *Gastroenterology* 1984; 87: 927-933.
 33. Thompson JJ, Zinsser KR, Enterline HT. Barrett's metaplasia and adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Hum Pathol* 1983; 14: 42-61.
 34. Rabinovitch PS, Reid BJ, Haggitt RC, Norwood TH, Rubin CE. Progression to cancer in Barrett's esophagus is associated with genomic instability. *Lab Invest* 1988; 60: 65-71.
 35. Price AB. The Sydney system: histological division. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6: 209-222.
 36. Kolts BF, Joseph B, Achem SR, Bianchi T, Monteiro C. *Helicobacter pylori* detection: A quality and cost analysis. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 650-655.
 37. Coker TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1990; 267: 10570-10575.
 38. Bickley JR, Owen RJ, Fraser AG, Pounder RE. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *J Med Microbiol* 1993; 39: 338-344.
 39. Ito Y, Azuma T, Ito S, Suto H, Miyaji H, Yamazaki Y, Kohli Y, Kuriyama M. Full-length sequence analysis of the *vacA* gene from cytotoxic and noncytotoxic *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis* 1998; 178: 1391-1398.
 40. Sambrook JE, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning*. A laboratory manual. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 1989.
 41. Stephens JC, Stewart JA, Folwell AM, Rathbone BJ. *Helicobacter pylori* *cagA* status, *vacA* genotypes and ulcer disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 381-384.
 42. Morales-Espinosa R, Castillo-Rojas G, Gonzalez-Valencia G, Ponce de Leon S, Cravioto A, Atherton JC, et al. Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3001-3004.

43. Ando T, Peek RM, Pride D, Levine SM, Takata T, Lee YC, et al. Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with cagA status. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 239-246.
44. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Coker TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997; 112: 92-99.
45. Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, et al. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis* 1998; 178: 1089-1094.
46. Casson G, Mukhopadhyay T, Cleary KR, RO YJ, Levin B, Roth JA. Gene mutations in Barrett's epithelium and esophageal cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 4495-4499.
47. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Roth G, Surawicz CM, Van Belle G, et al. Observer variation in the diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus or esophagogastric junction. *Hum Pathol* 1988; 19: 942-948.
48. Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol* 2003; 56: 1-9.
49. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, et al. Gastric precancerous process in a high-risk population: cohort follow-up. *Cancer Res* 1990; 50: 4737-4740.
50. Peek RM, Blaser MJ, Mays DJ, Forsyth MH, Coker TL, Song SY, et al. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res* 1999; 59: 6124-6131.

