

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

Maestría en Ciencias de la Salud con Área de
Concentración en Enfermedades Infecciosas

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EXPRESADAS
DIFERENCIALMENTE EN GASTRITIS CRÓNICA Y
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DE TIPO INTESTINAL EN
BIOPSIAS DE PACIENTES INFECTADOS CON
Helicobacter pylori.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

P R E S E N T A

**L. F. MAYELI MARGARITA MARTÍNEZ
AGUILAR**

COMITÉ DE TESIS:

DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Guadalupe Ayala Aguilar (INSP)

ASESORES:

Dr. Julieta Ivone. Castro Romero (INSP)

Dr. Sergio Encarnación Guevara (CCG)

CUERNAVACA, MORELOS, 2014

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI), en el laboratorio 2 del departamento de Desarrollo Biotecnológico, del Instituto Nacional de salud Pública INSP, bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Ayala Aguilar.

Este trabajo es parte del proyecto “Identificación de biomarcadores asociados a lesiones gástricas premalignas y de transformación a cáncer por medio de electroforesis bidimensional y espectrometría de masas (LC-MS)”, el cual fue financiado por CONACYT, por lo que el autor agradece a CONACYT por el financiamiento y apoyo durante la realización del presente trabajo.

RESUMEN

Antecedentes: El cáncer gástrico (CG) es una enfermedad compleja y multifactorial, considerada como la segunda causa de muerte y la cuarta neoplasia más común a nivel mundial. Actualmente en México el CG constituye la segunda causa de muerte por tumor maligno siendo uno de los principales problema de salud pública. Estudios poblacionales han indicado claramente que la infección por *H. pylori* aumenta el riesgo de padecer cáncer gástrico. En 1965, Lauren clasificó al CG en dos tipos: CG de tipo intestinal y CG de tipo difuso, cada uno con características histopatológicas, clínicas y epidemiológicas propias. Existe evidencia de que *H. pylori* es el principal agente causal del CG de tipo intestinal que es precedido por una serie de cambios histológicos que incluyen: gastritis aguda, gastritis crónica, atrófica, metaplasia intestinal, displasia, finalizando con el CG. Se conoce muy poco sobre los mecanismos moleculares que desencadenan la transformación en la gastritis crónica (GC) que llevan al desarrollo de CG. Varios autores han reportado que durante la transformación de la mucosa gástrica se presenta alteraciones en genes que aumentan o disminuyen su expresión, los cuales están involucrados en los diferentes estadios de la carcinogénesis. Además estudios proteómicos han reportado alteraciones de varias proteínas involucradas en varios procesos celulares como apoptosis, metabolismo, respuesta al estrés, ciclo celular, comunicación celular y metabolismo. La combinación particular de estas alteraciones podría diferir entre la gastritis crónica y el CG, por lo que es posible pensar que el perfil de proteínas que se expresan será diferente entre ambas condiciones; por lo que será relevante conocer si existe una o varias proteínas específicas, intracelulares y/o de membrana que ayuden a diferenciar entre la gastritis crónica y el CG. Lo anterior permitirá profundizar en los mecanismos moleculares y en la biología del adenocarcinoma gástrico, que en un futuro servirá para identificar potenciales marcadores biológicos, asociados a la transformación celular. **Objetivo:** Investigar el perfil de expresión de proteínas en biopsias de pacientes infectados por *H. pylori* con gastritis crónica y adenocarcinoma gástrico tipo intestinal, para identificar las proteínas específicas expresadas en estas lesiones. **Metodología:** Las muestras que se utilizaron en este estudio provienen de un banco de biopsias que se formó como parte del proyecto "Identificación de biomarcadores asociados a lesiones gástricas premalignas y de transformación a cáncer por medio de electroforesis bidimensional y espectrometría de masas (LC-MS), el cual fue aprobado por la comisión de Ética del INSP, con número de aprobación CI: 1212. La separación de las proteínas se realizará mediante electroforesis bidimensional (2D) utilizando la técnica de DIGE (por sus siglas en inglés, Difference Gel Electrophoresis). Esta técnica permitirá separar las proteínas marcadas con diferentes fluoróforos (Cy2, Cy3 o Cy5) y visualizarlas en geles 2D. Las diferencias en los patrones de expresión de proteínas entre los grupos se analizarán con un software específico para DIGE. Las diferencias en los patrones de expresión de proteínas entre los grupos se analizarán y se seleccionaran los spots de las proteínas diferencialmente expresadas y se identificarán por espectrometría de masas.

Palabras claves: *H. pylori*, gastritis crónica, Cáncer gástrico, proteómica, Electroforesis en geles diferenciales en 2D (2D-DIGE)

INDICE

RESUMEN	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XVI
LISTA DE FIGURAS	XIX
LISTA DE TABLAS	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Generalidades	4
2.2 Participación de VacA y CagA en la patogénesis	5
2.2.1 VacA	5
2.2.2 CagA	8
2.3 Interacción entre <i>H. pylori</i> y la respuesta inmune del hospedero	10
2.4 Historia Natural del Adenocarcinoma Gástrico de Tipo Intestinal	12
2.5 Estudios Genéticos en CG	17
2.5.1 Mecanismos reparadores de ADN (MMR)	17
2.5.2 Genes supresores de tumores	19
2.5.3 Factores de transcripción	20
2.5.4 Activación de oncogenes	22
2.5.5 Variación en la expresión de varios genes implicados en gastritis crónica y cáncer gástrico.	24
2.6 Importancia del análisis de proteínas en CG a través de técnicas proteómicas	24
2.6.1 Identificación de proteínas diferenciales en CG a través de técnicas proteómicas	25
3. MAPA CONCEPTUAL	28
4. JUSTIFICACIÓN	30

5. HIPÓTESIS.....	31
6. OBJETIVO GENERAL	32
6.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
7. MATERIALES Y METODOS	33
7.1 Diseño del estudio: Estudio experimental.....	33
7.2 Definición y selección de la población de estudio.....	33
7.2.1 Población de estudio.....	33
7.2.2 Selección de las muestras de tejido para el análisis proteómico.....	33
7.3 Los criterios de inclusión y exclusión.....	34
7.4 Formación de los grupos de estudio.....	34
7.5 Métodos experimentales.....	35
7.5.1 Manejo de la muestra biológica para el análisis proteómico	35
7.5.2 Detección de anticuerpos contra <i>H. pylori</i> mediante Western blot, en las muestras que fueron empleadas para el análisis proteómico.	35
7.6 Separación e identificación de proteínas para análisis proteómico (2D-DIGE).....	36
7.6.1 Extracción de proteínas de biopsias.....	37
7.6.2 Eliminación de sustancias interferentes en la muestra de proteínas extraídas de las Biopsias (2D-Clean up).	37
7.6.3 Ajuste del pH en el buffer de rehidratación para el marcaje de las muestra de proteínas de Biopsias para análisis 2D-DIGE.....	38
7.6.4 Cuantificación de proteínas con el kit comercial 2D-Quant.	39
7.6.5 Gel de integridad para muestras de Gastritis Crónica y Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal.....	40
7.7 Preparación de las muestras de proteínas para el análisis proteómico 2D-DIGE	41
7.7.1 Reconstitución y preparación de los fluoróforo CyDye mínimos para el marcaje de proteínas.....	41
7.7.2 Marcaje de proteínas con los flurofóros CyDye para 2D-DIGE	42
7.7.3 Geles de primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF) en el equipo Ettan IPGphor 3	45
7.7.4 Rehidratación de Immobiline DryStrip (pH 3-10 de 7cm) y aplicación de la muestra.....	45
7.7.5 Equilibrio de los geles de la primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF).....	46
7.5.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE o segunda dimensión.....	47
7.5.7 Obtención de la Imagen	48
7.5.8 Tinción del Gel de integridad mediante Azul de Coomassie G-250.	48

7.5.9 Tinción de Sypro Ruby para la estandarización de Geles 2D-PAGE.	49
8. RESULTADOS.....	50
8.1 Detección de anticuerpos <i>Anti-H. pylori</i> mediante Western Blot en sueros de los pacientes incluidos para el análisis DIGE.....	50
8.2 Cuantificación de proteínas del extracto de proteínas obtenido de las biopsias.	52
8.3 Gel de Integridad de las muestras usadas en el análisis proteómico.	53
8.4 Estandarización de la Separación de proteínas en Geles en 2-DE	54
8.5 Geles 2D-DIGE	58
8.5.1 Análisis diferencial en el gel	61
8.5.2 Análisis de variación biológica en los dos geles utilizados para el análisis proteómico. ...	66
9. DISCUSIÓN.....	69
11. PERSPECTIVAS	72
1. ANEXO	73
12.1 Lista de reactivos.....	73
12.2 Lista de equipos	74
2. REFERENCIAS.....	75

Lista de Abreviaturas

CG	Cáncer Gástrico
GC	Gastritis crónica
LC-MS	Cromatografía líquida –Espectrometría de masas
2D-DIGE	Electroforesis bidimensional diferencial en geles
MALT	Linfomas asociados a mucosas
EGF/EGFR	Factor de crecimiento Epidermal/Receptor del factor de crecimiento epidermal
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
IGF y TGF	Factor de crecimiento insulínico y Factor de crecimiento tumoral
p53	Proteína supresora de tumores, se une al ADN
p16 o CDKN2A	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
APC	Gen codifica una proteína citoplasmática que regula la proteína β -catenina
TFF	Factor trifoil
Rb	Gen que sintetiza la proteína de riboblastoma
CDKs	Quinasas dependientes de ciclina
<i>c-met</i>	Proto-oncogen que codifica para el receptor de crecimiento de hepatocitos
K-ras	Gen implicado en el ciclo celular y diferenciación celular.
Bcl-2K	Gen que codifica para la proteína BCL-2, regula la apoptosis
c-erb2 (HER2/neu)	Codifica para la síntesis de proteínas de HER-2/neu.
K-sam (FGFR3)	Gen que codifica una proteína con actividad intrínseca de tirosin quinasa
CDX1 y CDX2	Genes miembros de la familia homeobox
ROS	Radicales libres de oxígeno
NO y iNOS	Óxido Nítrico Y Óxido Nítrico Sintetasa Inducible
CO ₂	Dióxido de Carbono
NH ₄	Amonio
OMPs	Proteínas de membrana externa de <i>H. pylori</i>
LPS y FlaA	Lipopolisacárido e Gen que codifica para flagelina de <i>H. pylori</i>
TLR	Receptor tipo Toll-Like.
RPTP	Receptor de la proteína tirosina fosfatasa (RPTP α y RPTP β)

NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa
Bcl-2	Familia de proteínas que regulan procesos de permeabilización mitocondrial.
TNF	Factor de necrosis Tumoral, liberada por células del sistema inmune.
IL-1, IL-6, IL-8, IL-4, IL-8, IL-12 e INF	Citocinas Proinflamatorias :INF, Interferon
ERK/MARK	Vía MAP quinasas
ATF-2	Factor de transcripción activador 2.
CREB	Proteína que actúa como factor de Transcripción.
COX-2	Ciclooxigenasa o prostaglandina-endoperóxido sintasa
PGE ₂	Prostaglandinas
SH2	quinasas de la familia Src
EPIYA	Motivos de Ácido Glutámico, Prolina, Isoleucina, Tirosina y Alanina
MUC2	Mucinas, secretadas por células caliciformes en el intestino.
AID	Citidina deaminasa inducida por activación, sintetizada por células B.
AlpA	Proteína de <i>H. pylori</i> asociada a la adhesión
Shh	Homologo Sonic hedgehog,
CSC	células madre cancerígenas
PMN	Células polimorfonucleares
MMR	Mecanismos reparadores de ADN (<i>MLH1, MSH2, PMS1, MSH3, MSH6</i>)
MGMT	<i>O6-metil guanina metiltransferasa</i>
MSI y LOH	Inestabilidad de microsatélites y Pérdida en la heterogeneidad
TFF	Factor trifoil
RUNX	Factor de Transcripción regulador del crecimiento celular epitelial.
c-Myc	Factor de transcripción que regula genes implicados en la proliferación.
Sox	Factores de transcripción que poseen un dominio de unión a DNA.
p27 ^{Kip1}	Inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas <i>Cip/Kip</i> .
HGF y bFGF	Factor de crecimiento de Hepatocitos y Factor de crecimiento de fibroblastos básico.
MVD	Densidad de los microvasos.
KCNJ16	Canal de potasio regulado por voltaje.
PSMB9	Subunidad beta de proteosoma tipo 9

MTP	Proteína microsomal transportadora de triglicéridos
FABP1	Proteínas de unión a ácidos Grasos
APOA1	Apolipoproteína A1
GGT1	Gamma glutamiltranspeptidasa 1
ALDOB	Aldolasa B
HNF4A	El <i>factor nuclear 4</i> alfa de hepatocito
CLDN3 y CLDN4	Claudina 3 y Claudina 4, importante en las uniones Estrechas
CDH17	Cadherina 17, se asoció con la proliferación y la invasión en el cáncer gástrico.
CTCF	Represor transcripcional, involucrado en la regulación de genes.
AGR2	Proteína de gradiente anterior, del RE
ENO1 y GDI2	Enolasa 1 y GDI o inhibidores de la disociación de GDP.
GRP78	Proteína de unión a inmunoglobulina,
GRP94	Proteína reguladora de glucosa
PPIA	Peptidil prolil isomerasa A o <i>ciclofilina A</i>
PRDX1	Peroxiredoxina 1
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato,
VDAC1	Canal de aniones dependientes de voltaje
GKN1	Gastrina 1
MRPL12	Proteína de ribosoma 39S12, importante en la síntesis de proteínas.
PACAP	Polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1
GSTM3	Glutación s-transferasa 3
SEPT2 y UBE2N	Septina 2 y Enzima E2N conjugada de ubiquitina
TALDO1	Transaldolasa 1
MNNG	N-metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina
HSP27	Proteína del grupo sHsp, con actividad chaperona.
HSP60	Proteína con actividad chaperona, protege a las proteínas plegadas.
MnSOD	Superóxido dismutasa que contiene Manganeseo
PBS	Buffer de Fosfato Salino

Lista de Figuras

Figura 1. Historia Natural del cáncer gástrico de tipo Intestinal descrito por primera vez por Pelayo Correa.	14
Figura 11. Histogramas de frecuencia para el gel 1	62
Figura 12. Gel 2. Muestra el Perfil de proteínas extraídas de biopsias de los pacientes P059 y P022 separados con 2D-DIGE	63
Figura 14. Histogramas de frecuencia para el gel 1	65
Figura 15. Análisis de variación biológica	66
Figura 2. Representación esquemática de una glándula gástrica normal y una glándula en metaplasia intestinal	16
Figura 3. Equilibrio de las Tiras de la primera dimensión.....	47
Figura 4. Patrones de reconocimiento de antígenos de <i>H. pylori</i> en los sueros de los pacientes.	51
Figura 5. Determinación de integridad de las proteínas provenientes de biopsias.	54
Figura 6. Electroforesis en geles de 2D teñidos con Sypro del paciente p028.....	56
Figura 7. Gráfica de IEF y gel en 2D teñidos con Sypro del paciente P035.....	57
Figura 8. Grafica de corrimiento de los dos geles 2D-DIGE realizados en un rango de pH de 3-11 NL.....	59
Figura 9. Gel 1. Muestra el Perfil de proteínas extraídas de biopsias de los pacientes P029 y P060 separados con 2D-DIGE	60
Figura10. Análisis diferencial de gel 1. Comparación de las muestras marcadas con Cy3 (Gastritis) y Cy5 (cáncer).	61
Figura13. Análisis diferencial de gel 2. Comparación de las muestras marcadas con Cy3 (cáncer) y Cy5 (Gastritis).	64

Lista de Tablas

Tabla 1. Diseño experimental para los análisis DIGE realizados en pacientes con Gastritis Crónica y Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal.	44
Tabla 2. Concentración de proteínas obtenidas de biopsias para análisis proteómico.	52
Tabla 3. Pacientes con diagnóstico de <i>H. pylori</i> mediante análisis de Western blot y diagnostico histopatológico que fueron incluidos en el estudio proteómico.	53
Tabla 4. Análisis diferencial entre geles. Datos generales.	65
Tabla 5: Análisis estadístico derivado del análisis de variación biológica.	

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico (CG) es una enfermedad compleja y multifactorial que se desarrolla a través de un proceso de múltiples pasos que pueden durar 20 años o más¹.

En el 2008, el CG represento la segunda causa de muerte y la cuarta neoplasia más común a nivel mundial², con un estimado de 989, 600 nuevos casos de cáncer gástrico y un total de 738,000 casos de muerte por cáncer. Investigaciones revelaron que el 70% de estos casos ocurren en países en vías de desarrollo³. En México, el CG constituye la segunda causa de muerte con un total de 8.7% defunciones por neoplasia maligna, seguido por el cáncer de pulmón, representando de esta manera, la cuarta causa de muerte en varones (9.5%) y la quinta en mujeres (7.9%)⁴. El cáncer gástrico es más frecuente en hombres que en mujeres, entre la edad de 50.4 años para los hombres y en mujeres en edad de 47.7 años⁵.

Algunos estudios han establecido que el principal factor etiológico del CG y los linfomas asociados a mucosas (MALT) es la infección persistente con *H. pylori*. Se reporta que más del 50% de la población mundial está infectada con *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Sin embargo, si bien el 100% de los infectados desarrolla gastritis aguda/crónica, solo el 5% evoluciona a gastritis atrófica, el 10% puede desarrollar úlcera gástrica y duodenal, del 1 al 3 % llega a desarrollar cáncer gástrico y menos del 0.1% desarrolla linfoma de MALT⁶.

Además de la infección por *H. pylori* existen otros factores que se encuentran relacionados con el desarrollo de cáncer gástrico, como son los factores ambientales y los factores genéticos⁷. Entre los factores ambientales que más se han asociado al desarrollo de esta neoplasia se encuentran el consumo de

alcohol, tabaco, la dieta basada en la alta ingesta de sal, el alto consumo de alimentos ahumados y preservados^{1, 7}. Entre los factores genéticos involucrados en la progresión del cáncer gástrico, se encuentran los polimorfismos en genes que se relacionan con: Factores de crecimiento (EGF, VEGF, FGF, IGF), citocinas (TGF, IL-8, IL-1 β) y en moléculas de adhesión (E-cadherina). También se presenta inactivación en genes supresores de tumores debido a mutaciones y/o pérdida de heterogeneidad (LOH) entre estos se encuentra: p53, p16, APC. Por otro lado, se han visto modificaciones en genes reguladores del ciclo celular (Rb, CDKs), genes de reparación de ADN, variaciones en la activación de oncogenes (*c-met*, *K-ras*, *bcl-2K*, *c-erb2*, *k-sam*), factores de transcripción (CDX1, CDX2, NF-kB), entre otros⁸⁻¹⁰.

Asimismo, varios grupos de investigación en el área coinciden que los factores de virulencia secretados por *H. pylori* pueden actuar a través de diferentes mecanismos moleculares que promueven la transformación del epitelio gástrico^{11, 12}. Esto incluyen la inducción de hiperproliferación, aumento en la producción de radicales libres de oxígeno (ROS), aumento en óxido nítrico (NO), que son moléculas que pueden causar daño al ADN⁸. Varios estudios han demostrado que las múltiples alteraciones genéticas y moleculares son las responsables de la transformación de la mucosa gástrica durante el desarrollo del CG^{8, 13}.

Los mecanismos concretos del desarrollo del CG siguen siendo desconocidos, por lo cual, es importante entender los eventos moleculares que ocurren en la transformación del epitelio gástrico que llevan al desarrollo del CG¹⁴. En algunos estudios se han reportado la participación de genes que codifican para factores de crecimiento, citocinas, moléculas reguladoras del ciclo celular, factores supresores, moléculas de adhesión celular y factores de inestabilidad genética^{14, 15}, aún no está claro como estas moléculas intervienen en el proceso carcinogénico. Todas estas alteraciones permiten pensar que el perfil de proteínas que se expresan será diferente entre ambas condiciones; por lo que será relevante

conocer si existe una o varias proteínas específicas, intracelulares y/o de membrana que se expresan en la gastritis crónica no atrófica y no en el CG y viceversa.

Consideramos que el uso de herramientas proteómicas nos ayudara a conocer de manera global el perfil de proteínas expresadas en la mucosa gástrica sin lesiones precancerosas así como en el CG. Esto dará información sobre los procesos celulares específicos que se alteran y que pueden conducir al cáncer.

Lo anterior permitirá profundizar en la biología del CG y en un futuro identificar potenciales moléculas biológicas relacionadas con la transformación celular, así como, para determinar moléculas en el pronóstico y diagnóstico del CG, dado que actualmente, no existen biomarcadores específicos para esta neoplasia.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

En el 1983, Marshall y Warren demostraron que *H. pylori* es la causa principal de gastritis y ulcera péptica¹⁶. En 1994, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el cáncer (IARC, por sus siglas en ingles), reconoció a *H. pylori* como un carcinógeno tipo I⁵, por lo que se considera uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de CG, esto basado en evidencias epidemiológicas¹.

H. pylori es una bacteria Gram negativa, microaerófila, que coloniza la mucosa gástrica e induce una fuerte respuesta inmune, humoral y celular, que en la mayoría de los casos no resulta en la eliminación de la bacteria, pero que llega a producir daño al epitelio gástrico. La infección persistente de *H. pylori* puede causar en la mayoría de los individuos gastritis crónica que puede evolucionar a gastritis atrófica y a metaplasia intestinal. La localización y la gravedad del daño generado en la mucosa gástrica, altera la fisiología del epitelio gástrico, lo que puede propiciar el desarrollo del CG^{11, 17}.

La bacteria presenta factores de virulencia que le permiten colonizar y sobrevivir en el medio hostil de la mucosa gástrica. *H. pylori* produce la enzima ureasa que cataliza la hidrólisis de la urea produciendo CO₂ y NH₄, creando un ambiente neutro alrededor de la bacteria lo que le permite sobrevivir en el estómago, la bacteria presenta una estructura en espiral que le permiten desplazarse hacia las células epiteliales. Para evitar su eliminación dentro de la mucosa, la bacteria contiene varias proteínas de membrana externa (OMPs): BabA, SabA, OipA y HopZ, que pueden mediar la adhesión de *H. pylori* a las células epiteliales^{5, 18-20}.

Otra característica que presenta la bacteria para evadir la respuesta inmune, es a través de su lipopolisacárido (LPS) y de sus flagelos a través de la proteína flagelina (FlaA). Estas moléculas son previamente modificadas impidiendo ser reconocidas por los receptores Toll-like (TLR-4 y TLR-5) presentes en células de la mucosa gástrica. Por otra parte, estudios *in vitro* han reportado que la citotóxina VacA secretada por la bacteria, interfiere fuertemente con las células de la respuesta inmune inhibiendo la proliferación de linfocitos T y B, también es capaz de interrumpir la función normal de los macrófagos induciendo apoptosis o interrumpiendo la maduración del fagosoma, así como regular negativamente la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS)²⁰.

Se ha determinado que tras la colonización y la supervivencia en el epitelio gástrico, *H. pylori* libera sustancias tóxicas que estimulan la respuesta inmune innata y adaptativa (humoral y celular), en la que fundamentalmente participan los neutrófilos, macrófagos, mastocitos y linfocitos T, entre otras células del sistema inmunológico, que al ser activadas liberan localmente varios mediadores químicos, responsables del daño al epitelio gástrico y como consecuencia contribuyen al desarrollo del CG^{19, 21}.

Dos de las proteínas más importantes relacionados con la patogénesis son la citotóxina VacA y la citotóxina CagA. Estas proteínas se han considerado especialmente relevantes porque las cepas que las producen se asocian a los casos de enfermedades gástricas graves, en particular al desarrollo de CG²².

2.2 Participación de VacA y CagA en la patogénesis

2.2.1 VacA

El gen *vacA* es altamente polimórfico y tiene dos regiones diferenciadas, una que corresponde a la región del péptido señal que es denominada (s1 y s2), y otra

región que corresponde a la región media (m1 y m2). Variantes en estas secuencias se asocian con variaciones en la actividad de la citotoxina VacA, la cual tiene efectos en la virulencia de *H. pylori*. Las cepas de *H. pylori* que poseen el genotipo *s1/m1* son más citotóxicas que las *s1/m2*, debido a cambios en su secuencia de aminoácidos²²⁻²⁵.

En el 2003, Coverly y colaboradores²⁶ demostraron que la cepa 60190 de *H. pylori*, tiene el genotipo *s1/m1* de la toxina VacA, induce apoptosis en células epiteliales gástricas *in vitro* (línea celular AGS) lo que podría contribuir con la carcinogénesis. Por otra parte, se sugiere que los niveles de apoptosis en células epiteliales de individuos infectados con *H. pylori* son dependientes de las variaciones en la estructura de la citotoxina VacA.

Se han descrito diversas actividades para la citotoxina VacA, que incluyen la formación de poros en la membrana de células epiteliales, el cual permite el paso de nutrientes necesarios para la supervivencia de *H. pylori*. También se ha observado un aumento en la permeabilidad para-celular, efecto que induce alteraciones en las uniones estrechas²⁷. Por otro lado, la citotoxina interfiere con la fagocitosis, el procesamiento y presentación de antígenos e impide la proliferación de células T, así como la producción de radicales libres (ROS). Se ha reportado también, que induce la liberación de citocromo c lo cual podría asociarse con la inducción de apoptosis. Sin embargo, el mecanismo exacto de cómo ocurre el proceso apoptótico todavía no se ha determinado completamente^{2, 27, 28}.

Asimismo, se ha descrito que VacA puede unirse a diferentes tipos de receptores en las células del huésped, entre ellos, se encuentra el factor de crecimiento epidermal (EGFR), esfingomielina, fibronectina, así como, a la β 2-integrina que al unirse inhibe la proliferación de células T CD4^{+23, 25, 27}. Esta unión a los receptores pueden inducir distintas señales proinflamatorias y activar distintas moléculas en las células presentes en la mucosa gástrica, como son el factor NF- κ B²⁷.

Fujikawa y colaboradores²⁷ han encontrado *in vitro* que la citotoxina VacA, interactúa con el receptor de la proteína tirosina fosfatasa (RPTP α y RPTP β). En estudios con ratones a los que se les modificó en el receptor RPTP β muestran una notable resistencia a úlceras gástricas. Ratones con RPTPZ (+/+) desarrollaron úlcera gástrica, con una pérdida de glándulas y células epiteliales, lo que sugiere que RPTP β puede desempeñar un papel importante en la toxicidad de VacA²⁹. Se ha observado además que VacA interactúa con otras moléculas de superficie celular como: lípidos y balsas lipídicas.

Se ha propuesto que la apoptosis mediada por VacA depende de las interacciones con la mitocondria. El efecto de VacA en la mitocondria es debido a la reducción del potencial de membrana mitocondrial. Estudios han demostrado, que la mayoría de las moléculas de VacA se encuentran en endosomas tempranos, que migran y se adhieren a la mitocondria formando canales de Cl⁻, causando la pérdida del potencial de membrana y la activación de las proteínas Bax y Bak (familia Bcl-2) y de diversas caspasas que generan la ruptura de la membrana mitocondrial, alterando el ciclo celular en las células epiteliales^{2, 30}.

Otro papel importante de VacA es en la alteración de diferentes vías celulares e inducción de inflamación. Esta citotoxina induce la producción de varias citocinas inflamatorias que incluyen TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 y IL-13. También se ha visto que IL-18, es producida por diferentes líneas celulares, en respuesta a VacA mediante la activación de MARK y la activación continua de los factores ATF-2, CREB y NF- κ B. El factor activador 2 (ATF-2) y ERK permiten el aumento de COX-2, aumentando la producción de prostaglandinas (PGE₂)²².

2.2.2 CagA

La isla de patogenicidad de *H. pylori* *Cag(PAI)* es un factor de virulencia que puede aumentar el riesgo de cáncer, contiene aproximadamente de 21 a 31 genes que codifican para el sistema de secreción tipo IV (TSS4). De 10 a 15 genes presentes en la isla de patogenicidad codifican para el sistema de secreción tipo IV responsables del transporte de la proteína CagA y otras moléculas, hacia el citoplasma de las células epiteliales^{11, 31}.

La proteína CagA es producida por aproximadamente el 70% de los aislamientos clínicos y se ha documentado la correlación con el desarrollo de CG y linfoma MALT por lo que se considera como una oncoproteína potencialmente importante en el desarrollo de CG⁵. Una vez internalizada CagA a las células epiteliales, puede tener dos funciones, una que puede actuar en un estado dependiente de la fosforilación y otro que es independiente de la fosforilación.

La proteína CagA fosforilada por las quinasa Abl o la quinasa de la familia Src (SH2), en los residuos de tirosina dentro de los motivos EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala)^{5, 11, 23}. Los motivos EPIYA se encuentran presentes en un número muy variable en CagA de diferentes cepas, entre los diferentes fenotipos se encuentra: el motivo EPIYA-C característico de CagA de aislamientos de *H. pylori* en Europa, América del Norte y Australia, mientras que EPIYA-D es específica de países de Asia Oriental. Cabe señalar que se ha observado un aumento en el efecto de la fosforilación y el potencial oncogénico en motivos EPIYA-C, por lo que las diferentes isoformas de CagA pueden contribuir a la tasa de CG en países occidentales¹¹.

Doyle y colaboradores observaron que la variabilidad de los motivos EPIYA juegan un papel importante en la patogénesis producida por *H. pylori*. Las cepas positivas de CagA y un número elevado de motivos EPIYA han sido relacionados con un aumento en gastritis crónica y atrofia gástrica, el grado de diversidad en la función

de estas proteínas depende en gran medida de los motivos de fosforilación para la actividad biológica de CagA³². Estudios realizados por Higashi y colaboradores³³ demostraron que al hacer mutaciones específicas en los motivos EPIYA se abate la capacidad de CagA para asociarse a la membrana plasmática.

Por otra parte se ha visto que CagA, unida a la fosfatasa SHP2 desencadena múltiples efectos celulares, como rearrreglos en el citoesqueleto, alargamiento en las células, que conducen a motilidad celular incrementada, progresión del ciclo celular, apoptosis, algunos autores informan que también se activa la vía de señalización ERK^{23, 24, 34}.

La segunda función de CagA es en un estado no fosforilado, en donde la citotoxina puede unirse a la proteína E-cadherina, al receptor del factor de hepatocitos c-Met (proto-oncogen), así como también se une a ZO-1 y a la molécula de adhesión JAM-A, generando cambio en las uniones estrechas, que contribuyen a la pérdida de la función epitelial²⁴. Otros estudios han demostrado que CagA interfiere en la polaridad celular, la proliferación celular, la diferenciación celular, la inducción de la respuesta inflamatoria y probablemente la elongación celular²².

Por otro lado, CagA se une a E-cadherina e impide la formación del complejo E-cadherina/ β catenina. Cuando este complejo no se forma se acumula β -catenina en el núcleo y el citoplasma. En el citoplasma β -catenina es desfosforilada y translocada en el núcleo, donde forma heteródimeros con otros factores de transcripción, dando como consecuencia la transcripción de genes con potencial oncogénico, de la misma manera, CagA regula positivamente el gen de la β -catenina mediante el gen CDX1, el cual codifica un factor importante en la diferenciación de las células intestinales. CagA aumenta la expresión de mucinas (MUC2) de las células calciformes, el cual es un marcador importante en la MI. CagA puede activar la vía ERK/MAPK y, aumentar la transcripción de factores de transcripción involucrados en la proliferación celular²².

Se ha visto que aunque CagA es un factor de virulencia importante para el desarrollo de CG, las variaciones encontradas en su genoma pueden hacer que la actividad de CagA varíen entre cepa y cepa, lo que puede influenciar la patogenicidad de las cepas *cagA+* y el proceso patológico de la enfermedad³⁵. Se ha demostrado que los pacientes que son seropositivos a CagA muestran un riesgo mayor de padecer la gastritis crónica, gastritis atrófica y CG distal, comparado con aquellos que son seropositivos¹¹.

2.3 Interacción entre *H. pylori* y la respuesta inmune del hospedero.

Una característica distintiva de la infección por *H. pylori*, es el aumento en la respuesta inflamatoria. Actualmente se sabe que la inflamación crónica es un factor de riesgo fuertemente asociado al desarrollo de CG. Estudios epidemiológicos han demostrado claramente que la inflamación crónica predispone a la formación de tumores en varios órganos, se ha estimado que aproximadamente el 25% de los casos de cáncer en los seres humanos se encuentran asociados a la inflamación³⁶. Virchow (1863) fue uno de los primeros en reconocer la asociación entre la inflamación y el cáncer; cuando se dio cuenta que el cáncer surgió en las zonas de inflamación crónica. Se sugirió que el cáncer surgió de una célula madura en el tejido periférico, como resultado de inflamación³⁷.

En la inflamación los cambios en el epitelio gástrico son consecuencia de las alteraciones en la diferenciación de las células epiteliales normales, la infiltración de células del sistema inmunológico y de la secreción de citocinas, que pueden generar en un momento dado el desarrollo de gastritis atrófica, metaplasia intestinal y CG. Diversas investigaciones han demostrado que existe una proteína de la familia hedgehog, que se expresa y secreta en células parietales que son parte indispensable en las células gástricas, este es el homólogo Sonic Hedgehog

(Shh). La pérdida y la alteración en la expresión de Shh, junto con la proliferación celular y la diferenciación de células madre gástricas se correlaciona con la pérdida de la diferenciación de las células epiteliales normales y el desarrollo de CG³⁸.

La continúa respuesta inflamatoria causada por *H. pylori*, genera la destrucción de tejido gástrico, que consecuentemente es precedido por la remodelación tisular (recambio tisular), con excesiva proliferación celular la cual predispone a errores mitóticos más frecuentes con mayor riesgo a mutaciones, y una activación continua de diversas citocinas proinflamatorias (TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-18, IL-10), quimiocinas (IL-8), factores de transcripción (NF-kB), radicales libres de oxígeno (ROS) y nitrógeno, que contribuyen al desarrollo de la inflamación crónica del epitelio gástrico y favorecen la posibilidad de daños al ADN, induciendo mutaciones en el ADN o silenciamiento de genes a nivel transcripcional^{1, 36, 39, 40}.

Keates y colaboradores⁴¹ mostraron que la infección por *H. pylori* con cepas que contienen la isla *cagPAI*, incrementan la expresión del factor de transcripción NF-kB, considerado como un regulador clave de la inflamación, que se ha involucrado en los procesos de desarrollo y progresión tumoral por lo que se ha asociado al cáncer. La activación de NF-kB en las células epiteliales, células premalignas y las células malignas tiene efectos no sólo en la regulación de la supervivencia celular, la proliferación y el crecimiento, sino también en la transición del epitelio³⁶.

Matsumoto y colaboradores⁴², mostrarón que la infección de las células epiteliales con *H. pylori* que tienen la isla *cag-PAI*, induce la expresión y activación del gen citidina deaminasa (AID), que actúa a través de la activación del factor NF-kB. Por otra parte, se determinó que la estimulación de TNF- α aumenta la expresión de la proteína endógena AID en las células epiteliales gástricas y que esto puede predisponer a mutaciones somáticas en el gen supresor de tumores p53 en células infectadas *in vitro*, lo cual evidencia que la expresión de AID como una

consecuencia de la infección *H. pylori* podría acumular mutaciones en varios genes de la mucosa gástrica y llevar al desarrollo de CG⁴².

En otros estudios se han reportado fuerte asociación entre INF- γ y TNF- α , en el desarrollo de CG. El TNF- α está implicado en el control del crecimiento de tumores y en la respuesta inflamatoria, mientras que el INF- γ juega un papel importante en la promoción de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Estudios de Fan y colaboradores⁴³ encontraron que tanto el INF- γ y TNF- α aumentaron la expresión de CD44, que es identificado como un marcador de células madre cancerígenas (CSC), por lo que, se ha visto que poseen propiedades tumorigénicas tanto *in vitro* como *in vivo*.

La Óxido Nítrico sintetasa (iNOS), es expresada tanto por los macrófagos y las células epiteliales durante la inflamación, generando moléculas biorreactivas como el óxido nítrico (NO). NO inhibe enzimas de reparación del ADN (ADN 8-oxodeoxyguanosine glycosylase 1 en humanos), lo cual puede llevar a la acumulación de daño en el ADN. La producción de NO promueve el crecimiento tumoral por la estimulación de angiogénesis, incrementa la permeabilidad vascular y la supresión de la respuesta inmune⁴⁴.

2.4 Historia Natural del Adenocarcinoma Gástrico de Tipo Intestinal.

En el año de 1965 Lauren⁴⁵ describió dos tipos histológicos distintos de CG: El CG de tipo intestinal y CG de tipo difuso, cada uno con características histopatológicas, clínicas y epidemiológicas propias. Pelayo correa, fue el primero en describir la historia natural del cáncer gástrico de tipo intestinal, proponiendo que este tipo de cáncer es precedido por una serie de lesiones que incluyen: gastritis superficial, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y displasia, finalizando con el CG (ver figura 1)⁴⁶.

La historia natural del CG de tipo intestinal comienza con la colonización de *H. pylori* en la mucosa gástrica, que en conjunto con factores de virulencia (VacA-s1m1, CagA) y la intensa respuesta inflamatoria con participación de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , INF- γ), llevan a la generación de gastritis crónica⁴⁶.

La gastritis crónica se considera un proceso inflamatorio, no específico, de causa multifactorial, que se caracteriza por un aumento en la infiltración de leucocitos mononucleares en la lámina propia y células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas, de estas células los leucocitos mononucleares son los responsables de generar una respuesta inflamatoria intensa⁴⁷ la cual puede variar dependiendo de la cepa infectiva⁴⁶. En esta etapa, también se ha encontrado acumulaciones en la infiltración de células polimorfonucleares (PMN) en la luz glandular o faveolar, así como de agregados linfoides con centros germinales, que son acompañados de ciertas citocinas pro-inflamatorias o de una respuesta Th1 con la expresión de interleucina (IL)-1 β , factor de necrosis tumoral (TNF) e interferón (INF- γ). Bajo ciertas circunstancias, la respuesta de tipo Th1 se puede atenuar e incrementar la respuesta tipo Th2 o anti -inflamatoria, con la expresión de las citocinas como IL-4 e IL-5⁴⁶.

En los seres humanos, la co-infección con helmintos intestinales se ha asociado con altos niveles séricos de inmunoglobulina E (IgE) y una alta respuesta Th2 que producen IgG1, esto llevo a formular una hipótesis, de que la alta respuesta Th2 y el aumento de eosinófilos en la mucosa gástrica pueden mejorar el daño al epitelio y por lo tanto disminuye el riesgo de transformación maligna, promovido por el proceso inflamatorio ("*Enigma Africano*")^{24, 46}. Por otro lado, la progresión de una respuesta inflamatoria intensa, que puede extenderse de manera superficial, puede generar la destrucción de las estructuras glandulares y favorecer al desarrollo de atrofia gástrica⁴⁸.

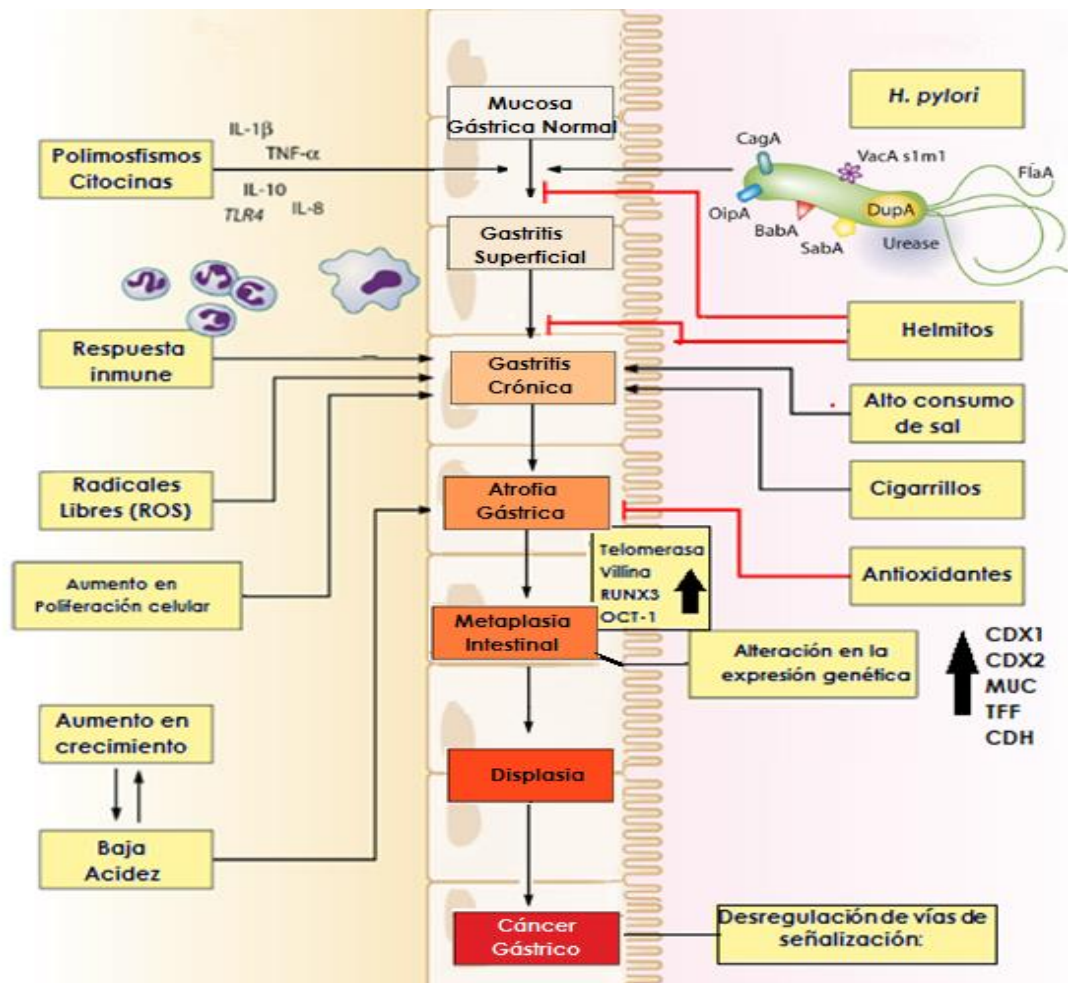


Figura 1. Historia Natural del cáncer gástrico de tipo Intestinal descrito por primera vez por Pelayo Correa. Existe evidencia de que el CG de tipo intestinal es precedido por una serie de cambios histológicos que incluyen: gastritis aguda, gastritis crónica, atrófica, metaplasia intestinal, displasia, finalizando con el CG. En la figura se puede observar que durante cada etapa del desarrollo de CG hay participación de varios factores: Ambientales (consumo de sal, cigarro, etc), Factores del huésped (respuesta inmune, ROS, proliferación celular, etc) y factores genéticos (polimorfismos, mutaciones en genes que desregulan su expresión) que actúan en combinación para contribuir a la cascada precancerosa que conduce al desarrollo del cáncer gástrico (modificado de Wroblewski, et al., 2010)⁵

La atrofia es el inicio de las lesiones precancerosas, se presenta generalmente en la mucosa del cuerpo gástrico y en algunas regiones del antro, que puede progresar y expandirse de manera multifocal con el tiempo. La atrofia se caracteriza por la pérdida de las glándulas gástricas, seguida de fibrosis de la lámina propia, además hay una reducción de ácido, inflamación e infiltración de neutrófilos^{46, 49}. Un buen indicador del grado de atrofia es el nivel de pepsinógeno en sangre, secretada por la mucosa oxíntica⁴⁶.

La atrofia puede evolucionar a metaplasia intestinal, caracterizada por el cambio fenotípico de las células epiteliales normales a un fenotipo intestinal, que en base a la morfología e histoquímica se clasifica en dos tipos: MI de tipo intestinal o completa y MI de tipo colónica o incompleta. La metaplasia intestinal completa se caracteriza por la presencia de células caliciformes secretoras de sialomucina, intercaladas entre células absorbentes (que expresan un conjunto completo de enzimas digestivas como sacarosa y trehalosa) y un borde en cepillo que facilitan la absorción de los alimentos digeridos y células de paneth. La MI tipo colónica se parece a un fenotipo de intestino grueso en morfología, hay expresión de mucinas, en esta etapa desaparece el conjunto de enzimas digestivas de manera parcial o completa, las células epiteliales normales no presentan borde en cepillo, carece de células de Paneth y absortivas. En este tipo de metaplasia, las células caliciformes pueden secretar sialomucina y/o sulfomucina, las células columnares característicamente secretan sulfomucinas^{46, 50} (Ver figura 2).

La MI puede evolucionar a displasia, esta lesión presenta un fenotipo neoplásico, que se caracteriza por presentar en el epitelio de núcleos grandes, hiper-cromáticos con mitosis frecuentes. Esta lesión se ha clasificado como de alto grado o bajo grado⁴⁶. Esta lesión progresa hasta evolucionar a CG de tipo intestinal, que se caracteriza por acumulaciones en mutaciones en el ADN, proliferación de células epiteliales, presencia de oncogenes, entre otros procesos

necesarios que requieren las células neoplásicas, para degradar la matriz del estroma que las rodea.

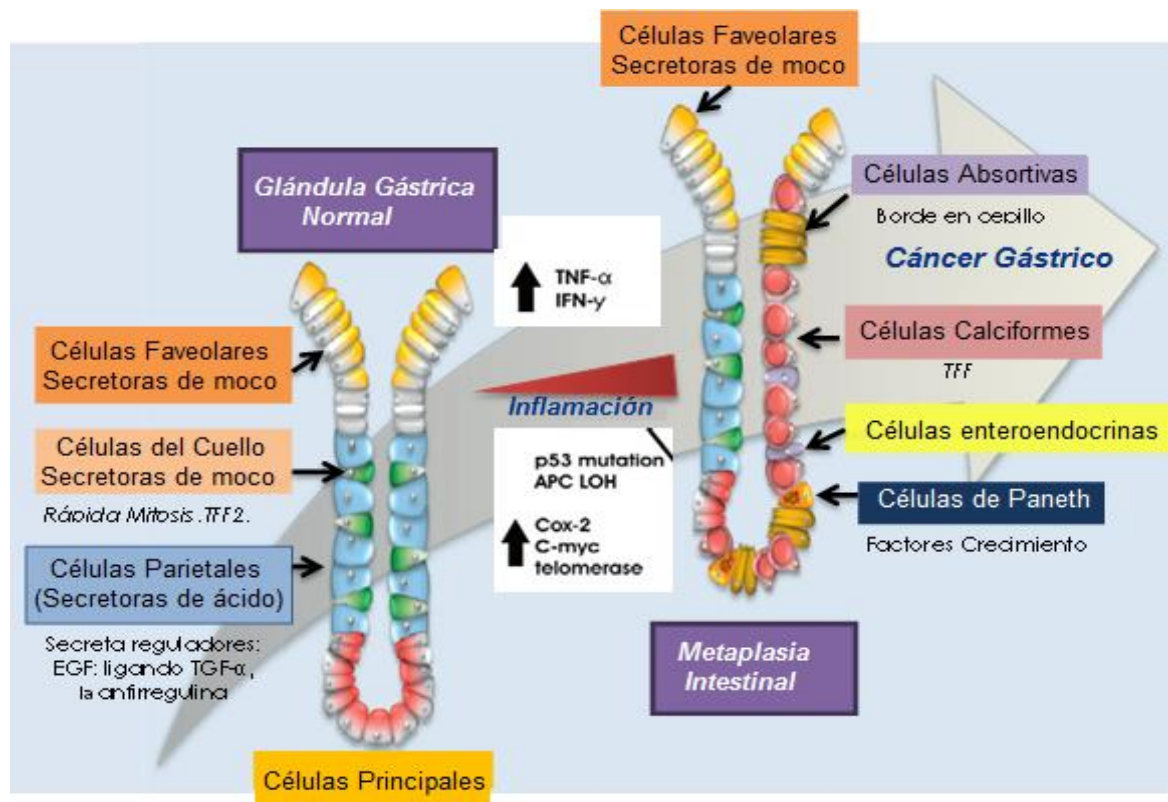


Figura 2. Representación esquemática de una glándula gástrica normal y una glándula en metaplasia intestinal. La mucosa gástrica normal está organizada como una capa superficial de epitelio tipo faveolar, con células secretoras de moco, la región del cuello donde se encuentran las células en proliferación, células parietales secretoras de ácido y células principales productoras de pepsinógeno. Del lado derecho de la figura se muestra una glándula en metaplasia intestinal con diferentes tipos de células intestinales. Al observar células calciformes, células absorbentes, células de Paneth y células neuroendocrinas que pueden aparecer de manera sola o en combinación en la etapa de MI (modificado de Barros 2012)⁵¹.

2.5 Estudios Genéticos en CG

Hasta el momento no se ha identificado que *H. pylori* produzca mutaciones de manera directa, por lo tanto se considera que este efecto lo realiza de manera indirecta, debido a la intensa respuesta inflamatoria que se produce en el estómago, la cual promueve una serie de cambios morfológicos y moleculares que pueden dar origen a las distintas lesiones gástricas. Entre estos cambios presentes en la mucosa gástrica se encuentran los cambios a nivel genético, en el que se han observado mutaciones en distintas moléculas que son responsables del control biológico dentro de la mucosa del estómago.

Estudios genéticos han puesto de manifiesto la alteración en genes relacionados con el cáncer gástrico, tales como β -catenina, K-ras, c-erbB2, p53, p16, E-cadherina y APC⁵². Varios autores han reportado que durante la transformación de la mucosa gástrica se presentan alteraciones en genes involucrados en los diferentes estadios de la carcinogénesis. Los genes que están implicados en diferentes funciones celulares son: genes relacionados con citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, genes de adhesión celular, transducción de señal, diferenciación celular y reparación en el ADN⁸.

2.5.1 Mecanismos reparadores de ADN (MMR)

El genoma de todos los organismos vivos está constantemente sujeto a condiciones que le causan daño al ADN. La maquinaria celular que responde a los daños en el ADN está constituida por una red dinámica de proteínas y complejos proteicos capaces de detectar y reparar el daño en el ADN. Las células pueden utilizar distintos mecanismos que retrasen la progresión del ciclo celular, lo que permite reparar lesiones o eliminar a las células mediante apoptosis cuando la

célula tenga un daño excesivo, irreparable y que interfiera gravemente con la reparación del ADN⁵³.

En algunos estudios se ha propuesto, que el daño o deterioro en el sistema de reparación de la ADN (MMR del inglés *mismatch repair machinery*) es una causa conocida que lleva al daño del ADN y promueve la progresión tumoral en cánceres humanos hereditarios. El sistema MMR es importante para mantener la integridad genómica mediante el reconocimiento y reparación de errores de nucleótidos mal apareados, errores del ADN polimerasa o la formación de heterodúplex. Este sistema, está constituido de seis genes principales (*MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *MSH3*, *MSH6*), en donde mutaciones de cualquiera de estos genes se relaciona con la deficiencia en el sistema de reparación que pueden llevar al desarrollo del CG¹⁰.

Los genes *MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *MSH3*, *MSH6*, son considerados como genes supresores de tumores, que se expresan en el ciclo celular. Se sabe que la expresión de *MLH1* es esencial para el mantenimiento de la inestabilidad de microsatélites (MSI), se ha visto que pacientes con cáncer gástrico presentan pérdida en la expresión de *MLH1*¹⁰. Por otro lado, se ha visto que la metilación incorrecta de la enzima O⁶-metil guanina metiltransferasa (MGMT) lleva al desarrollo de cáncer. Se ha visto que la guanina alterada no se aparea con citosina, sino con timina, por lo que la replicación del ADN originaría una mutación que podría conducir al desarrollo de cáncer gástrico⁵⁴.

Bartchewsky y colaboradores¹⁰ en el 2009, estudiaron los niveles de expresión de ARNm de *MLH1* y *MGMT* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico, mediante la técnica de RT-PCR e inmunohistoquímica. En el estudio se incluyeron 26 pacientes no infectados con *H. pylori*, 127 con gastritis crónica (positivos a *H. pylori*) y 64 con cáncer gástrico, se observó que en la gastritis crónica hubo un

incremento general en la expresión de MLH1 y MGMT. Mientras que estos niveles disminuyen significativamente entre los pacientes con cáncer gástrico.

2.5.2 Genes supresores de tumores

2.5.2.1 MSI y LOH

La inactivación de genes supresores de tumores debido a la pérdida en la heterogeneidad (LOH) está ampliamente relacionada con CG. La pérdida en la heterogeneidad puede llevar a la inactivación del gen *p53* y *p16*, los cuales tienen un papel muy importante en el ciclo celular, y que está implicado en el desarrollo de CG de tipo intestinal y CG de tipo difuso. Se ha visto que mutaciones en APC debido a LOH parecen ocurrir frecuentemente en CG de tipo intestinal, debido a que APC juega un importante papel en la degradación de β -Catenina, cuya concentración se mantiene a niveles bajos, evitando la acumulación en núcleo y citoplasma, lo que impide la activación de factores de transcripción relacionados con señales pro-inflamatorias⁸.

Con respecto a la inestabilidad de microsatelital (MSI), está caracterizada por mutaciones, principalmente deleciones, en secuencias repetitivas y cortas del genoma, que son totalmente diferentes al número de repeticiones que tenía el ADN cuando se heredó. Los MSI es el resultado de defectos en el MMR y se ha observado entre el 13-44% de los tumores gástricos. Hamamoto y colaboradores⁵⁵ reportaron una alta expresión en MSI en el 47% de los casos de cáncer gástricos y el 27% en casos de MI. El estudio concluyó que la frecuencia más alta en la MSI se observó sólo en cáncer de tipo intestinal y la pérdida de heterogeneidad (LOH) se observó sólo en 2 de las 15 muestras estudiadas⁵⁶.

2.5.2.2 Expresión de TFF (*factor trifoil*)

El factor trifoil desempeña un papel importante en el mantenimiento y reparación de la mucosa gástrica normal. En ratones la baja expresión del TFF1 conduce al desarrollo de tumores gástricos. TFF2 (o péptido espasmolítico) se encuentra expresado en las células mucosas del cuello de las glándulas gástricas. El TFF3 (o factor trifoil intestinal: ITF) se expresa en altos niveles en células caliciformes de intestino delgado y grueso. Se ha observado que la alta expresión del TFF1 y 3 está asociada fuertemente con Metaplasia Intestinal, mientras que la pérdida o la baja expresión está relacionada con CG de tipo intestinal ^{14, 56}.

Zheng en el 2004⁸, reporta que la pérdida de expresión de TFF1 se observó en aproximadamente el 44% de los casos de carcinoma gástrico, mientras que la pérdida del péptido TFF2 fue descrito en aproximadamente el 50% de los casos de carcinoma gástrico. Recientemente, estos investigadores también encontraron evidencia de una doble función anti-proliferativa y anti-apoptóticos del gen TFF1.

2.5.3 Factores de transcripción.

2.5.3.1 Genes homeobox *CDX1* y *CDX2*

Los genes homeobox (*CDX1* y *CDX2*) son específicos de intestino y se ha demostrado que se expresan de forma aberrante en MI humana. Mutoh y colaboradores⁵⁷ examinaron la asociación entre MI y el desarrollo de carcinoma gástrico, notificando que los pólipos gástricos que se desarrollan a partir de mucosa gástrica con MI en ratones transgénico-*CDX2* desarrollan adenocarcinoma tipo intestinal. Por otra parte, verificaron la participación de mutaciones en los genes *p53* y *APC* que se han detectado en los carcinomas gástricos, particularmente en el carcinoma gástrico de tipo intestinal. Estos

resultados fueron verificados en ratones transgénicos que llevan mutaciones en APC (Cdx2Tg Apc +/- Min) y p53 (Cdx2Tg p53 +/-).

Kang y colaboradores⁵⁸ determinaron la expresión genética de CDX1 y CDX2 en MI, la progresión hacia distrofia y CG, mediante la técnica de RT-PCR en muestras corporales. Se observó en el estudio, que la expresión de CDX2 y CDX1 fue significativamente mayor en la infección con *H. pylori* y en MI tipo incompleta, lo cual, sugiere que tanto CDX1 y CDX2 desempeñan un papel importante en la progresión del CG.

2.5.3.2 Baja expresión del gen RUNX

RUNX3 es un factor de transcripción que actúa como un regulador del crecimiento en células epiteliales gástricas. Li y colaboradores⁵⁹ mostraron que la expresión de RUNX3 en la mucosa gástrica de los ratones que mostraron hiperplasia como resultado de una mayor proliferación y una supresión de apoptosis en las células epiteliales gástricas. También mostraron que los niveles de ARNm de RUNX3 son bajos en la MI y el cáncer gástrico.

2.5.3.3 Genes de Villina y Sox

La villina es una proteína estructural regulada por el aumento del calcio intracelular que a su vez se une a la actina y contribuye a la formación de microvellosidades en el intestino delgado. Ratones deficientes en este gen, desarrollan microvellosidades, pero no responden normalmente a las señales dependientes de calcio lo que genera daño celular. Además se ha demostrado que la villina se expresa en estómago y ratones en gastritis atrófica y MI, al ser infectados con *H. pylori*⁶⁰.

El gen Sox2, el cual juega un papel importante en la embriogénesis, se ha encontrado en la mucosa normal y tiene una baja expresión en intestino delgado. Durante la progresión a través de las etapas de la carcinogénesis los niveles de Sox2 disminuyen, mostrando una correlación inversa a CDX1 y CDX2, mostrándose ausente en MI y CG⁵⁶.

2.5.4 Activación de oncogenes

Los oncogenes regulan la división celular y pueden ser clasificados por su localización en citoplásmicos y nucleares; al ser activados por mutaciones (sustituciones de nucleótidos, inserciones, deleciones, amplificaciones o translocaciones) pueden causar cáncer.

Los grupos de oncogenes que son activados normalmente son factores de crecimiento, que actúan sobre receptores de membrana específicos, con actividad tirosin quinasa. Éstos reciben la señal y la transmiten al interior de la célula, iniciando la cadena de eventos para la activación de la transcripción de ADN y la proliferación⁶¹. Por ejemplo el proto-oncogén *c-met*, que codifica un receptor tirosina quinasa para el factor de crecimiento de hepatocitos, está altamente expresada en 50% de los CG de tipo intestinal y CG de tipo difuso⁸.

2.5.4.1 *c-Myc*, p27y *c-erB2*

La oncoproteína *c-Myc* es un factor de transcripción que regula varios genes íntimamente implicados en la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y oncogénesis. *c-Myc* disminuye no sólo la transcripción, sino también el transporte nuclear de p27 desde el citoplasma, por lo tanto, influye en la regulación de la transición G1/S para la progresión del ciclo celular a través de p27⁶². Algunos estudios muestran que p27 disminuye en gastritis y en metaplasia intestinal⁶³.

Kim y colaboradores⁶² en el 2006, determinaron en 22 pacientes con gastritis crónica el número de células epiteliales antrales que expresaron p27, Skp2 (miembro de la familia de proteínas de la caja F) y *c-Myc* mediante inmunohistoquímica y microdisección de captura por láser. Las células que expresan la proteína Skp2 ($37\pm 2.4\%$ pre-erradicación de *H. pylori* y $55\pm 2.8\%$ post-erradicación); mientras que para Skp2: $35\pm 3,8$ y $23\pm 2,6\%$ y *c-Myc* fue: $47\pm 3,6$ y $30\pm 3,8\%$.

El *c-erbB2 (HER-2/neu)*, otro protooncogén, es un receptor de tirosina quinasa transmembrana. Se ha visto que la sobre expresión de *HER-2/neu* se asocia con aproximadamente una cuarta parte de todos los tumores malignos del tracto gastrointestinal⁸.

2.5.4.2 Factores de crecimiento HGF y bFGF

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) está involucrado en la estimulación de la división mitótica del epitelio, la migración celular, puede mejorar el movimiento y la capacidad invasiva de las células cancerosas. A través de la unión con el receptor *c-met*, puede activar las células endoteliales vasculares. Por otro lado, el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) está involucrado en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación celular.

En un grupo de pacientes chinos Zhang y colaboradores⁶⁴ investigaron la relación entre los niveles de ARNm de HGF, bFGF y la densidad de los microvasos (MVD) en pacientes chinos. Detectaron mediante hibridación *in situ* la expresión de ARNm (de HGF y bFGF), donde encontraron que la expresión de ARNm de HGF fue más alta en CG (57.1%), que indica un efecto significativo en el potencial invasivo de las células cancerosas.

2.5.5 Variación en la expresión de varios genes implicados en gastritis crónica y cáncer gástrico.

Chen y colaboradores¹⁵ en el 2003, observaron la expresión de genes en un ensayo de microarreglos de ADNc (representando ~30,000 genes diferentes), en donde utilizaron tejido normal de intestino delgado y colón como control, comparándolos con diferentes regiones del estómago (antro, cuerpo y antro con metaplasia). Se utilizaron 14 tejidos de CG y 22 tejidos no gástricos. Ellos encontraron una diversidad de patrones de expresión genética en CG y MI. Los genes en MI altamente expresados están relacionados con el transporte celular (KCNJ16, PSMB9), genes implicados en metabolismo de lípidos (proteína microsomal transportadora de triglicéridos (MTP), Proteínas de unión a ácidos Grasos (FABP1), apolipoproteína A1 (APOA1), metabolismo de aminoácidos (gamma glutamiltranspeptidasa 1 (GGT1)) o metabolismo de glucosa (aldolasa B (ALDOB)), que también fueron altamente expresados en intestino delgado y en menor expresión en colon. También se analizaron genes relacionados con el control de la diferenciación intestinal entre ellos factores de transcripción (CDX1, CDX2, y HNF4A), genes relacionados con proteínas integrales de membrana y moléculas de adhesión, características de epitelio intestinal (CLDN3, CLDN4, CDH17 y VIL1).

2.6 Importancia del análisis de proteínas en CG a través de técnicas proteómicas.

Actualmente, algunos investigadores están interesados en el estudio de la expresión de proteínas presentes en CG, con la finalidad de conocer acerca de los procesos de transformación de las diferentes etapas involucradas en la

carcinogénesis o el descubrimiento de nuevos biomarcadores. En estudios proteómicos, se han determinado diferencias en la expresión de proteínas, éstas se encuentran sobre-expresadas en CG, mientras que en tejido normal se encuentran en baja-expresión, esta expresión diferencial involucra proteínas que están relacionadas con apoptosis, respuesta al estrés, ciclo celular, comunicación celular y metabolismo asociadas con cáncer gástrico, pero no así con lesiones como la gastritis crónica..

2.6.1 Identificación de proteínas diferenciales en CG a través de técnicas proteómicas

Li y colaboradores⁶⁵ identificaron proteínas diferencialmente expresadas en CG y tejido normal de 10 pacientes, las cuales fueron analizadas por electroforesis 2-DE y espectrometría de masas. En este estudio se identificaron proteínas de alta expresión en CG que están relacionadas con: a) proteínas de regulación transcripcional, como la proteína dedo de zinc 268, b) proteínas reguladoras de la transducción de señales, como el regulador de señalización de la proteína G- 3 (RGS3), c) proteínas relacionadas con cáncer, tales como la proteína Ras, d) las proteínas del citoesqueleto, e) proteínas de tejido muy específico, tales como proteína de unión a calcio CaBP5. Las proteínas que se observaron en baja expresión incluyen: a) proteínas de regulación transcripcional, como el represor transcripcional CTCFL, b) proteínas del citoesqueleto, c) enzimas metabólicas, tales como peroxirredoxina 2. Algunas proteínas de estas juegan un papel importante en la progresión del crecimiento maligno, mientras que otras son importantes en el mantenimiento de las condiciones normales del tejido gástrico.

Bai y colaboradores⁶⁶ analizaron los patrones de expresión de proteínas en 8 pacientes con CG, encontrando que 32 spots de proteínas diferentes entre el tejido normal y el tejido tumoral. Mediante Western blot se confirmó la expresión diferencial de 9 proteínas relacionadas con procesos apoptóticos: AGR2, ENO1,

GDI2, GRP78, GRP94, PPIA, PRDX1, PTEN y VDAC1. En este mismo estudio, también se determinó mediante tinción inmunohistoquímica en tejido de 145 pacientes con CG, cada una de estas 9 proteínas, demostrando una asociación significativa entre la tinción y las características clínicas de la enfermedad. Por lo que estos investigadores proponen a ENO1, GRP78, GRP94, PPIA, PRDX1 y PTEN como potenciales biomarcadores para CG.

Kocevar y colaboradores⁶⁷ analizaron muestras de tejido de CG y tejido normal (32 tejidos), utilizando como técnicas la electroforesis 2-DE y la espectrometría de masas. Se determinaron 30 proteínas diferenciales implicadas en diferentes procesos biológicos: metabolismo, desarrollo, muerte celular, respuesta al estrés, ciclo celular, comunicación celular, transporte y la motilidad celular. De éstas 30 proteínas, se seleccionaron ocho proteínas para ser validadas por inmunoblot. Se detectó la baja expresión de la proteína (MRPL12) en adenocarcinoma gástrico, así como la bajaexpresión de GKN1, PACAP, GSTM3, mientras que las proteínas SEPT2, UBE2N, TALDO1 fueron altamente expresadas. También determinaron la presencia de la prteína TPT1 en pacientes con borde del esófago gástrico/cáncer de cardia. Esta investigación sugiere a estas proteínas de gran importancia debido a su papel en metabolismo (MRP12, PACAP, GSTM3, UBE2N, TALDO1), en desarrollo (GSTM3, SEPT2), en muerte celular (PACAP, TPT1), respuesta a estrés (UBE2N), en ciclo celular (SEPT2), en comunicación celular (GSTM3) y en transporte (SEPT2, TPT1).

Chen y colaboradores⁶⁸ administraron 100 µg/mL de N-methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina (MNNG) en agua y Cloruro de Sodio al 10% por sonda a 12 ratas Wistar, para producir CG y MI. Una vez obtenidas las lesiones, se determinó los patrones de expresión de proteínas en tejido normal, CG y metástasis, por medio de las técnicas de electroforesis 2-DE/MALDI-TOF-MS. Se identificaron proteínas de citoesqueleto, proteínas asociadas a estrés, proteínas implicadas en la transducción de señal, proteínas asociadas en proliferación, diferenciación celular

y metabolismo. Once proteínas fueron altamente expresadas y dos de baja expresión en tejido tumoral en comparación con el tejido normal. La alta expresión de HSP27 y PDI, también fue confirmada por análisis inmunohistoquímico en CG humano. Demostrando que la combinación de modelos animales en análisis proteómico ayudan a la comprensión de cambios en el proceso de la carcinogénesis y la formación de metástasis.

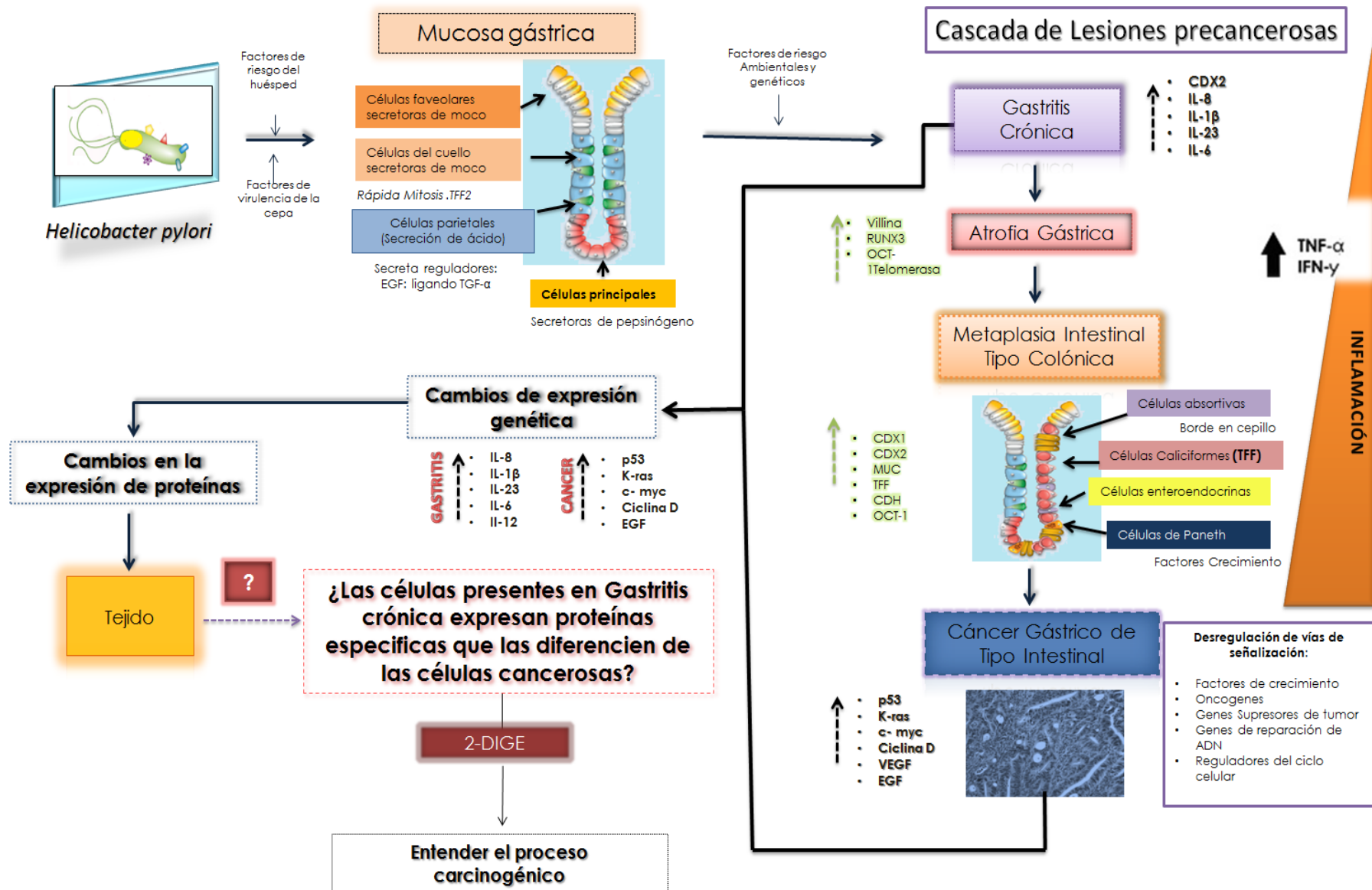
Wu y colaboradores⁶⁹ utilizaron la técnica 2D-DIGE para determinar la expresión de proteínas en tejido de CG de origen epitelial y mucosa normal adyacente. Se determinaron 22 spot por espectrometría de masas, de estas 7 proteínas fueron altamente expresadas e identificadas por espectrometría (chaperona HSP60, proteína hipotética, proteína similar a la actina, MnSOD (superóxido dismutasa que contiene Manganeso). Las proteínas de Baja expresión identificadas son 16 entre estas se encuentra: el fibrinógeno- γ , HSP27 (chaperona), tubulina, prostaglandina F, entre otras. Por otro lado, también se determinó el epítipo de HSP60 en la superficie de células humanas de cáncer gástrico (MKN45, KATOIII y MKN28) y en biopsias gástricas. En conclusión, los autores sugieren que MnSOD podría ser un marcador potencial de suero para el diagnóstico molecular de CG y que la técnica DIGE es de gran utilidad para la detección de proteínas expresadas diferencialmente en cáncer.

.

3. MAPA CONCEPTUAL

El cáncer gástrico es una enfermedad compleja y multifactorial, considerada como la segunda causa de muerte a nivel mundial. Varios autores, han demostrado que el principal factor para el desarrollo de CG, es la infección persistente de *H. pylori*. Por tal motivo, en 1994 la IARC reconoció a *H. pylori* como un carcinógeno tipo I.

El CG se clasifica en dos tipos: Intestinal y Difuso, cada uno con características histológicas, clínicas y epidemiológicas específicas. En especial el CG de tipo intestinal es precedido por una serie de lesiones precancerosas, que inician con la colonización de *H. pylori* a la mucosa gástrica, en donde intervienen factores del huésped y factores de virulencia de la cepa (VacA y CagA) relacionadas con la patogénesis. La mucosa gástrica normal se caracteriza por la presencia de células foveolares secretoras de moco, células del cuello secretoras de moco, células parietales y células principales con características deferentes. Entonces, una vez que *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica induce una gastritis crónica, primera etapa de la cascada de lesiones precancerosas, que esta evolucionará a atrófia gástrica, metaplasia intestinal y por ultimo a CG de tipo intestinal. Varios autores han reportado que durante la transformación de la mucosa gástrica se presentan alteraciones en genes que aumentan y disminuyen su expresión, los cuales están involucrados en los diferentes estadios de la carcinogénesis. Los eventos relacionados con la expresion genética, como la intensa respuesta inflamatoria que persiste a lo largo de las lesiones, llevan a la transformacion de la mucosa gástrica y el desarrollo de CG tipo intestinal. Por lo tanto, estos cambios probablemente pueden verse reflejados en la expresion de proteína en tejido. De tal manera surge la pregunta de investigación: ¿las celulas presentes en gastritis crónica expresan proteínas expecificas que las diferencian de las celulas cancerosas? la cual se pretende resolver mediante técnicas proteómicas con el fin de entender mejor el proceso carcinogenico.



4. JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos moleculares que desencadenan la transformación de las células del epitelio gástrico y el subsecuente desarrollo a cáncer no están bien elucidados. En trabajos recientes se ha reportado la alteración de algunos genes, pero hasta el momento no se han validado para su uso como marcadores de carcinogénesis y progresión del este tipo de cáncer.

Por otro lado, en estudios de proteómica se han encontrado en el CG alteraciones en la expresión de diversas proteínas involucradas en apoptosis, respuestas al estrés, ciclo celular, comunicación celular y metabolismo.

La gastritis crónica es una lesión que puede progresar a atrofia gástrica, metaplasia intestinal y esta a su vez al desarrollo del adenocarcinoma de tipo intestinal; por lo que será relevante conocer si existe una o varias proteínas específicas, intracelulares y/o de membrana que ayuden a diferenciar entre este estadio y el cáncer gástrico. Lo anterior permitirá profundizar en la biología del adenocarcinoma gástrico y en un futuro para identificar potenciales marcadores biológicos, asociados a la transformación celular.

5. HIPÓTESIS

Existen diferencias en la expresión de proteínas específicas de tejido entre la gastritis crónica y el adenocarcinoma gástrico.

6. OBJETIVO GENERAL

Investigar el perfil de expresión de proteínas en biopsias de pacientes infectados por *H. pylori* con gastritis crónica y adenocarcinoma gástrico tipo intestinal, para identificar las proteínas específicas expresadas en estas lesiones.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comparar el perfil de proteínas expresadas en pacientes con gastritis crónica, con las expresadas de pacientes con cáncer gástrico de tipo intestinal.
2. Identificar las proteínas que muestren una expresión diferencial entre ambas lesiones.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Diseño del estudio: Estudio experimental.

7.2 Definición y selección de la población de estudio.

7.2.1 Población de estudio

Las muestras que se utilizaron en este estudio provienen de un banco de biopsias que se formó como parte del proyecto “Identificación de biomarcadores asociados a lesiones gástricas premalignas y de transformación a cáncer por medio de electroforesis bidimensional y espectrometría de masas (LC-MS)”.

Este banco se formó a partir de pacientes que acudieron al servicio de endoscopia al Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), con indicación médica de endoscopia para el diagnóstico de alguna enfermedad gástrica, entre ellas pacientes con adenocarcinoma gástrico y gastritis crónica leve que se usaron en este estudio proteómico.

7.2.2 Selección de las muestras de tejido para el análisis proteómico

Para éste estudio únicamente se tomaron para el análisis proteómico muestras de tejido gástrico (biopsias) de pacientes con diagnóstico de gastritis crónica leve y adenocarcinoma gástrico de tipo Intestinal que se obtuvo de la región antral del estómago. Estas lesiones fueron confirmadas por médicos patólogos del INCAN, los cuales nos ayudaron con los resultados histopatológicos.

7.3 Los criterios de inclusión y exclusión

Los criterios que se usaron en el proyecto madre para la selección de los pacientes a los que se les hizo el examen por endoscopía, fueron los siguientes:

7.3.1 Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de 18 años de ambos sexos
- Pacientes que no hayan sido sometidos a cirugía gástrica previa
- Pacientes que no hayan sido sometidos a quimioterapia o tratamientos contra cáncer.
- Pacientes que no hayan tomado antiinflamatorios o inhibidores de la bomba de protones en los últimos 30 días.

7.3.2 Criterio de exclusión.

- Pacientes que no cumplan con los criterios de inclusión del estudio.
- Pacientes que no tengan diagnóstico histopatológico confirmado.
- Pacientes con otras patologías asociadas (VIH, diabetes, etc.)

7.4 Formación de los grupos de estudio

Para la formación de los dos grupos de estudio se tomaron dos muestras de pacientes con diagnóstico histopatológico confirmatorio de gastritis crónica y dos muestras de pacientes previamente diagnosticadas con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal, ambos grupos fueron positivo a *H. pylori*, para ser incluidos en el análisis proteómico.

7.5 Métodos experimentales

7.5.1 Manejo de la muestra biológica para el análisis proteómico

Las biopsias fueron seleccionadas de acuerdo a la patología, se tomaron 2 muestras de biopsias de pacientes con gastritis crónica y 2 muestras de pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal, las cuales fueron transportadas en hielo al Laboratorio 2 planta baja para su procesamiento y análisis.

También se tomó el suero de los pacientes con gastritis crónica y adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal, para determinación de anticuerpos *contra H. pylori* mediante western blot., los cuales nos ayudaron a determinar la positividad a *H. pylori*.

7.5.2 Detección de anticuerpos contra *H. pylori* mediante Western blot, en las muestras que fueron empleadas para el análisis proteómico.

Para la detección de anticuerpos en el suero de los pacientes incluidos en el estudio, se realizó por medio de la técnica de western blot utilizando como antígenos la fracción de protoplasto obtenidos de una cepa de *H. pylori* de referencia (26695).

Las proteínas presentes en los protoplastos (200µg) se separaron por electroforesis de acuerdo al protocolo de Laemmli⁷⁰, utilizando un gel separador de poliacrilamida al 10% (2.5ml Tris-HCL pH 8.8 a1.5 M, 100µl de SDS al 10%, 3.3ml de acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.8%, 50µl de APS al 10%, 10µl de TEMED y 4ml de Agua MilliQ) y el gel concentrador al 4% (2.5ml de Tris-HCL pH 6.8 a1.5 M, 100µl de SDS al 10%, 1.33ml de acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.8%, 50µl de APS al 10%, 10µl de TEMED y 1.33ml de Agua MilliQ)). El gel se corrió en una cámara de electroforesis Marca Hoefer (Mighty Small SE250/SE260)

a 1:30 h a 110 volts, una vez terminada la electroforesis, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa previamente incubada con una solución amortiguadora de transferencia (3g/L de Tris-Base, 192mM glicina, SDS 1%, metanol 20%) y la transferencia se realizó en una cámara Bio-rad a 200 Amperes durante 2 horas. Una vez finalizada la transferencia la membrana se lavó con PBS-Tween al 0.05% (buffer de fosfato salino) y se hizo el bloqueo con una solución de leche Svelty al 10% en PBS-Tween 0.005% durante 1h. Transcurrido el tiempo de bloqueo de la membrana se realizaron lavados con PBS-Tween. Posteriormente, la membrana se cortó en tiras de aproximadamente 5mm. Las tiras se colocaron en canaletas y se dejaron incubando aproximadamente 16 horas con suero de los pacientes, a una dilución 1:100. Posteriormente se lavaron las tiras con una solución que contenía PBS-Tween al 0.05%, inmediatamente se colocó el 2^{do} Anticuerpo (Anti-IgG Humana/fosfatasa) en una dilución 1:2000) durante 4h de incubación. Una vez incubada la membrana se lavó con PBS-Tween al 0.05%. Subsecuentemente se lavó con NaHCO₃ 0.1 M - MgCl₂ 1 mM, pH 9.8 durante 5 minutos. Posteriormente se retiró esta solución y se agregó el sustrato para fosfatasa alcalina (Cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT) al 2.25% y (5-bromo-4-chloro-1H-indol-3-yl) di-hidrogeno fosfato (BCIP) al 1.25%) en NaHCO₃ 0.1 M - MgCl₂ 1 mM, pH 9.8, una vez que se observaba las bandas, en aproximadamente 5-10 minutos se paró la reacción con agua MilliQ.

7.6 Separación e identificación de proteínas para análisis proteómico (2D-DIGE).

En este trabajo de tesis se han aplicado técnicas de proteómica para encontrar la expresión diferencial de proteínas en tejido (Biopsias) .

Estandarización: Para la realización del análisis proteómico se estandarizó la técnica de extracción de proteínas, eliminación de sustancias interferentes (2D-

Clean up), cuantificación de proteínas mediante el kit 2D-Quant (GE Healthcare 80-6483-56), Isoelectroenfoque (IEF) y electroforesis en segunda dimensión 2D-PAGE. Los resultados obtenidos de la estandarización nos permitieron establecer las condiciones óptimas de manejo de las distintas técnicas que se emplearon para el análisis proteómico a través de 2D- DIGE.

7.6.1 Extracción de proteínas de biopsias

Las biopsias seleccionadas se procesaron de la siguiente manera: El tejido se lavó con 50 mM de Tris-HCl pH 7.1, 100 mM KCl, 60 mM EDTA y 0.2 mM de PMSF, por 5 minutos y se colocó en nitrógeno líquido toda la noche. Al día siguiente, las muestras fueron liofilizadas durante 4 h en un concentrador de muestras marca SAVAT modelo SVC200H. Posteriormente la muestra liofilizada, se trituró y se solubilizó en 100 µl de buffer de lisis que contenía 7 M de urea, 2 M de Tiourea, 4% de CHAPS durante 1 h. Una vez transcurrido el tiempo se añadió 1 µl de Nucleasa Mix (80-6501-42, GE Healthcare) por un periodo de 30 min, la muestra se centrifugo a 13,000 rpm durante 20 min a 4 °C. Una vez transcurrido el tiempo se retiró el sobrenadante de la muestra que contiene las proteínas extraídas del tejido y el precipitado se descartó⁷¹.

7.6.2 Eliminación de sustancias interferentes en la muestra de proteínas extraídas de las Biopsias (2D-Clean up).

Para la eliminación de sustancias interferentes se utilizó el kit comercial 2-D Clean-Up marca GE Healthcare (80-6484-51). Este kit consiste en precipitar las proteínas extraídas de las biopsias y eliminar algunas sustancias como: los ácidos nucleicos, ácidos fenólicos, sales, lípidos, detergentes entre otros que permanecen en solución y que puedan interferir con el isoelectroenfoque.

Se transfirieron 100 µl de muestra de proteínas aun tubo eppendorf de 1.5 ml, se añadió 300 µl de la solución precipitante, se agitó y se dejó incubar en hielo durante 15 minutos, transcurrido ese tiempo se adicionaron 300 µl de co-precipitante. Posteriormente la muestra se centrifugo a 12,000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se obtuvo la pastilla, a la cual se le añadieron 40 µl de la solución co-precipitante, se dejó incubar en hielo durante 5 min. Se centrifugó la muestra nuevamente a 12, 000 x g a 4°C, se retiró el sobrenadante y a la pastilla se le agregaron 25 µl de agua destilada. Se adiciono 1ml del buffer de lavado (previamente incubado a -20 ° C durante 1 h como mínimo) y 5 µl de aditivo de lavado. Se incubo la muestra a -20 ° C durante 30 minutos, agitando en intervalos de 10 minutos. Se centrifugó la muestra a 12, 000 x g por 5 min a 4°C. Se re-suspendió la pastilla en 100 µl de solución de rehidratación para el isoelectroenfoque (IEF)⁷² que contiene Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 2% a pH de 8.5.

7.6.3 Ajuste del pH en el buffer de rehidratación para el marcaje de las muestra de proteínas de Biopsias para análisis 2D-DIGE

El buffer de rehidratación con el que se mantienen las muestras debe estar a un pH de 8.5. Se preparó una solución con Tris-Base 500 mM a pH 9.5, se tomaron 2µl de esta solución y se agregó a la solución de rehidratación para obtener un pH de 8.5. Es necesario corroborar que el pH en la solución de proteínas sea de 8.5, por lo que se tomaron 2-3 µl de cada muestra y se colocó sobre tiras de pH MERCK (pH de 6.5 a 10.0). Es necesario evitar la adición de aminos primarios como anfolitos o tioles (por ejemplo, DTT) antes de finalizar el proceso de marcaje con los fluoróforos.

7.6.4 Cuantificación de proteínas con el kit comercial 2D-Quant.

La cuantificación de proteínas se realizó de acuerdo al procedimiento indicado en el kit comercial 2-D Quant (GE Healthcare 80-6483-56), el cual está diseñado para la determinación precisa de la concentración de proteínas de cada una de las muestras. Las soluciones utilizadas en la muestra para IEF incluye detergentes, agentes reductores, agentes caotrópicos y anfólitos que son incompatibles con otros métodos pero no con este, por lo que es un método eficaz para determinar la concentración de proteínas.

Este método de cuantificación consiste en precipitar las proteínas, dejando las sustancias que interfieren en la solución. Se basa en la unión específica del ión cobre a la proteína, en donde solo el cobre libre remanente reacciona con el cromóforo, el cual da el color que absorbe luz en la región visible. La absorbancia de la muestra es inversamente proporcional a la concentración de proteínas.

Para la cuantificación de proteínas se preparó una curva estándar (0-25µg), usando como solución estándar 2 mg/ml de Albumina Sérica Bovina (BSA). Se prepararon seis concentraciones de BSA por duplicado como se indica en la siguiente Tabla.

Tabla. Preparación de la curva estándar						
Numero de Tubos	1	2	3	4	5	6
Concentración de BSA (µg/ µl)	0	5	10	15	20	25

Para la muestra de proteínas de la biopsia se tomaron 3 µl y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml (muestras por duplicado). Se agregaron a cada tubo 250 µl de solución precipitante, se agitó e incubó durante 2-3 min a Temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 250 µl de solución co-precipitante, se centrifugó 10,000 x g durante 5 minutos a 4°C, y eliminó el sobrenadante. Al

precipitado se le agregaron 50 µl de solución cobre y 200 µl de agua destilada. Se agitó hasta disolver el precipitado de proteínas.

Por último, se añadió 500 µl de solución colorimétrica y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Antes de transcurrido el tiempo se colocaron 200 µl de cada muestra en una placa de 96 pozos y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en un lector de placas (iMark™ Microplate Absorbance Reader, 168-1135). Con los resultados que se obtuvieron en el equipo, se generó una curva estándar con las absorbancias de cada uno de los estándares contra la cantidad de proteínas, la cual permitió determinar la concentración de proteínas de cada muestra extraídas de las biopsias⁷³.

7.6.5 Gel de integridad para muestras de Gastritis Crónica y Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal.

Para determinar la integridad de las proteínas en cada muestra utilizada para el análisis proteómico, se preparó un gel de acrilamida con una concertación al 12.5%, el cual se preparó de la siguiente manera : Gel separador (2.5 ml de Tris-HCL pH 8.8 al 1.5 M, 100 µl de SDS al 10%, 4.16 ml de acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.8%, 100 µl de APS al 10%, 20µl de TEMED y ajustar a 10 ml con Agua MilliQ) y gel concentrador al 4% (2.5 ml de Tris-HCL pH 6.8 al 1.5 M, 100µl de SDS al 10%, 1.33 ml de acrilamida al 30% y bis-acrilamida 0.8%, 100 µl de APS al 10%, 10 µl de TEMED y ajustar a 10 ml con Agua MilliQ).

Una vez preparado el gel se corrieron 10 µg de proteína de cada biopsia, esto con la finalidad de ver la integridad de la muestra de proteínas antes del IEF y la segunda dimensión. El gel nos permitió darnos cuenta si la cantidad de proteínas pipeteada en cada muestra fue homogénea, debido la distribución de sus bandas y debido al corrimiento las muestras en dicho gel. El gel se corrió a 80 V en una

cámara de Bio-rad (Mini-PROTEAN® Tetra System, utilizando como buffer de corrida una solución de Tris-Base 25 mM, SDS 0.1%, glicina 192 mM y agua destilada, por aproximadamente 3:40 h.

7.7 Preparación de las muestras de proteínas para el análisis proteómico 2D-DIGE

7.7.1 Reconstitución y preparación de los fluoróforo CyDye mínimos para el marcaje de proteínas.

Se tomaron los fluoróforos CyDye DIGE mínimos (GE Healthcare, 25-8010-65) de -20 °C y dejaron a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de usarlos, con la finalidad de evitar la exposición del fluoróforo CyDye a la condensación que podría causar hidrólisis e interferir en la reconstitución.

7.7.1.1 Preparación de la solución stock de los fluoróforo CyDye

La reconstitución del fluoróforo se realizó con dimetilformamida (DMF) para obtener una concentración final de 1nmol/μl. Esta reconstitución permitió dar color a cada uno de los fluoróforos CyDye (Cy2-amarillo, Cy3-rojo, Cy5-azul).

Se tomó el vial de cada uno de los fluoróforos CyDye. Se colocaron 5 μl de DMF (Sigma, 227056-5G) en cada vial que contenía cada uno de los fluoróforos, para obtener una concentración final por vial de 1nmol/μl. Cada vial se agitó durante 30 segundos y se centrifugó durante 30 segundos a 12 000 x g, para bajar el fluoróforo en la parte inferior del tubo.

7.7.1.2 Dilución de la solución stock

De acuerdo al manual, para el marcaje de 50 µg de proteína se recomienda una concentración del fluoróforo de 400 pmol/µl, por lo que la solución stock se diluyó en DMF. Para marcar 20 µg de proteína se utilizaron 160 pmol de fluoróforo.

Para realizar la dilución del fluoróforo a 160pmol/µl, se centrifugo brevemente el vial que contiene la solución stock (1nmol/µl). Se colocó 0.5 µl de esta solución stock y 2.89 µl de DMF en un tubo eppendorf de 1.5 ml, la cual es necesario para obtener una concentración final de 160pmol/ µl.

7.7.2 Marcaje de proteínas con los flurofóros CyDye para 2D-DIGE

7.7.2.1 Marcaje del estándar Interno (Cy2)

Para el estándar interno se tomó el fluoróforo Cy2. Se colocó un volumen necesario de cada una de las muestras de proteínas extraídas de las biopsias, cada una con 10 µg de proteína (10 µg de proteína de todas las muestras de Gastritis crónica leve y 10 µg de todas las muestras de adenocarcinoma gástrico tipo intestinal), formando un estándar interno con 40 µg de proteína y se mezclaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml protegidos de la luz, de este estándar se tomó 20 µg de proteína para el primer gel (que corresponde a un volumen de 15.04 µl, (ver tabla de abajo) y 20 µg de proteína para el segundo gel (que corresponde a un volumen de 15.04 µl), ver tabla 1.

No. Paciente	Volumen requerido para 10µg de proteína	Ajustar a un Volumen de 30.08 µl para tomar en cada tubo de estándar interno 15.04 µl de muestra con concentración final de 20 µg por gel.
P029	6.85µl	
P060	4.48µl	
P059	7.52µl	
P022	4.22µl	

Una vez colocadas las muestras en el tubo (estándar interno de 20 µg de proteína) se agregó 1 µl de la solución del fluoróforo Cy2 con una concentración de 160 pmol/µl. El tubo se golpeó suavemente con los dedos, se centrifugo y se dejó en hielo durante 30 minutos a la oscuridad. Transcurrido este tiempo se adicionó 1 µl de lisina 10 mM (L-Lysine, L5501-5g) para detener la reacción. La muestra se mezcló y se centrifugó brevemente a pulso y se dejó incubando en hielo durante 10 minutos en la oscuridad. (Ver tabla 1)

7.7.2.2 Marcaje de las Muestras de proteínas de Gastritis crónica y Adenocarcinoma Gástrico de tipo Intestinal.

Con respecto a las muestras de Gastritis Crónica y Adenocarcinoma Gástrico de tipo Intestinal, cada una se marcó con los fluoróforos Cy3 para Gastritis y Cy5 para Adenocarcinoma Gástrico (ver tabla de abajo). Se tomó un tubo eppendorf y se colocó un volumen necesario para 20 µg de proteína más 1 µl de la solución del fluoróforo Cy3 o Cy5 que tenía una concentración de 160 pmol/µl. Posteriormente se centrifugo y se dejó incubar durante 10 min en hielo y a la oscuridad (Ver Tabla 1)

Diseño experimental de Marcaje de CyDye mínimo en proteínas extraídas de biopsias

GEL	ESTÁNDAR CY2	CY3	CY5
1	20µg (2 muestras de Gastritis y 2 muestras de Cáncer)	20µg (P029 Gastritis)	20µg (P060 Cáncer)
2	20µg (2 muestras de Gastritis y 2 muestras de Cáncer)	20µg (P022 Cáncer)	20µg (P059 Gastritis)

GEL 1 (MUESTRA P029 Y P060)		TUBO	Número de paciente	volumen requerido para 20µg	Ajustar a un volumen igual	Cy3-rojo 160pmol/µl	Cy5-azul 160pmol/µl	Cy2- amarillo 160pmol/µl	Mezclar fuerte en vortex. Centrifugar a pulso y dejar 30 minutos en hielo en la oscuridad	Lisina 10 mM	Mezclar suave con el dedo. Centrifugar a pulso. 10 minutos en hielo Unir muestras marcadas Cy2,Cy3,Cy5 Volumen Total (Cy3,Cy5, Cy2): 17.04 µl +17.04µl +17.04µl = 51.12µl Añadir un volumen igual de Buffer de rehidratación pH 8.5 : 51.12 µl Mezclar suave con el dedo. Centrifugar a pulso: Dejar 10 min en la oscuridad en hielo
	1	P029	13.7µl	Llevar a un volumen final de 15.04µl	1µl			1 µl			
	2	P060	8.97µl			1µl		1 µl			
GEL 2 (MUESTRA P059 Y P022)		1	P059	15.04µl	Llevar a un volumen final de 15.04µl		1µl		Mezclar fuerte en vortex. Centrifugar a pulso y dejar 30 minutos en hielo en la oscuridad	1 µl	Mezclar suave con el dedo. Centrifugar a pulso. 10 minutos en hielo Unir muestras marcadas Cy2,Cy3,Cy5 Volumen Total (Cy3,Cy5, Cy2): 17.04 µl +17.04µl +17.04µl = 51.12µl Añadir un volumen igual de Buffer de rehidratación pH 8.5 : 51.12 µl Mezclar suave con el dedo. Centrifugar a pulso: Dejar 10 min en la oscuridad en hielo
	2	P022	8.44µl	1µl				1 µl			
Estándar	Estándar Interno formado de las todas las muestras (P029,P060, PO59 y P022)									1 µl	
	Tomar del estándar interno 15.04µl	-					1µl				

Tabla 1. Diseño experimental para los análisis DIGE realizados en pacientes con Gastritis Crónica y Adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal.

7.7.3 Geles de primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF) en el equipo Ettan IPGphor 3

El Isoelectroenfoque (primera dimensión permite), separara las proteínas dependiendo su punto Isoeléctrico en un gradiente de pH y un gradiente de voltaje. Esto se llevó a cabo en el equipo IPGphor 3 Isoelectric Focusing Unit 11-0033-64 (Amersham Biosciences), con tiras de 7 cm en un rango de pH de 3-10 (Immobiline Dry Strip, Bio-rad).

7.7.4 Rehidratación de Immobiline DryStrip (pH 3-10 de 7cm) y aplicación de la muestra.

Para la rehidratación de cada Grupo se combinaron las muestras previamente marcadas con su respectivo fluoróforo (20 µg de proteína para Gastritis crónica marcado con Cy3, 20 µg de proteína para Adenocarcinoma Gástrico de tipo intestinal marcado con Cy5 y 20 µg del estándar interno marcado con Cy2) en un tubo eppendorf de 1.5 ml en la oscuridad. Posteriormente se adiciono un volumen adecuado de DeStreak (GE Healthcare, 17-6003-19), para ajustar la muestra a un volumen final de 125µl, con 2% de anfolitos de pH 3-10 (Bio-rad) y 7mg de DTT. Esta disolución se colocó a lo largo de una canaleta de la caja para rehidratar la tira (rehidratación pasiva), teniendo cuidado de no hacer burbujas y/o eliminarlas para garantizar una absorción homogénea de las proteínas. Posteriormente se colocó una tira de 7 cm (Immobiline Dry Strip pH 3-10), con el gel hacia abajo, de tal manera que hiciera contacto con la solución que contiene las proteínas, para esto se quitó el plástico protector de la tira, esto se hizo con ayuda de unas pinzas. Una vez colocada la tira se cubrió con aceite mineral (PlusOne™ Dry strip Cover Fluid, GE Healthcare, 17-1335-01), para evitar la evaporación de la muestra y la cristalización de la urea, la tira se dejó rehidratando durante 14 h, en la

oscuridad. Para realizar el Isoelectroenfoque, la tira colocó en el equipo Ettan IPGphor III (Amersham Biosciences 11-0033-64).

La separación por IEF se llevó acabo de acuerdo a las especificaciones del manual de Amercham Biosciences, los parámetros para la migración electroforética fueron: Temperatura de 20 °C y 50 µA por tira.

Modo de voltaje	Voltaje	Tiempo (H:min)
Step and Hold	100	1:00
Step and Hold	300	0:30
Gradient	1000	0:30
Gradient	5000	1:20
Step and Hold	5000	0:25
Total	-	3:45

7.7.5 Equilibrio de los geles de la primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF).

Una vez terminado el tiempo de isoelectroenfoque, se retiró la tira del equipo IPGphor 3 y se equilibró con buffer de equilibrio (6 M urea, glicerol 30% (v/v), 2% de SDS, 50mM Tris-HCL pH 8.8) que contenía SDS e Iodoacetamida/DTT (que reduce los enlaces di-sulfuro de las proteínas y las desnaturaliza (figura 3A).

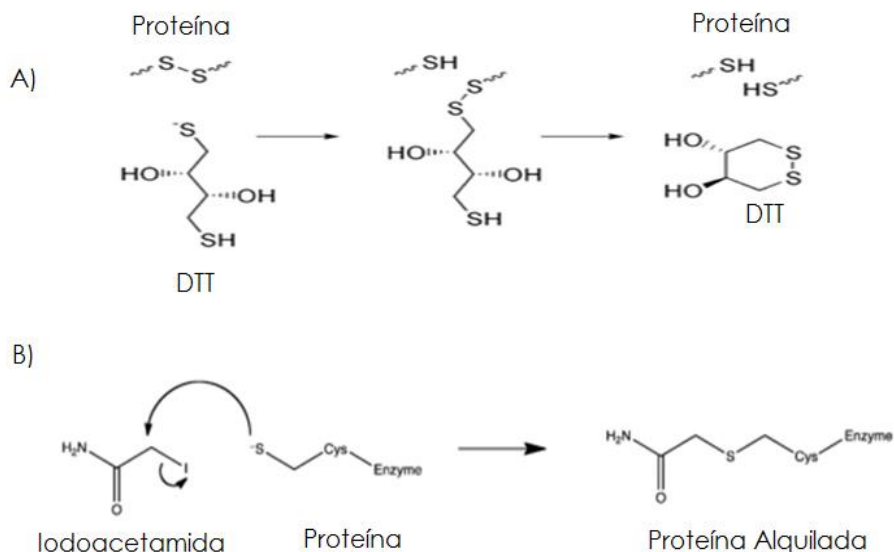


Figura 3. Equilibrio de las Tiras de la primera dimensión. A) Reacción de reducción con DTT. B) Reacción de alquilación con Iodoacetamida.

Primeramente se colocó la tira en 5 ml de solución de equilibrio (6 M urea, glicerol 30% (v/v), 2% de SDS, 50mM Tris-HCL pH 8.8) adicionando 0.05g de DTT, se incubó durante 15 min en agitación y a temperatura ambiente (Ver figura 3A). Posteriormente se retiró la tira de esta solución y se añadió 0.125g de Iodoacetamida al buffer de equilibrio para impedir la re-naturalización de las moléculas de azufre en las proteínas, incubándose durante 15min con agitación y a temperatura ambiente (Ver figura 3B).

7.5.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE o segunda dimensión.

Una vez que se realizó el equilibrio de la tira, se realizó la separación de proteínas en geles de acrilamida 12% de Bio-rad.

Para la segunda dimensión la tira se colocó en la parte superior del gel de tal manera que el gel quedara hacia enfrente y el soporte queda en contacto con el vidrio posterior, evitando así que la tira se salga. Se utilizó una solución de agarosa al 0.5 %, utilizando una pipeta de plástico para sellar. Las condiciones de corrida para la electroforesis fue de 80 V en una cámara de Bio-rad, utilizando como buffer de corrida una solución que contenía: Tris-Base 25 mM, SDS 0.1%, glicina 192 mM y agua destilada, por aproximadamente 3:40 h.

7.5.7 Obtención de la Imagen

Los geles fueron escaneados en el Instituto Nacional de Medicina Genómica en la unidad de proteómica. El gel se escaneo en un Thypoon FLA-7000 de la marca GE Healthcare. La imagen del gel marcado con Cy3 se midió a una longitud de onda de excitación de 532 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm; en tanto que para Cy5 se usarán 633nm y una longitud de onda de emisión de 680 nm, respectivamente. Mientras que el estándar interno Cy2 se leerá a una longitud de onda de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. Cada spot en la muestra se puede comparar representativamente con el estándar interno.

7.5.8 Tinción del Gel de integridad mediante Azul de Coomassie G-250.

Para la detección de las proteínas en los geles de integridad se tiñeron los geles con Azul de Coomasie, de acuerdo a la técnica descrita por Anderson, 1991. Los geles se incubaron en una solución que contenía: 62.5 ml de solución Stock de Coomassie Blue, 250 mL de Metanol, 50 mL de ácido acético y agua Milli Q. Posteriormente se lavaron varias veces con solución desteñidora que contiene: metanol 5%, ácido acético 7% y agua Milli Q, para que finalmente los geles se colocaran en Agua Milli Q y se visualizados en un transiluminador.

7.5.9 Tinción de Sypro Ruby para la estandarización de Geles 2D-PAGE.

La tinción de los geles de 7 cm se tiñeron con el fluoróforo SYPRO® Ruby, siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. Por lo que, una vez terminada la separación de proteínas en geles 2D-PAGE, el gel se coloca en un recipiente y se lavó durante 30 minutos en una solución de 10% de metanol y 7% de ácido acético. Posteriormente, se retiró la solución de lavado y se colocó 50 ml del fluoróforo Sypro Ruby en el gel, dejándose en incubación toda la noche cubierto a la luz. Al día siguiente se retiró el fluoróforo Sypro Ruby y se colocó el gel en una solución de fijación que contiene metanol al 10 % y ácido acético al 7%. Transcurrido el tiempo se retiró la solución de fijación y el gel se colocó en agua bidestilada para ser visualizado en un transiluminador.

8. RESULTADOS

8.1 Detección de anticuerpos *Anti-H. pylori* mediante Western Blot en sueros de los pacientes incluidos para el análisis DIGE.

En los sueros de los pacientes con diagnóstico histopatológico de Gastritis crónica y adenocarcinoma gástrico, que se emplearon para el análisis proteómico fueron utilizados para determinar el perfil de anticuerpos tipo IgG contra *H. pylori*, para ello se utilizó la técnica de western blot. La positividad a la bacteria se estableció de acuerdo a los criterios establecidos por Lepper en el año 2004.

Leeper estableció que un suero se considera positivo: Si se reconoce una banda de 136, 87 o 66 kDa o combinaciones entre ambas, o se reconocen dos bandas menores o iguales a 33 kDa. Estos criterios se tomaron en cuenta debido a que la proteína CagA tiene un tamaño molecular de 136 kDa, la proteína VacA de 87 kDa, la subunidad B de la ureasa un peso de 66 kDa y la subunidad A de la ureasa tiene un pesos molecular de 26 kDa aparentemente.

En la figura 4, se presenta los individuos positivos a *H. pylori*. Los pacientes P045, P059, P029, P050 y P060 resultaron positivos a *H. pylori*, mientras que el paciente P022 fue seronegativo a *H. pylori*. Las bandas prominentes observadas en los sueros positivos (figura 4) fueron mayores a 118 kDa y menores a 36 kDa. La intensidad alta en la tinción de la banda probablemente está relacionada con la carga bacteriana que está colonizando el epitelio gástrico de cada individuo. El paciente con número de folio P022 fue incluido en el estudio proteómico debido a que es una muestra con diagnóstico histopatológico de CG de tipo intestinal, aunque no fue confirmado positivo a *H. pylori*, esto con la finalidad de parear a los pacientes con edad.

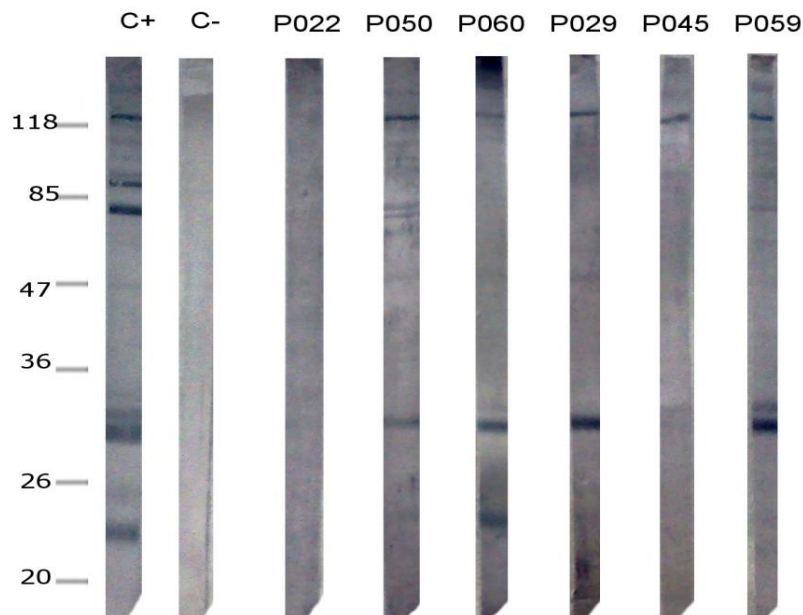


Figura 4. Patrones de reconocimiento de antígenos de *H. pylori* por los sueros de los pacientes. C+ (control positivo), C- (control negativo), las tiras con número de registro P050, P060, P029, P045 y P059 son positivos a *H. pylori*. La tira con número de registro P022 es negativo a *H. pylori*.

La tabla 2 muestra los resultados realizados a las muestras de biopsias de pacientes que se incluyeron en el estudio proteómico, donde se muestra el padecimiento confirmado mediante examen histopatológico, así como algunos de los criterios de positividad establecidos por Lepper. Se buscó aparear cada muestra con la finalidad de disminuir la variabilidad entre ellas, se aparearon por edad y sexo, incluyendo solo hombres.

Código de muestra	Edad	Padecimiento	Western Blot	Detección Histológica <i>H. pylori</i>
P045	43	Gastritis Crónica leve Inactiva	+	+
P059	30	Gastritis Crónica leve Inactiva	+	+
P029	68	Gastritis crónica moderada activa	+	+
P050	48	Adenocarcinoma intestinal moderadamente diferenciado	+	+
P022	25	Adenocarcinoma intestinal moderadamente diferenciado	-	NR*
P060	58	Adenocarcinoma intestinal moderadamente diferenciado	+	+

*NR: No reportado

Tabla 2. Pacientes con diagnóstico de *H. pylori* mediante análisis de Western blot y diagnóstico histopatológico que fueron incluidos en el estudio proteómico (NR no reportado).

8.2 Cuantificación de proteínas del extracto de proteínas obtenido de las biopsias.

La cuantificación de las proteínas extraídas de las biopsias se realizó después de la eliminación de sustancias interferentes por 2D-clean. Esto con la finalidad de cuantificar las proteínas con la mayor precisión posible, sobre todo cuando se pretende evaluar las proteínas diferencialmente expresadas, esto nos ayudara a asegurar que las diferencias de expresión de proteínas sean debidas a la patología y no a la presencia de sustancias que pueden afectar la migración de las proteínas como los lípidos.

Se utilizó el kit 2D-Quant, que es un método colorimétrico que es compatible con el buffer de rehidratación empleado que contiene urea, tiourea y los detergentes utilizados, sustancias que interfieren con los métodos de cuantificación de proteína tradicionales.

La tabla 3 muestra la concentración de proteínas obtenidas de cada una muestra en biopsias, que se podía incluir en el análisis proteómico.

No. De folio del Paciente	Concentración de Proteínas (µg/µl)
P029	1.46
P045	1.99
P059	1.33
P022	2.37
P050	0.74
P060	2.23

Tabla 3. Concentración de proteínas extraídas de las biopsias para análisis proteómico.

Se excluyeron algunos pacientes debido a la baja concentración de proteínas, esto no nos permitiría hacer repeticiones si fuera necesario.

8.3 Gel de Integridad de las muestras usadas en el análisis proteómico.

Una vez realizada la extracción de proteínas y la cuantificación, se procedió a evaluar la integridad de cada muestra de proteínas, con el propósito de garantizar un buen perfil proteico en el análisis 2D-DIGE, esto sirvió para asegurar que no hubiesen sufrido ninguna de las muestras degradación y lograr la reproducibilidad en los perfiles de expresión, mediante una electroforesis 2D-DIGE.

La Figura 5 muestra el gel de integridad que se realizó antes de procesar las muestras para el análisis proteómico, donde se observó que el buffer de rehidratación empleado para extraer las proteínas de las biopsias solubilizó las

proteínas de manera adecuada y sin degradar, ya que en la electroforesis se observan varias bandas bien definidas y otras que se observan muy tenues pero probablemente se deba a que se tiñeron con azul de coomassie, el cual no permite visualizar las proteínas de baja concentración. .

Por otro lado se observa la presencia de proteínas tanto de alto peso molecular, como de bajo peso molecular, con una variación en la cantidad de proteínas debido a la intensidad entre bandas, lo que muestra variación en el patrón de proteínas en el gel 2D.

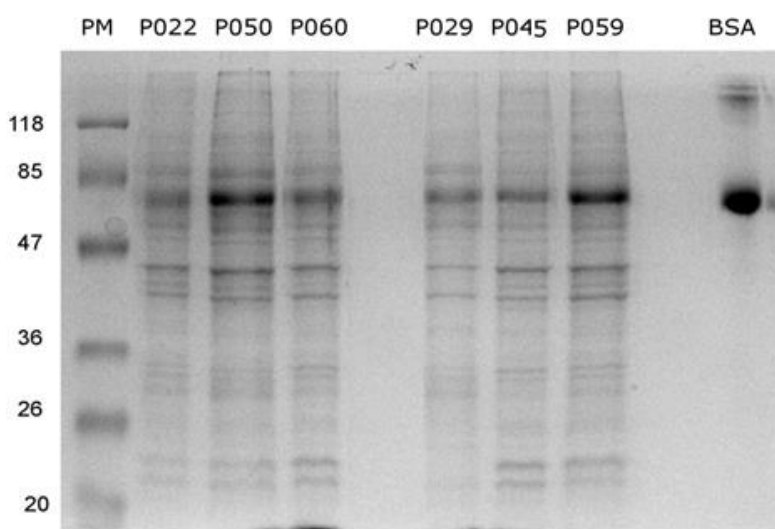


Figura 5. Determinación de integridad de las proteínas provenientes de biopsias. Electroforesis 2D teñida con azul de Coomassie, PM corresponde al marcador de Peso Molecular, las muestra con número de folio P022, P050 Y P060 corresponden a proteínas extraídas de biopsias de pacientes con Cáncer Gástrico de tipo Intestinal, los paciente con folio P029, P045 y P059 corresponden a pacientes con Gastritis Crónica leve y BSA es albumina utilizada como control.

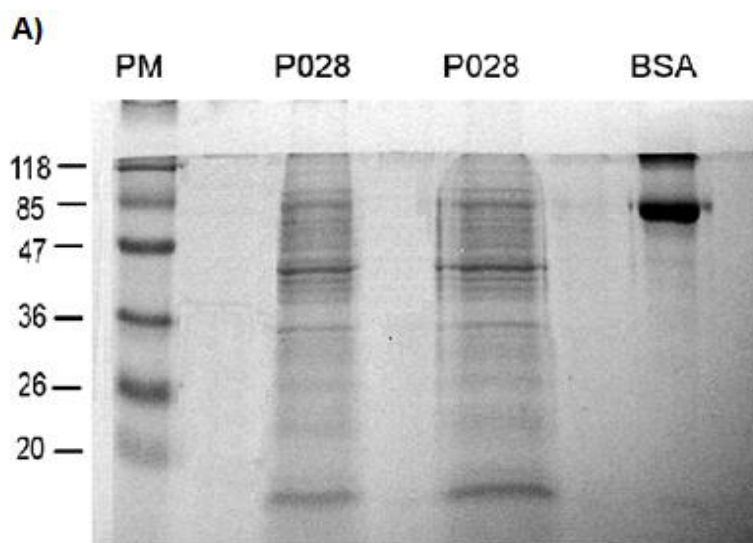
8.4 Estandarización de la Separación de proteínas en Geles en 2-DE

Para determinar las condiciones más apropiadas para analizar las proteínas extraídas de las biopsias, se realizaron algunos ensayos preliminares para estandarizar las condiciones óptimas de IEF.

En los ensayos preliminares, se utilizó una biopsia de un paciente con gastritis (P028).

En la figura 6A, se muestra el gel de integridad, en donde se colocó 10 µg de proteína, por carril. Se puede observar el ensanchamiento del carril conforme corre nuestra muestra, debido probablemente a que la muestra no estaba completamente limpia, después de pasar por el kit de limpieza 2D-clean, que en un momento dado interfirió con el corrimiento de la muestra en el gel. El IEF se realizó de acuerdo a las condiciones establecidas en la metodología.

En la figura 6B se puede observar el patrón de proteínas extraídas de la biopsia P028, en un gel de doble dimensión, donde se colocó 50 µg de proteína, estos geles fueron hechos al 12.5% de acrilamida y se tiñó con Sypro Ruby. Se puede observar un número amplio de spot, lo que demuestra que las condiciones de IEF y doble dimensión fueron apropiadas.



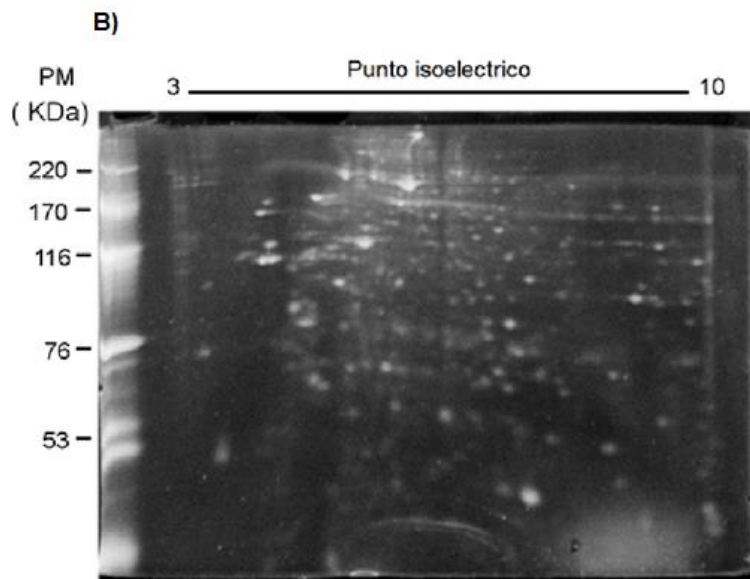


Figura 6. Electroforesis en geles de 2D teñidos con Sypro Ruby del paciente con gastritis P028. En esta figura se muestra el tipo de corrimiento electroforético estandarizado que se emplearía para el análisis proteómico DIGE. A) Gel de integridad de proteínas que se extrajeron de la misma muestra. B) Muestra el mejor corrimiento de las proteínas extraída de la biopsia P028, en tiras de 7cm con un rango de pH de 3 a 10, con un corrimiento de voltaje de 80V en 3:40 h.

El desempeño del isoelectroenfoco se verifico por medio del software Ettan™ IPGphor™ 3 versión 1.0.20, el cual nos permitió observar los cambios de voltaje, corriente y voltios-hora que ocurren a lo largo del programa de isoelectroenfoco utilizado. La curva ideal se muestra en azul y la curva roja muestra el voltaje real alcanzado por la muestra.

La figura 7A muestra el patrón de corrimiento que siguió otra de las muestras (P035) analizadas, que como se puede apreciar no alcanzó el voltaje establecido de 6658 Vh, sino que alcanzó un voltaje de 5334 Vh, esto se debió probablemente a la cantidad de sales presentes en la muestra o a la presencia de algún solvente que quedo después de limpiar la muestra. Sin embargo, en el gel de segunda dimensión (Figura 7B), se puede apreciar que se logra una buena separación de

las proteínas, lo cual nos indica que el programa de isoelectroenfoque es el apropiado.

En la figura 7B se observa que el patrón de proteína obtenido de la biopsia P035, diferente al obtenido con la muestra P028, probablemente debido a diferencias en la segunda dimensión. Por lo que se decidió utilizar geles pre-hechos de acrilamida al 12 % de BIORAD (Mini-PROTEAN® TGX™ Gels, IPG/prep-well, 7 cm IPG strip,#456-1041), para disminuir la variabilidad entre geles cuando se preparan por separado.

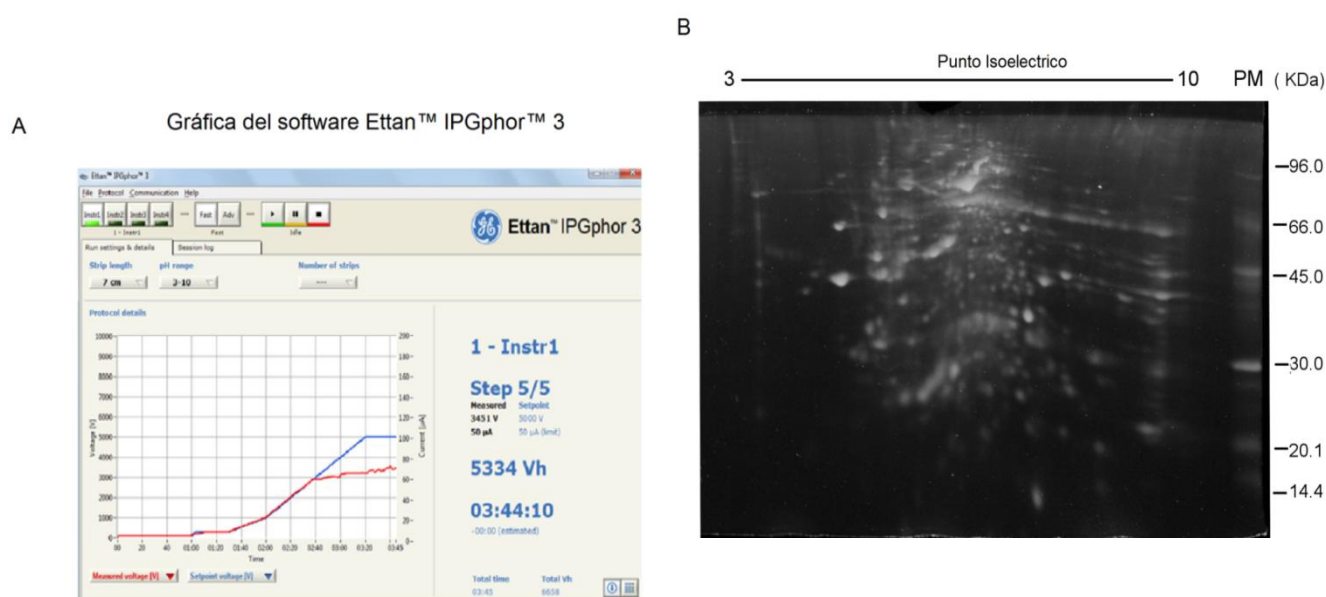


Figura 7. Gráfica de IEF y gel en 2D teñidos con Sypro de la muestra P035. A) En esta figura se muestra el gráfico de IEF en tiras de 7cm, en donde la línea azul indica el patrón ideal de voltaje y la línea roja el voltaje real que se obtuvo con la muestra P035 durante el IEF. B) Se muestra el gel 2D de las proteínas extraída de la biopsia P035 en tiras de 7cm con un rango de pH de 3 a 10.

8.5 Geles 2D-DIGE

Para estandarizar las condiciones 2D-DIGE, se realizó un experimento con dos muestras: Una es la P029 de Gastritis Crónica y la muestra P060 de Adenocarcinoma Gástrico de tipo intestinal.

Esta muestra se corrió bajo las condiciones establecidas con anterioridad, en el experimento las proteínas se tiñeron con los fluoróforos a 80 pmol por cada 10 microgramo de proteína, este ensayo permitió darnos cuenta que es necesario preparar el fluoróforo al momento debido a que el gel no se tiño correctamente. Se utilizaron estas muestras la P060 y la P029 debido a la concentración mayor de proteína obtenida en cada una.

Posteriormente se decidió planear el ensayo con una cantidad mayor de proteína utilizando 20 µg de proteína por muestra. Cada muestra se marcó con 160 pmol de los fluoróforo. La tabla 1 muestra el esquema de marcaje de las diferentes muestras y la combinación que se hizo para cada gel (P029 Y P060 para el primer gel y P059 y P022 para el segundo gel). La primera dimensión (IEF) se realizó con tiras de 7cm con rango de pH de 3-10. Por el diseño del experimento cada gel contenía una cantidad total de 60 µg de proteína, la cual se corrió en geles pre-hechos de Bio-rad al 12%.

Solamente se analizaron dos muestras de cada padecimiento, debido a que la cantidad de proteína en ambas muestras era el apropiado, además era posible aparear las muestras por edad y sexo, para disminuir la variabilidad. Quedando P029 (gastritis, 68 años) vs P060 (cáncer 58 años) y P059 (gastritis, 25 años) vs P022 (cáncer 30 años)

La figura 8 muestra el gráfico de IEF de las dos tiras que se corrieron simultáneamente para el análisis 2D-DIGE. La gráfica muestra que se alcanzó el voltaje esperado de acuerdo al programa utilizado.

Gráfica del software Ettan™ IPGphor™ 3



Figura 8. Gráfica de IEF de las tiras empleadas para 2D-DIGE.

En la figura 9 se muestra el perfil de proteínas obtenido de las muestras P029 y P060 marcadas con los fluoróforos Cy3 y Cy5, como se indicó en la Tabla 1, el estándar interno se marcó con el fluoróforo Cy2. Se puede observar el cambio en la expresión de proteínas a simple vista al empalmar las imágenes del paciente con gastritis (color rojo) y el paciente de cáncer (color azul).

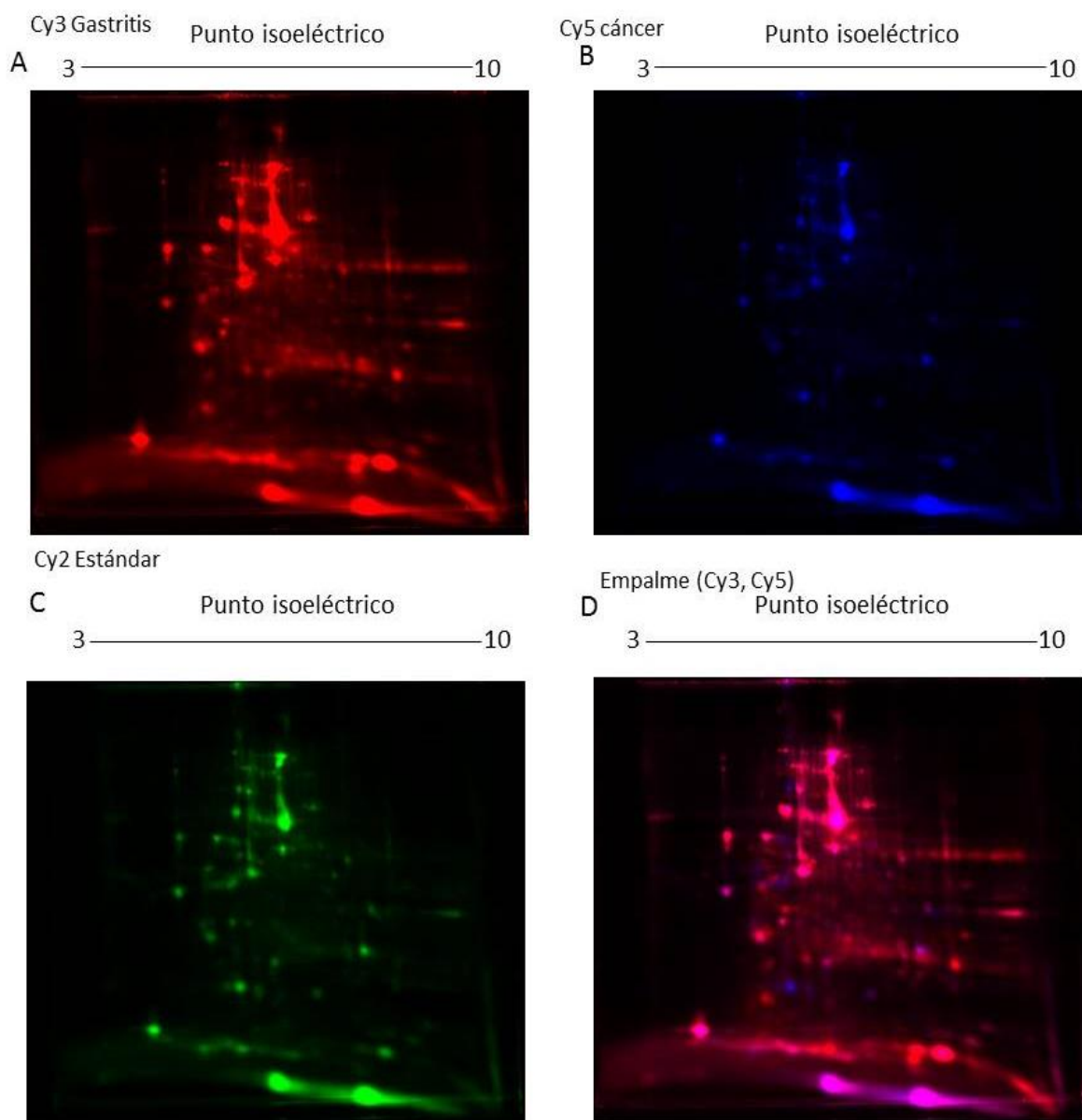


Figura 9. Gel 1. Muestra el Perfil de proteínas extraídas de biopsias de los pacientes P029 y P060 separados con 2D-DIGE A) La imagen de Cy3 son proteínas de Gastritis Crónica del paciente P029, **B)** Cy5 muestra proteínas extraídas de paciente P060 con Cáncer Gástrico, **C)** mientras Cy2 es el estándar interno de la mezcla de proteínas de los 4 pacientes. **D)** Empalme de Cy3 y Cy5.

8.5.1 Análisis diferencial en el gel

El análisis diferencial entre las imágenes de un mismo gel sirve para realizar la detección de los spots, en donde se elimina el fondo y da un análisis preliminar de los spots en los que no se observó cambio y aquellos que incrementan o disminuyen con respecto al control.

En la figura 10 se muestra el análisis diferencial de las imágenes obtenidas de los pacientes que se usaron para el análisis en el gel 1, marcado con Cy3 y Cy5. Los puntos marcados en color amarillo indican que las proteínas no presentan cambios en la expresión de proteínas en ambas condiciones. En color verde se muestran las proteínas que disminuyen 2 o más veces en el caso con respecto al control. Y las marcadas con color rojo muestran las proteínas que incrementan su expresión 2 o más veces en el caso con respecto al control.

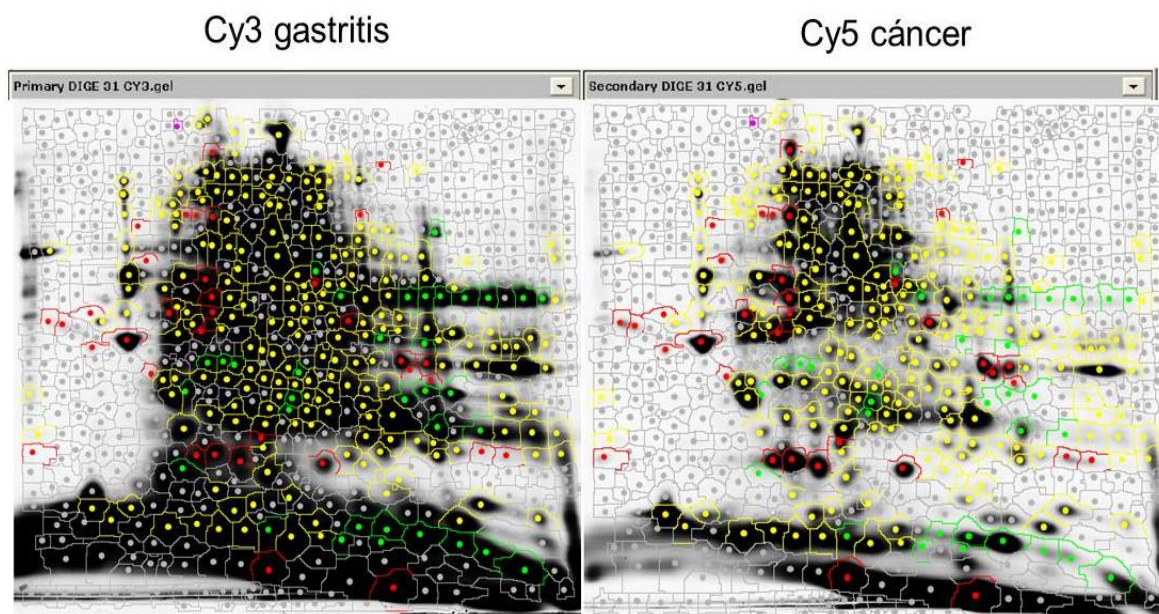


Figura10. Análisis diferencial de gel 1. Comparación de las muestras marcadas con Cy3 (Gastritis) y Cy5 (cáncer).

En la figura 11, se muestra el histograma de la distribución de los spots en el gel 1, en donde se muestra en la parte central del histograma los spots que coincidieron en las tres imágenes super-puesta que fueron un total de 207, en la parte izquierda de la figura se muestran los spots que disminuyeron más de 2 veces o más en los casos con respecto al control, que incluyen todos los spots que se formaron al super-poner las tres imágenes del gel, que fue un total de 35 spots. En la parte derecha se muestra los spots de proteínas que aumentaron su expresión 2 veces o más en los casos con respecto al control.

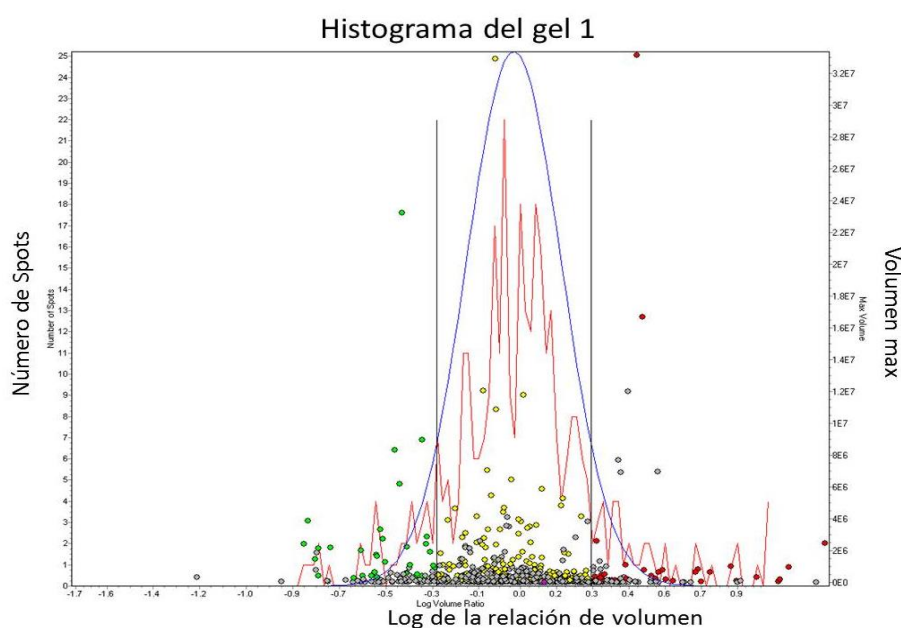


Figura 11. Histogramas de frecuencia para el gel 1

En la figura 12 se muestra el perfil de proteínas obtenido de las muestras P059 y P022 marcadas con los fluoróforos Cy3 y Cy5, la Tabla 1 muestra el marcado de cada una de las muestras. Este gel no corrió correctamente, sin embargo se puede observar a simple vista cambios en la expresión de proteínas al empalmar las imágenes del paciente con gastritis (P059) y el paciente de cáncer (P022).

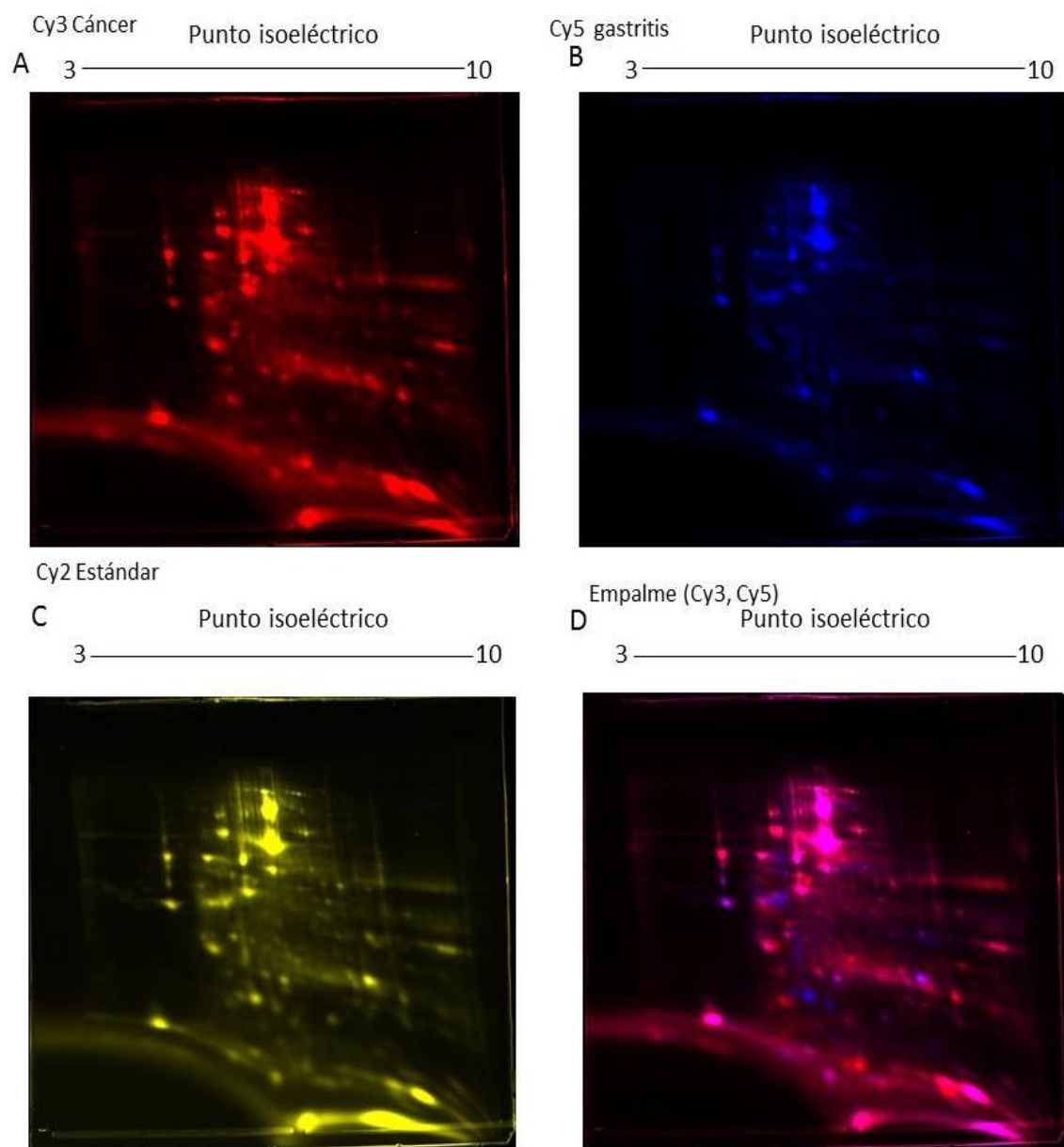


Figura 12. Gel 2. Muestra el Perfil de proteínas extraídas de biopsias de los pacientes P059 y P022 separados con 2D-DIGE. A) La imagen de Cy3 son proteínas de Cáncer Gástrico, B) Cy5 muestra proteínas extraídas de Gastritis Crónica, C) Cy2 es el estándar interno de la mezcla de los 4 pacientes. D) Empalme de Cy3 y Cy5)

En la figura 13, muestra el análisis diferencial de las imágenes obtenidas de los pacientes que se usaron para el análisis en el gel 2, marcado con Cy3 y Cy5. En estas imágenes el color amarillo de los spots indica que no hay cambios en la expresión de proteínas en ambas condiciones. Como anteriormente vimos en el gel 1 el color verde muestra las proteínas que disminuyen 2 o más veces su expresión y las de color rojo muestran las proteínas que incrementan su expresión 2 o más veces en el caso con respecto al control.

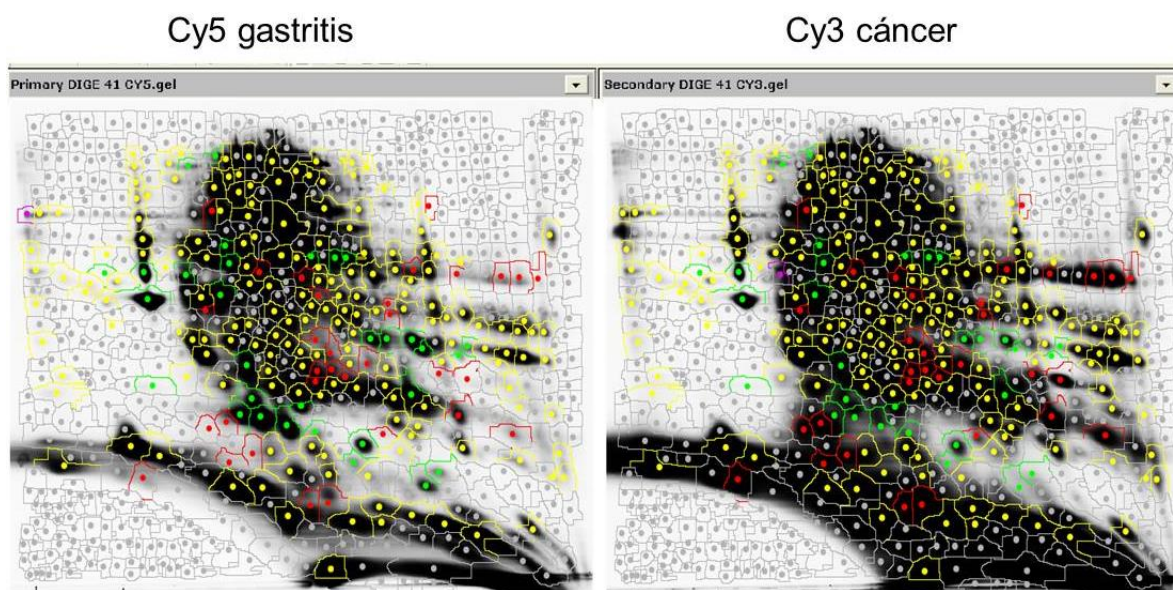


Figura13. Análisis diferencial de gel 2. Comparación de las muestras marcadas con Cy3 (cáncer) y Cy5 (Gastritis).

La figura 14 muestra el histograma de la distribución de spots presentes en el gel 2, Se puede observar en la parte central de este histograma los spots en por lo menos las dos de las tres imágenes súper-puesta, donde se reportó un total de spots de 236, en la parte derecha de la figura se muestran los spots que disminuyeron más de 2 veces su expresión, que fue un total de 32 spots.

En la parte izquierda se muestra los spots de proteínas que aumentaron su expresión más de 2 veces con respecto al gel maestro, que son 31.

Claramente se puede observar diferencias en el histograma del gel 1 con respecto al gel 2. Esto indica claramente la diferencia entre spots y la diferencia entre patologías.

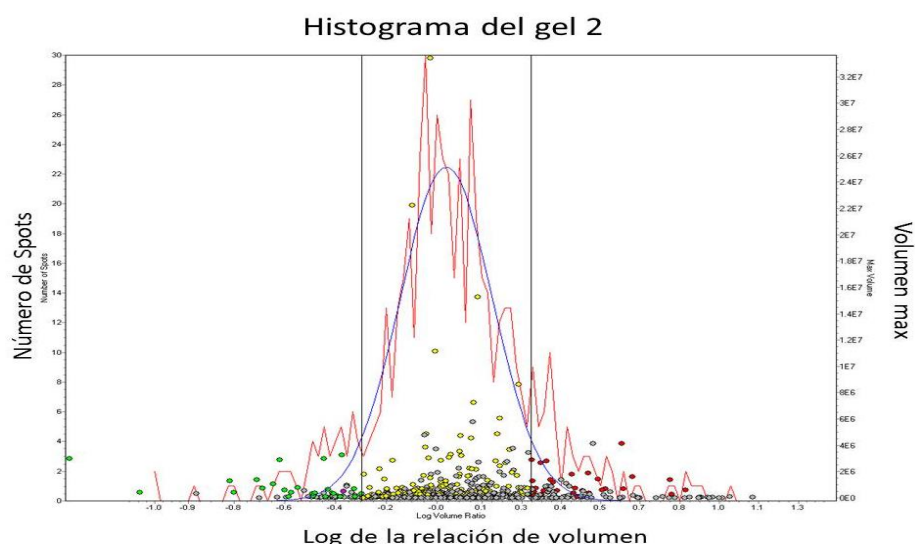


Figura 14. Histogramas de frecuencia para el gel 1

La tabla 4 muestra el resumen general de datos de los 2 geles usados para el análisis 2D- DIGE.

Tabla 4. Análisis diferencial entre geles. Datos generales

Ge l	Total de spot detectados	Spots que incrementan su expresión más de 2 veces	Spots que disminuyen su expresión más de 2 veces	Spots similares
1	276	34(12.3%)	35(12.7%)	207 (75%)
2	236	32(13.6%)	31(13.1%)	173(73.3%)

.2 Análisis de variación biológica en los dos geles utilizados para el análisis proteómico.

Para determinar la variación biológica, se hace un gel maestro en el que se hizo un empalme de todas las imágenes del experimento. En la figura 15 se indican encerrados en círculo verde indican que hicieron un empalme al 100% con el gel maestro, mientras que los spots encerrados en círculos naranjas indican que no hicieron empalme en el gel maestro. Esto se puede observar en la figura 15, en donde se muestra que spots hicieron empalme con el gel maestro y cuales no lo hicieron.

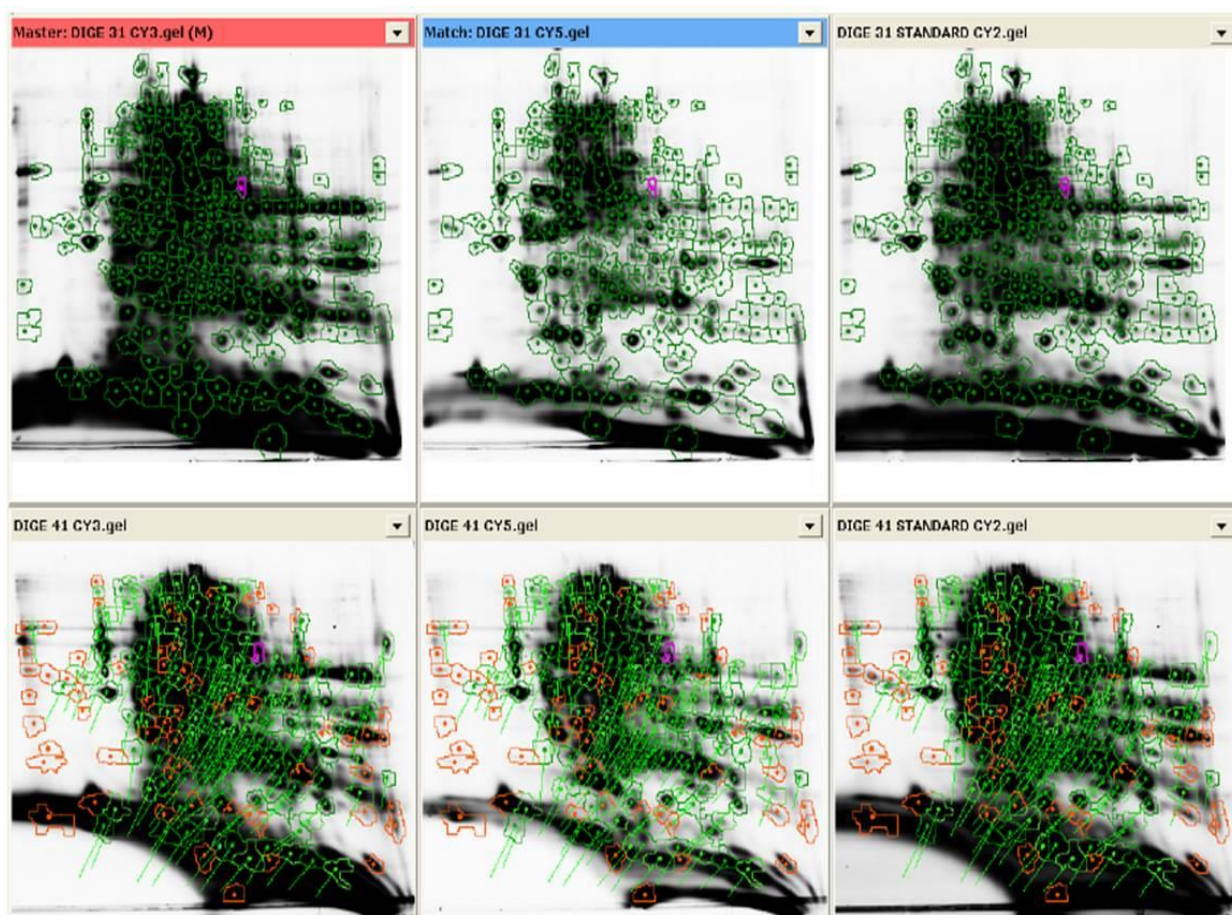


Figura 15. Análisis de variación biológica

En la tabla 5, se muestran los resultados del análisis estadístico, en donde se encontraron 33 spots diferenciales. De los cuales 23 spots incrementaron 2 o más veces su expresión en pacientes con cáncer (color rojo). Por otro lado 10 spots disminuyeron 2 o más veces su expresión en los pacientes con cáncer respecto al de gastritis (color verde). El spot que tuvo una tasa de recambio diferencial fue el número de Master 239 (color blanco), que estuvo presente en las 6 imágenes y tuvo una tasa de cambio de 2.1 con respecto al control, en el que se obtuvo un valor de $p \leq 0.05$. Este spot fue diferencial entre el paciente con cáncer y gastritis y estadísticamente significativo.

Tabla de proteínas con valor de p y Relación promedio: CASO vs. CONTROL				
Posición	No. Master	Presencia	Valor de p	Relación promedio
1	233	3 (6)	-	10.86
2	46	3 (6)	-	7.36
3	43	3 (6)	-	5.38
4	47	3 (6)	-	5.21
5	235	6 (6)	<u>0.06</u>	5
6	73	3 (6)	-	4.16
7	126	3 (6)	-	3.91
8	234	3 (6)	-	3.55
9	5	3 (6)	-	3.43
10	274	3 (6)	-	3.17
11	276	3 (6)	-	3.01
12	83	3 (6)	-	2.73
13	49	6 (6)	<u>0.3</u>	2.59
14	248	6 (6)	<u>0.43</u>	2.58
15	45	3 (6)	-	2.56
16	175	3 (6)	-	2.48
17	152	3 (6)	-	2.42
18	166	3 (6)	-	2.25
19	88	3 (6)	-	2.21
20	239	6 (6)	<u>0.01</u>	2.1
21	120	3 (6)	-	2.07
22	8	3 (6)	-	2.06
23	269	6(6)	<u>0.34</u>	2
24	273	3 (6)	-	-2.17
25	275	3 (6)	-	-2.28
26	168	3 (6)	-	-2.44
27	221	3 (6)	-	-2.53
28	201	3 (6)	-	-2.6
29	192	3 (6)	-	-3.4
30	270	3 (6)	-	-3.47
31	176	3 (6)	-	-4.18
32	105	3 (6)	-	-5.17
33	271	3 (6)	-	-6.31

Tabla 5: Análisis estadístico derivado del análisis de variación biológica.

9. DISCUSIÓN

A pesar de los grandes avances en el diagnóstico y tratamiento de cáncer, el cáncer gástrico sigue siendo una de las principales enfermedades sigue siendo un problema de salud pública en el mundo, tal es así que es considerada como la segunda causa de muerte a nivel mundial. Actualmente varios investigadores han reportado varios genes que se sobre expresan y que disminuyen su expresión en CG con respecto a lo observado con pacientes sin neoplasia⁵², estos cambios a nivel genético podrían reflejarse se a nivel de expresión de proteínas De hecho varios estudios proteómicos han reportado alteraciones de varias proteínas en diversas funciones celulares., La combinación particular de estas alteraciones pudieran ser diferente entre el cáncer gástrico y la gastritis.,

Por ello, el presente trabajo tiene como objetivo comparar el perfil de expresión de proteínas en biopsias de pacientes infectados por *H. pylori* con gastritis crónica y adenocarcinoma gástrico tipo intestinal, mediante la técnica 2D-DIGE, la cual ayuda a comparar los perfiles de proteínas entre las dos patologías

Para poder realizar el análisis por DIGE en biopsias, se requiere extraer las proteínas, la cual es un punto crítico en este trabajo, porque la cantidad de tejido es pequeña a pesar de ello se logró implementar un procedimiento para solubilizar suficiente proteína que podía ser analizada por el 2D-DIGE

Una vez eliminadas las sustancias interferente, las proteínas se solubilizaron en un buffer que contenía 7 M urea, 2 M Tiourea, 4% CHAPS, debido a que la Tiourea incrementa la solubilidad y la recuperación de proteínas de membrana a partir de las biopsias⁷⁴. Este buffer se ajustó a un pH de 8.5, utilizando una solución de Tris-Base 500 mM pH 9.5, la cual resulto útil para el marcaje con los fluoróforos Cy5Dye, este paso es importante debido a que de proteínas de cada muestra empleada para el análisis 2D-DIGE debe tener un pH de 8.5, un pH

mayor o menor a 8.5 puede resultar en un marcaje inespecífica. La concentración de Tris-base en la que quedo el buffer de rehidratación fue de aproximadamente 10 mM, esta concentración no interfirió con el IEF.

Otro punto crítico que se debe de controlar es la cuantificación de proteína, debido a que es necesario poner la misma cantidad de proteína que utilizara para el análisis DIGE. Se logró obtener resultados muy reproducibles en la determinación de la concentración si curva estándar y las muestras problema se leían simultáneamente en un lector de ELISA,

Debido a que son muchos los pasos realizados anteriormente, nuestras proteínas pudieron sufrir desnaturalización o cambio en la integridad, esto podría interferir con los resultados DIGE, por lo que se decidió determinar la integridad de nuestras proteínas, por lo que se realizó un gel de integridad, en el que se observaron proteínas tanto de bajo como alto peso molecular, mostrando un patrón similar entre muestras, estas se podrían observar mejor si se utilizara un método más sensible que lograra detectar mejor las bandas.

El programa para el IEF, sugerido en el manual de Ge Healthcare, dio buen resultado para nuestras proteínas, como se muestra en los geles teñidos con Sypro de las dos muestras de Gastritis (P028 y P035) empleadas para la estandarización. Para la segunda dimensión es recomendable utilizar geles pre-hecho de 12.5%

En cuanto a la cantidad de proteína requerida para tiras de 7cm, se pueden utilizar entre 10 y 20 μg de proteína en una proporción de fluoroforos 8pmoles/ μg de proteína. Para lograr un buen marcaje se recomienda utilizar una dilución de los fluoroforos recién hecha.

También se puede ver que hay variación en la cantidad de spots de proteínas encontradas en las imágenes del gel 1 y gel 2. En el gel 1 se encontró un total de 276 spots, mientras que en el gel 2 se obtuvieron solo 236, probablemente se debió a que el segundo gel no corrió en forma apropiada y probablemente debido a la distorsión del frente no se logró la separación adecuada de las proteínas. Sin embargo, el número de proteínas que mostraron cambios en el nivel de expresión fue muy parecido en ambos geles,

Por otra parte se pueden observar diferencias en la expresión de los spots, debido a que en ambos geles aumentaron y disminuyeron su expresión más de dos veces, esto se puede observar en los resultados que se hicieron del análisis diferencial. Mientras que en el análisis en la variación biológica donde se compararon las 6 imágenes con el gel Maestro se pudieron detectar 6 spots diferenciales de los cuales 3 aumentaron su expresión y 3 disminuyeron su expresión con respecto al grupo control. Estos resultados no fueron significativos debida a que no se obtuvo una T-studen adecuada para el análisis, por lo que se recomienda hacer el análisis con una N mayor, en donde se puedan comparar más pacientes para ver si se logra encontrar una mayor reproducibilidad entre grupos, debido a que 2 geles no son muy confiables para el análisis en la variación biológica. Se puede observar, que el análisis se ve limitado debido a al tamaño de los geles, por lo que sería conveniente un tamaño de tira mayor a 7 cm en el mismo rango de pH de 3-10.

10. CONCLUSIONES

Se logró estandarizar las condiciones para la extracción de proteínas de las biopsias.

Se estandarizo la metodología 2D-DIGE, para obtener los perfiles de proteínas de la muestra de biopsias.

La técnica DIGE, permitió determinar cambios en la expresión de proteínas que se pueden expresar en las dos patologías.

11. PERSPECTIVAS

Utilizar un número mayor de muestras, para tener datos confiables, que nos permitan obtener un mejor análisis estadístico..

Determinar mediante este estudio las diferentes expresiones de proteínas en gastritis crónica y Adenocarcinoma gástrico, así como conocer el papel fundamental de cada una estas proteínas.

Identificar proteínas diferencialmente expresadas mediante espectrometría de masas.

Obtener un listado de proteínas candidato, con la finalidad de conocer mejor el proceso carcinogénico del Cáncer gástrico y que en un momento se puedan como biomarcadores de lesiones gástricas premalignas.

1. ANEXO

12.1 Lista de reactivos.

Reactivo	Marca	No. catálogo
Tris-HCL	USB	22676
Tris-Base	PROMEGA	H5131
SDS	PROMEGA	H5113
acrilamida	SIGMA	A-9099
bis-acrilamida	USB	110-26-9
Urea	USB	75826
EDTA	SIGMA	E-6225
APS (Persulfato de amonio	RESEACH ORGANIC	14044
TEMED	SIGMA	T-8133
Agarosa	GIBCO	15517-014
Ácido Cítrico	SIGMA	C-7129
Tris-Base	PROMEGA	H5131
TWEEN 20	SIGMA	64590
Azul de Coomassie G-250	AMRESCO	0615-106
Anti-IgG Humana/fosfatasa alcalina	SIGMA	A1543-1ML
Cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT)	SIGMA	B8503-1G
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)	SIGMA	N6876-1G
Cloruro de potasio (KCL)	J.T. BAKER	3625-05
PMSF	SIGMA	P7626-100G
Tiourea	SIGMA	T8656-100G
CHAPS	ROCHE	70103120
Nucleasa Mix	GE Healthcare	80-6501-42
2-D Clean-Up	GE Healthcare	80-6484-51
2D-Quant	GE Healthcare	80-6483-56
Dimetilformamida (DMF)	SIGMA	227056-5G
Fluoróforos CyDye DIGE mínimos	GE Healthcare	25-8010-65
L-Lysine	SIGMA	L5501-5g

tiras de 7 cm en un rango de pH de 3-10	BIO-RAD	163-2000
DTT	USB	15397-25-GM
DeStreak	GE Healthcare	17-6003-19
PlusOne™ Dry strip Cover Fluid	GE Healthcare	17-1335-01
Iodoacetamida (IAM)	GE Healthcare	RPN6302V
Glicerol	J.T. BAKER	213601
Geles de acrilamida 12% pre-hechos	BIO-RAD	456-1041
Glycine	GIBCO	15527-013
SYPRO® Ruby	SIGMA	S4942-1L
Ácido acético	Reamex	
Anfolitos pH 3-10L	BIO-RAD	1632094
Cloruro de sodio	J.T. BAKER	362505
Fosfato de sodio	USB	20229
Metanol	J.T. BAKER	904003
Leche Sveltysin grasa	Nestle	

12.2 Lista de equipos

Equipo	Marca	No. catálogo
Cámara de transferencia	BIORAD	1703930
Cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra Cell	BIO-RAD	165-8000
Ettan IPG Phor 3 Isoelectric Focusing	GE Healthcare	11003364
Lector de absorbancia	BIORAD	1681135
Microcentrifuga	Eppendorf	5415C

2. REFERENCIAS

1. Regino OW, Gómez AM, Castro D. Carcinogenesis gástrica. Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología. 2009; 24:314-29.
2. Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. The Journal of clinical investigation. 2007; 117:60-9.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2011; 61:69-90.
4. Globocan. <http://globocan.iarc.fr/>. 2008.
5. Wroblewski LE, Peek RM, Jr., Wilson KT. Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk. Clinical microbiology reviews. 2010; 23:713-39.
6. Sachs G, Scott DR. Helicobacter pylori: Eradication or Preservation. F1000 medicine reports. 2012; 4:7.
7. Shin A, Kim J, Park S. Gastric cancer epidemiology in Korea. Journal of gastric cancer. 2011; 11:135-40.
8. Zheng L, Wang L, Ajani J, Xie K. Molecular basis of gastric cancer development and progression. Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association. 2004; 7:61-77.
9. Persson C, Canedo P, Machado JC, El-Omar EM, Forman D. Polymorphisms in inflammatory response genes and their association with gastric cancer: A HuGE systematic review and meta-analyses. American journal of epidemiology. 2011; 173:259-70.
10. Bartchewsky W, Jr., Martini MR, Squassoni AC, Alvarez MC, Ladeira MS, Salvatore DM, et al. Influence of Helicobacter pylori infection on the expression of MLH1 and MGMT in patients with chronic gastritis and gastric cancer. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2009; 28:591-7.
11. Correa P, Piazuelo MB. Evolutionary History of the Helicobacter pylori Genome: Implications for Gastric Carcinogenesis. Gut and liver. 2012; 6:21-8.
12. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis. Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society. 2009; 60:3-21.
13. Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. World journal of gastroenterology : WJG. 2006; 12:2979-90.
14. Holmes K, Egan B, Swan N, O'Morain C. Genetic Mechanisms and Aberrant Gene Expression during the Development of Gastric Intestinal Metaplasia and Adenocarcinoma. Current genomics. 2007; 8:379-97.
15. Chen X, Leung SY, Yuen ST, Chu KM, Ji J, Li R, et al. Variation in gene expression patterns in human gastric cancers. Molecular biology of the cell. 2003; 14:3208-15.
16. Brown LM. Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission. Epidemiologic reviews. 2000; 22:283-97.
17. Asaka M, Sepulveda AR, Sugiyama T, Graham DY. Gastric Cancer. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. Helicobacter pylori: Physiology and Genetics. Washington (DC)2001.
18. Montemurro P, Barbuti G, Dundon WG, Del Giudice G, Rappuoli R, Colucci M, et al. Helicobacter pylori neutrophil-activating protein stimulates tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 production by human blood mononuclear cells. The Journal of infectious diseases. 2001; 183:1055-62.

19. Algood HM, Cover TL. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clinical microbiology reviews*. 2006; 19:597-613.
20. Bauer B, Meyer TF. The Human Gastric Pathogen *Helicobacter pylori* and Its Association with Gastric Cancer and Ulcer Disease. *Ulcers*. 2011; 2011:1-23.
21. Peek RM, Jr., Fiske C, Wilson KT. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. *Physiological reviews*. 2010; 90:831-58.
22. Jones KR, Whitmire JM, Merrell DS. A Tale of Two Toxins: *Helicobacter Pylori* CagA and VacA Modulate Host Pathways that Impact Disease. *Frontiers in microbiology*. 2010; 1:115.
23. Polk DB, Peek RM, Jr. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nature reviews Cancer*. 2010; 10:403-14.
24. Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annual review of pathology*. 2006; 1:63-96.
25. Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012; 2:92.
26. Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM, Jr. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer research*. 2003; 63:951-7.
27. Backert S, Tegtmeyer N. the versatility of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin vacA in signal transduction and molecular crosstalk. *Toxins*. 2010; 2:69-92.
28. Hatakeyama M, Brzozowski T. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2006; 11 Suppl 1:14-20.
29. Fujikawa A, Shirasaka D, Yamamoto S, Ota H, Yahiro K, Fukada M, et al. Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nature genetics*. 2003; 33:375-81.
30. Rassow J. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin A and apoptosis. *Cell communication and signaling : CCS*. 2011; 9:26.
31. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93:14648-53.
32. Doyle J, Evans, Jr., Evans D. *Helicobacter pylori* CagA: Analysis of Sequence Diversity in Relation to Phosphorylation Motifs and Implications for the Role of CagA as a Virulence Factor. *Helicobacter*. 2001; 6:187-98.
33. Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S, Yuasa H, Saadat I, et al. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*. 2005; 280:23130-7.
34. Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* causes gastric cancer by hijacking cell growth signaling. *Discovery medicine*. 2004; 4:476-81.
35. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, et al. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99:14428-33.
36. Shimizu T, Marusawa H, Endo Y, Chiba T. Inflammation-mediated genomic instability: roles of activation-induced cytidine deaminase in carcinogenesis. *Cancer science*. 2012.
37. Stoicov C, Li H, Cerny J, Houghton JM. How the study of *Helicobacter* infection can contribute to the understanding of carcinoma development. *Clinical microbiology and infection :*

the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2009; 15:813-22.

38. Sherman AE, Zavros Y. Role of Sonic Hedgehog signaling during progression from inflammation to cancer in the stomach. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*. 2011; 2:103-8.

39. Lamb A, Chen LF. Role of the *Helicobacter pylori*-Induced inflammatory response in the development of gastric cancer. *Journal of cellular biochemistry*. 2013; 114:491-7.

40. Alpízar-Alpízar W, Une C, R. S. inflamación y su papel en el desarrollo de CG. *Acta Médica Costarricense*. 2009; 51:76-82.

41. Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. *Helicobacter pylori* infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology*. 1997; 113:1099-109.

42. Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T, Morisawa T, et al. *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nature medicine*. 2007; 13:470-6.

43. Fan X, Long A, Goggins M, Keeling PW, Kelleher D. Expression of CD44 and its variants on gastric epithelial cells of patients with *Helicobacter pylori* colonisation. *Gut*. 1996; 38:507-12.

44. Jaiswal M, LaRusso NF, Gores GJ. Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2001; 281:G626-34.

45. Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. 1965; 64:31-49.

46. Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. *Journal of digestive diseases*. 2012; 13:2-9.

47. Vorobjova T, Maaroos HI, Uibo R. Immune response to *Helicobacter pylori* and its association with the dynamics of chronic gastritis in the antrum and corpus. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2008; 116:465-76.

48. Dirnu R, Secureanu FA, Neamtu C, Totolici BD, Pop OT, Mitrut P, et al. Chronic gastritis with intestinal metaplasia: clinico-statistical, histological and immunohistochemical study. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2012; 53:293-7.

49. Owen DA. The morphology of gastritis. *The Yale journal of biology and medicine*. 1996; 69:51-60.

50. Rubiano VJ, Velasquez G. M. Atrofia, metaplasia y cáncer gástrico: ¿dónde está la evidencia? *Rev colomb Cir*. 2007; 22:39-46.

51. Barros R, Freund JN, David L, Almeida R. Gastric intestinal metaplasia revisited: function and regulation of CDX2. *Trends in molecular medicine*. 2012; 18:555-63.

52. Lin LL, Huang HC, Juan HF. Discovery of biomarkers for gastric cancer: a proteomics approach. *Journal of proteomics*. 2012; 75:3081-97.

53. Lieberman HB. DNA damage repair and response proteins as targets for cancer therapy. *Current medicinal chemistry*. 2008; 15:360-7.

54. Kitajima Y, Miyazaki K, Matsukura S, Tanaka M, Sekiguchi M. Loss of expression of DNA repair enzymes MGMT, hMLH1, and hMSH2 during tumor progression in gastric cancer. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*. 2003; 6:86-95.

55. Hamamoto T, Yokozaki H, Semba S, Yasui W, Yunotani S, Miyazaki K, et al. Altered microsatellites in incomplete-type intestinal metaplasia adjacent to primary gastric cancers. *Journal of clinical pathology*. 1997; 50:841-6.
56. Busuttil RA, Boussioutas A. Intestinal metaplasia: a premalignant lesion involved in gastric carcinogenesis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2009; 24:193-201.
57. Mutoh H, Sakurai S, Satoh K, Tamada K, Kita H, Osawa H, et al. Development of gastric carcinoma from intestinal metaplasia in Cdx2-transgenic mice. *Cancer research*. 2004; 64:7740-7.
58. Kang JM, Lee BH, Kim N, Lee HS, Lee HE, Park JH, et al. CDX1 and CDX2 expression in intestinal metaplasia, dysplasia and gastric cancer. *Journal of Korean medical science*. 2011; 26:647-53.
59. Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*. 2002; 109:113-24.
60. Rieder G, Tessier AJ, Qiao XT, Madison B, Gumucio DL, Merchant JL. Helicobacter-induced intestinal metaplasia in the stomach correlates with Elk-1 and serum response factor induction of villin. *The Journal of biological chemistry*. 2005; 280:4906-12.
61. Díez AM, Muguerza H. M., Martín D. A. Marcadores biológicos en adenocarcinomas gástricos. *Gastroenterología Integrada*. 2002; 3:229-41.
62. Kim SS, Meitner P, Konkin TA, Cho YS, Resnick MB, Moss SF. Altered expression of Skp2, c-Myc and p27 proteins but not mRNA after H. pylori eradication in chronic gastritis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2006; 19:49-58.
63. Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nature cell biology*. 1999; 1:193-9.
64. Zhang W, Chu YQ, Ye ZY, Zhao ZS, Tao HQ. Expression of hepatocyte growth factor and basic fibroblast growth factor as prognostic indicators in gastric cancer. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009; 292:1114-21.
65. Li W. Comparative proteomics analysis of human gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2008; 14:5657.
66. Bai Z, Ye Y, Liang B, Xu F, Zhang H, Zhang Y, et al. Proteomics-based identification of a group of apoptosis-related proteins and biomarkers in gastric cancer. *International journal of oncology*. 2011; 38:375-83.
67. Kocevar N, Odreman F, Vindigni A, Grazio SF, Komel R. Proteomic analysis of gastric cancer and immunoblot validation of potential biomarkers. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012; 18:1216-28.
68. Chen J, Kahne T, Rocken C, Gotze T, Yu J, Sung JJ, et al. Proteome analysis of gastric cancer metastasis by two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry for identification of metastasis-related proteins. *Journal of proteome research*. 2004; 3:1009-16.
69. Wu C, Luo Z, Chen X, Yao D, Zhao P, Liu L, et al. Two-dimensional differential in-gel electrophoresis for identification of gastric cancer-specific protein markers. *Oncol Rep*. 2009; 21:1429-37.
70. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-5.
71. Ryu JW, Kim HJ, Lee YS, Myong NH, Hwang CH, Lee GS, et al. The proteomics approach to find biomarkers in gastric cancer. *Journal of Korean medical science*. 2003; 18:505-9.
72. A. B. 2-D Clean-Up Kit2002.

- 73. Healthcare G. 2-D Quant Kit. 2002-2009.
- 74. Healthcare G. Ettan DIGE System, User Manual. AB E, editor2005.