



REVISTA DE
GASTROENTEROLOGÍA
DE MÉXICO

www.elsevier.es/rgmx



ARTÍCULO ORIGINAL

Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico



D.N. Martínez-Carrillo^a, J. Atrisco-Morales^a, R. Hernández-Pando^b,
S. Reyes-Navarrete^c, R. Betancourt-Linares^d, I. Cruz-del Carmen^e, B. Illades Aguiar^f,
A. Román-Román^g y G. Fernández-Tilapa^{a,*}

^a Laboratorio de Investigación Clínica, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México

^b Sección de Patología Experimental, Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición «Salvador Zubirán», México D.F., México

^c Servicio de Endoscopia, Instituto Estatal de Cancerología «Dr. Arturo Beltrán Ortega», Acapulco, Guerrero, México

^d Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopia, Chilpancingo, Guerrero, México

^e Servicio de Endoscopia, Hospital General «Dr. Raymundo Abarca Alarcón», Chilpancingo, Guerrero, México

^f Laboratorio de Biomedicina, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México

^g Laboratorio de Investigación en Bacteriología, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México

Recibido el 25 de enero de 2014; aceptado el 23 de octubre de 2014

Disponible en Internet el 26 de noviembre de 2014

PALABRAS CLAVE

Helicobacter pylori;
cagA;
vacA;
Interferón gamma;
Cáncer gástrico

Resumen

Antecedentes: El *H. pylori* es el principal factor de riesgo para el desarrollo de gastritis crónica, úlcera gástrica y cáncer gástrico. El resultado clínico en infectados por esta bacteria depende de varios factores, entre ellos los componentes bacterianos, la respuesta inmune, y la influencia del medio ambiente.

Objetivo Comparar la expresión de IFN- γ con los genotipos *vacA* y *cagA* de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico.

Pacientes y métodos: Se incluyeron 95 pacientes con diagnóstico de gastritis crónica y 20 con cáncer gástrico. Se tomaron 3 biopsias gástricas, una se utilizó para la identificación molecular y genotipificación de *H. pylori*. Otra fue fijada en alcohol absoluto y realizaron cortes histológicos para determinar la expresión de IFN- γ por inmunohistoquímica.

* Autor para correspondencia: Laboratorio de Investigación Clínica, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Avenida Lázaro Cárdenas S/N Ciudad Universitaria Col. La Haciendita 39087, Chilpancingo, Guerrero, México. Tel.:éfono y fax: +52-747-4725503.

Correo electrónico: gferti@hotmail.com (G. Fernández-Tilapa).

Resultados: No se encontraron diferencias en las células que expresaron IFN- γ entre pacientes con gastritis crónica (mediana del porcentaje de células positivas: 82.6% en pacientes sin *H. pylori* y 82% en personas infectadas) y cáncer gástrico (70.5% en pacientes *H. pylori*-negativos y 78.5% en infectados). En pacientes con gastritis crónica infectados por *H. pylori vacAs2m2/cagA*⁻ la expresión de IFN- γ fue del 69%, en pacientes con *H. pylori vacAs1m2/cagA*⁻ fue de 86.5%, en *vacAs1m1/cagA*⁻ del 86.5%, y en *vacAs1m1/cagA*⁺ del 82%. En cáncer se encontraron datos similares.

Conclusión: La expresión de IFN- γ varía dependiendo del genotipo *vacA* y *cagA* de *H. pylori*, pero no de acuerdo a la presencia de gastritis crónica o cáncer gástrico.

© 2014 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Helicobacter pylori;
cagA;
vacA;
Interferon gamma;
Gastric cancer

Helicobacter pylori vacA and *cagA* genotype diversity and interferon gamma expression in patients with chronic gastritis and patients with gastric cancer

Abstract

Background: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is the main risk factor for the development of chronic gastritis, gastric ulcer, and gastric cancer. In *H. pylori*-infected individuals, the clinical result is dependent on various factors, among which are bacterial components, the immune response, and environmental influence.

Aims: To compare IFN- γ expression with the *H. pylori vacA* and *cagA* genotypes in patients with chronic gastritis and patients with gastric cancer.

Methods: Ninety-five patients diagnosed with chronic gastritis and 20 with gastric cancer were included in the study. Three gastric biopsies were taken; one was used for the molecular detection and genotyping of *H. pylori*; another was fixed in absolute alcohol and histologic sections were made for determining IFN- γ expression through immunohistochemistry.

Results: No differences were found in the cells that expressed IFN- γ between the patients with chronic gastritis (median percentage of positive cells: 82.6% in patients without *H. pylori* and 82% in infected persons) and those with gastric cancer (70.5% in *H. pylori*-negative patients and 78.5% in infected persons). IFN- γ expression was 69% in chronic gastritis patients infected with *H. pylori vacAs2m2/cagA*⁻, it was 86.5% in patients infected with *H. pylori vacAs1m2/cagA*⁻, 86.5% in *vacAs1m1/cagA*⁻, and 82% in *vacAs1m1/cagA*⁺. Similar data were found in the patients with gastric cancer.

Conclusions: IFN- γ expression varied depending on the *H. pylori vacA* and *cagA* genotype, but not in accordance with the presence of chronic gastritis or gastric cancer.

© 2014 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Published by Masson Doyma México S.A. All rights reserved.

Introducción

Helicobacter pylori (*H. pylori*) infecta a casi la mitad de la población mundial y es la principal causa de gastritis crónica, úlcera gástrica o duodenal, cáncer gástrico y linfoma de células B de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)¹⁻³.

La citotoxina asociada al gen A (*CagA*) y la citotoxina vacuolizante (*VacA*) son factores de virulencia de *H. pylori* que tienen múltiples efectos sobre la célula epitelial humana⁴. Las cepas de *H. pylori cagA* positivas se asocian a inflamación más severa que las cepas *cagA* negativas. *H. pylori* transfiere la proteína *CagA* y otros factores solubles al citoplasma de la célula epitelial a través de su sistema de secreción tipo IV⁵. *CagA* activa vías de señalización intracelulares que conducen a la activación de factores de transcripción que modulan la expresión de citocinas proinflamatorias, a la infiltración de células inmunes, al daño en las uniones célula-célula y al cambio en la polaridad

y la permeabilidad de la célula epitelial³. La toxina *VacA* induce vacuolización, apoptosis e inhibición de la proliferación celular^{3,6}. Todas las cepas de *H. pylori* contienen el gen *vacA*, que es polimórfico en la región señal (alelos *s1a*, *s1b*, *s1c* y *s2*) y la región media (alelos *m1* y *m2*). Cada gen *vacA* contiene un alelo *s* y un alelo *m*, y la diversidad en la secuencia afecta a la actividad vacuolizante de la citotoxina. Las cepas *vacA s1m1* están asociadas a una enfermedad más severa^{4,7}.

H. pylori induce una fuerte respuesta inmunológica, humoral y celular, caracterizada por infiltración de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y linfocitos al sitio de infección. La migración de leucocitos está mediada por citocinas y quimiocinas liberadas por las células epiteliales e inmunitarias; sin embargo, a pesar del alto número de leucocitos infiltrantes, en la mayoría de los sujetos infectados no se elimina la bacteria y la intensidad de la respuesta inflamatoria contribuye al resultado clínico de la infección^{8,9}.

En la mucosa gástrica de adultos con gastritis o con úlcera péptica infectados por *H. pylori* hay una respuesta inmunitaria predominante de tipo Th1, con una elevada expresión de interferón gamma (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2) y baja expresión de IL-4 e IL-10⁹.

El IFN- γ es un mediador importante de la inmunidad innata y adaptativa; es producido principalmente por células T CD4⁺, CD8⁺ y células asesinas naturales (NK). Esta citocina está sobreexpresada en el estómago de humanos y ratones infectados por *Helicobacter* spp.¹⁰. El IFN- γ desempeña un papel dual en respuesta a la infección por *H. pylori*; por un lado, induce inflamación gástrica y promueve la aparición de lesiones preneoplásicas debidas a la infección y, por otra parte, el IFN- γ disminuye la colonización bacteriana y es fundamental para la eliminación de la infección^{11,12}.

En estudios previos se encontró que los niveles de IFN- γ fueron más altos en pacientes infectados por *H. pylori* que en pacientes sin infección^{9,13-15}. Wang et al., en 2007, encontraron que en pacientes infectados por *H. pylori* *cagA*⁺ la respuesta inmunitaria celular mediada por células Th1 estuvo asociada a etapas más tempranas de la carcinogénesis gástrica, mientras que la inmunidad humoral mediada por células Th2 predominó en las etapas avanzadas¹⁶. A pesar de que se ha observado que la expresión de IFN- γ se encuentra incrementada en la mucosa gástrica de pacientes *H. pylori* positivos, no se ha evaluado si la expresión de esta citocina varía con el genotipo *vacA* y *cagA* de la bacteria. En nuestro conocimiento, no se han publicado datos que documenten la expresión de IFN- γ en pacientes mexicanos con enfermedades gástricas asociadas a la infección por *H. pylori*. El objetivo de este estudio fue relacionar la expresión de IFN- γ con la infección por *H. pylori* y con los genotipos *vacA* y el estado de *cagA* de la bacteria en pacientes con gastritis crónica y cáncer.

Métodos

Pacientes

Se incluyó a pacientes que asistieron a realizarse una endoscopia digestiva alta al Hospital General «Raymundo Abarca Alarcón», a la Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopia de la Ciudad de Chilpancingo y al Servicio de Endoscopia del Instituto Estatal de Cancerología «Arturo Beltrán Ortega» en Acapulco, Guerrero, México, de agosto de del 2011 a marzo del 2013. Se seleccionó a pacientes sin tratamiento de erradicación para *H. pylori* durante el mes previo al procedimiento endoscópico. Se excluyó del estudio a los pacientes con tratamiento inmunosupresor o antiinflamatorio no esteroideo. Los pacientes o sus padres firmaron una carta de consentimiento informado. A los pacientes que aceptaron participar en el estudio se les aplicó una encuesta para registrar datos generales e información relacionada con la enfermedad. El proyecto se aprobó por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Guerrero y por los hospitales participantes.

Endoscopia y obtención de biopsias

La endoscopia se llevó a cabo después de una noche de ayuno con un videoprocesador y un videogastroscoPIO (Fujinon,

Wayne, EE. UU.). De cada paciente, se tomaron 3 biopsias gástricas de antro, cuerpo o del tumor; una fue colocada en solución amortiguadora (Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, SDS 0.5%) para el diagnóstico molecular de *H. pylori*. Otra fue fijada en alcohol absoluto para verificar la expresión de IFN- γ por inmunohistoquímica. La última biopsia fue fijada en formol amortiguado para el estudio histopatológico. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina y eosina, y evaluados por un patólogo usando los criterios del sistema de Sydney actualizado¹⁷ o la clasificación de Lauren¹⁸.

Detección y genotipificación de *Helicobacter pylori*

Se extrajo el ADN total de las biopsias gástricas por la técnica de fenol-cloroforno-alcohol isoamílico, previa digestión con proteinasa K¹⁹. La detección de *H. pylori* se realizó por PCR, amplificando un fragmento del gen *16S* del *RNAr*, siguiendo la metodología descrita previamente por Martínez-Carrillo et al.²⁰. Las muestras *H. pylori* positivas fueron sometidas a una segunda PCR con iniciadores para amplificar las regiones *s* y *m* del gen *vacA*^{21,22}, el gen *cagA*²³ y *babA2*²⁴. En un volumen final de 25 μ L se mezclaron 500 ng de ADN, 1.5 mM de MgCl₂, 0.15 mM de dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.), 1.3 U de Taq DNA polimerasa Platinum® (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) y las concentraciones requeridas de oligonucleótidos: 2.5 pM para *vacA*, 5 pM para *cagA* y 12.5 pM para *babA2*. El programa de amplificación incluyó un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por 10 min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 57 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y un paso de extensión final a 72 °C por 10 min (fig. 1). En cada PCR, se usó ADN de la cepa J99, con genotipo *vacAs1m1/cagA*⁺/*babA2*⁺ como control positivo. Para el control negativo, el ADN fue sustituido por agua desionizada estéril. Todas las reacciones

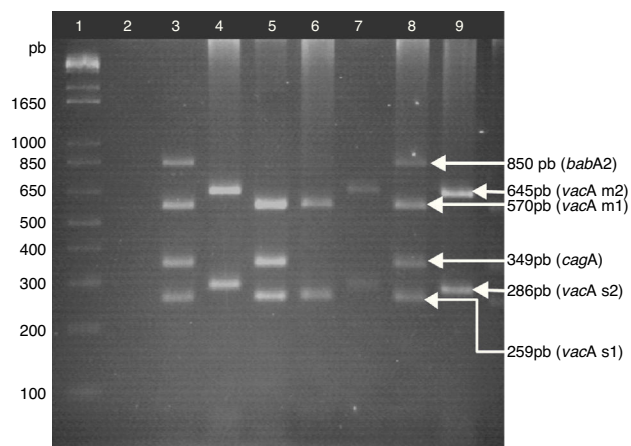


Figura 1 Genotipificación de *H. pylori*. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb plus; carril 2: control negativo; carril 3: control positivo, ADN de la cepa J99 de *H. pylori*, genotipo *vacAs1m1/cagA*⁺/*babA2*⁺; carril 4, 7 y 9: muestras clínicas genotipo *vacAs2m2/cagA*⁻/*babA2*⁻; carril 5: muestra clínica genotipo *vacAs1m1/cagA*⁺/*babA2*⁻; carril 6: muestra clínica genotipo *vacAs1m1/cagA*⁻/*babA2*⁻; carril 8: muestra clínica genotipo *vacAs1m1/cagA*⁺/*babA2*⁺. Gel de agarosa al 2.5%.

Tabla 1 Prevalencia de infección por *H. pylori* y genotipos *vacA/cagA*

	Gastritis crónica(n= 95)	Cáncer gástrico(n= 20)	Valor de p
Edad (media ± DE; años)	47.4 ± 16	60.9 ± 16.2	< 0.001 ^a
Género, n (%)			
Femenino	59 (62.1)	11 (55)	0.554 ^b
Masculino	36 (37.9)	9 (45)	
<i>H. pylori</i> , n (%)			
Negativo	41 (43.2)	8 (40)	0.795 ^b
Positivo	54 (56.8)	12 (60)	
Genotipo <i>vacA/cagA</i> , n (%)			
<i>vacAs2m2/cagA</i> ⁻	3 (5.5)	2 (16.7)	0.587 ^c
<i>vacAs2m2/cagA</i> ⁺	1 (1.9)	0	
<i>vacAs1m2/cagA</i> ⁻	1 (1.9)	0	
<i>vacAs1m2/cagA</i> ⁺	2 (3.7)	0	
<i>vacAs1m1/cagA</i> ⁻	8 (14.8)	3 (25)	
<i>vacAs1m1/cagA</i> ⁺	39 (72.2)	7 (58.3)	
Total	54 (100)	12 (100)	

^a Prueba de la t de Student.

^b Prueba de la χ^2 .

^c Prueba exacta de Fisher.

fueron hechas en un termociclador Mastercycler Ep gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemania).

Detección de la expresión de interferón gamma por inmunohistoquímica

Las muestras fijadas en alcohol absoluto fueron incluidas en parafina. Se hicieron cortes de 3 μ m. Cada sección de tejido fue desparafinado con xilol y rehidratado con alcohol en grados descendentes. Las laminillas se hirvieron con buffer de citratos (Declere 1X, Cell marque, Rocklin, EE. UU.) por 20 min en autoclave, para recuperación antigénica. Después de la permeabilización y el bloqueo de la peroxidasa endógena, los cortes fueron incubados toda la noche con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-IFN- γ humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE. UU.) dilución 1:50. La unión del anticuerpo fue detectada con el Kit Mouse/Rabbit ImmunoDetector HRP/DAB Detection System (Bio SB, Santa Barbara, EE. UU.). Los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina (Biocare Medical, Concord, EE. UU.). En 5 campos seleccionados al azar, se contó un total de 100 células mononucleares y se consideraron positivas aquellas con tinción nuclear o citoplasmática marrón. Los datos fueron expresados como porcentaje de células positivas. Para validar los resultados del conteo manual de células IFN- γ +, se seleccionó al azar un número de muestras equivalente al 10% y se verificó el porcentaje de células IFN- γ mediante el software Leica Microsystems CMS GmbH versión 4.3.0.

Análisis estadístico

Se determinaron las frecuencias de las variables cualitativas, la media \pm desviación estándar de las variables cuantitativas paramétricas y mediana y rango intercuartílico para variables no paramétricas. El valor de p se obtuvo

con la prueba de la χ^2 o exacta de Fisher para variables cualitativas y prueba t de Student, ANOVA, Mann-Whitney o Kruskal-Wallis para variables cuantitativas. Un valor de p < 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* y genotipos *vacA/cagA*

Se estudió a 95 pacientes que recibieron diagnóstico histológico confirmatorio de gastritis crónica y 20 con resultados histopatológicos de adenocarcinoma gástrico. La media de edad para el grupo de gastritis crónica fue de 47.4 años y de 60.9 años en cáncer gástrico (p < 0.001, [tabla 1](#)). De los 115 pacientes incluidos en el estudio, 66 (57.4%) fueron *H. pylori* positivos y el genotipo más frecuente fue *vacAs1m1/cagA*⁺, el 69.7% (46/66). La prevalencia de infección por *H. pylori* y de los genotipos *vacA/cagA* varió entre los grupos ([tabla 1](#)).

Expresión de interferón gamma en gastritis crónica y cáncer gástrico

La expresión de IFN- γ se localizó predominante en el citoplasma de las células mononucleares infiltrantes. Se detectó expresión de IFN- γ en la mayoría de los pacientes *H. pylori* positivos y *H. pylori* negativos (99/115, datos no mostrados). No se encontraron diferencias en las células que expresaron IFN- γ entre pacientes con gastritis crónica (mediana del porcentaje de células positivas: 82.6% en pacientes sin *H. pylori* y 82% en personas infectadas) y cáncer gástrico (70.5% en pacientes *H. pylori*-negativos y 78.5% en infectados). ([fig. 2](#)). En gastritis crónica, la mediana del porcentaje de células con expresión de IFN- γ por grupo de edad varió entre el 78 y el 84% (rango intercuartílico del 70 al 90%);

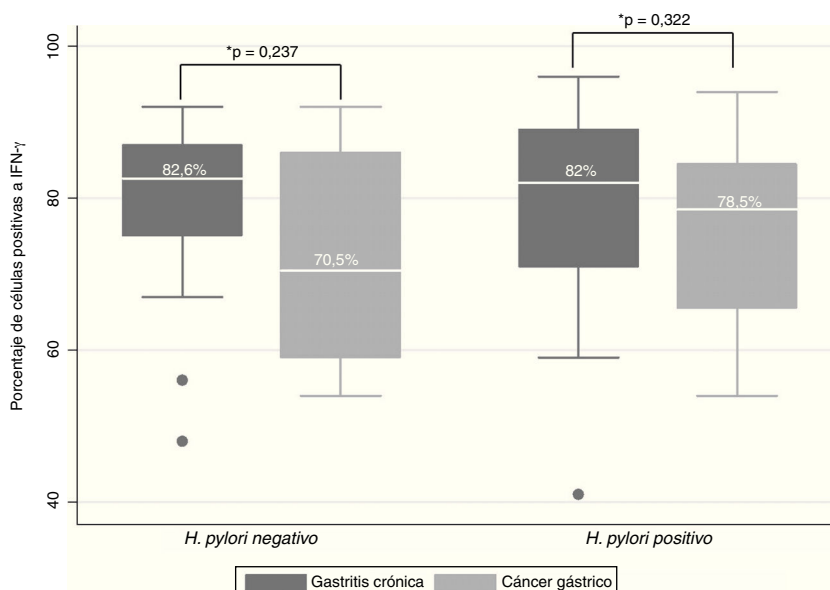


Figura 2 Expresión de IFN-g en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico con y sin infección por *H. pylori*.
* Prueba de Mann-Whitney.

en cáncer gástrico, la mediana fue del 64 al 90% (rango intercuartílico del 55 al 94%) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células IFN-γ positivas ni entre los grupos de edad de los pacientes con gastritis crónica ($p=0.1601$) ni entre los grupos etarios con cáncer gástrico ($p=0.1514$) (fig. 3). Tampoco se encontraron diferencias en el porcentaje de células con expresión de IFN-γ entre gastritis crónica y cáncer gástrico ($p=0.8781$), datos no mostrados.

En pacientes con gastritis crónica y con cáncer gástrico, la expresión de IFN-γ varía con el genotipo de *H. pylori* (fig. 4). En el grupo de gastritis crónica, los infectados por *H. pylori vacAs2m2/cagA⁻* presentaron un porcentaje menor de células con expresión de IFN-γ (69%), en comparación con los pacientes con *H. pylori vacAs1m2/cagA⁻* (86.5%), *vacAs1m1/cagA⁻* (86.5%) y *vacAs1m1/cagA⁺* (82%) (fig. 5). De forma interesante, de 5 pacientes con genotipo *vacAs1m1/cagA⁺* de *H. pylori*, en 4 se encontró el

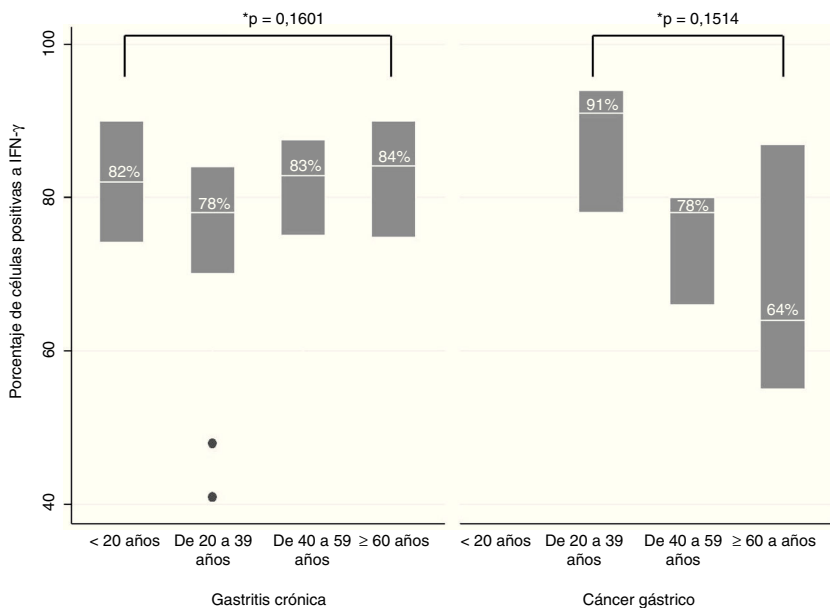


Figura 3 Porcentaje de células positivas a IFN-g en pacientes con gastritis crónica o con cáncer gástrico distribuidos en grupos de edad.
* Prueba de Kruskal-Wallis.

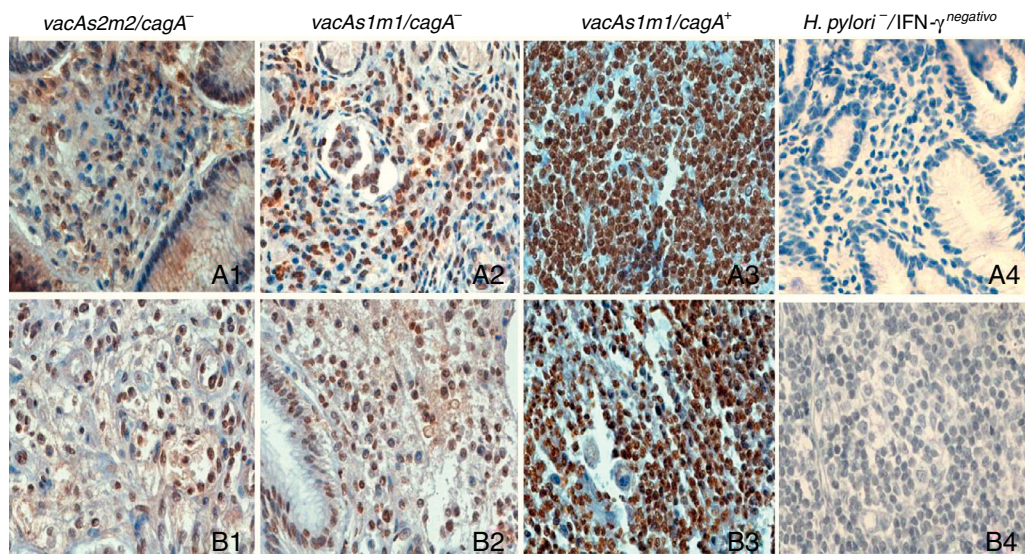


Figura 4 Inmunohistoquímica de la expresión de IFN-g en biopsias gástricas de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico, contrateñidas con hematoxilina (10). A1-A4) Biopsias gástricas de pacientes con gastritis crónica. B1-B3) Biopsias gástricas de pacientes con cáncer gástrico. B4) Biopsia de amígdala, control negativo de la reacción (se omitió el anticuerpo primario).

93% de células con expresión de IFN- γ y en un paciente el 96%. En los pacientes con cáncer gástrico infectados por el genotipo *vacAs2m2/cagA*⁻ se detectó un 70.5% de células con expresión de IFN- γ ; en quienes tenían el genotipo *vacAs1m1/cagA*⁻ el porcentaje de célula IFN- γ -positivas alcanzó el 79% y en los infectados con el genotipo *vacAs1m1/cagA*⁺ de *H. pylori* el porcentaje de células con expresión de IFN- γ fue del 78%; uno de los 7 pacientes con este mismo genotipo tuvo una expresión de IFN- γ del 94% (fig. 5).

Entre el porcentaje de células IFN- γ + contadas por observación microscópica y verificadas mediante el software Leica Microsystems, se encontró una variación de ± 4.4 células.

Discusión

La incidencia y/o severidad de las patologías relacionadas con *H. pylori* puede variar entre las áreas geográficas²⁵, la

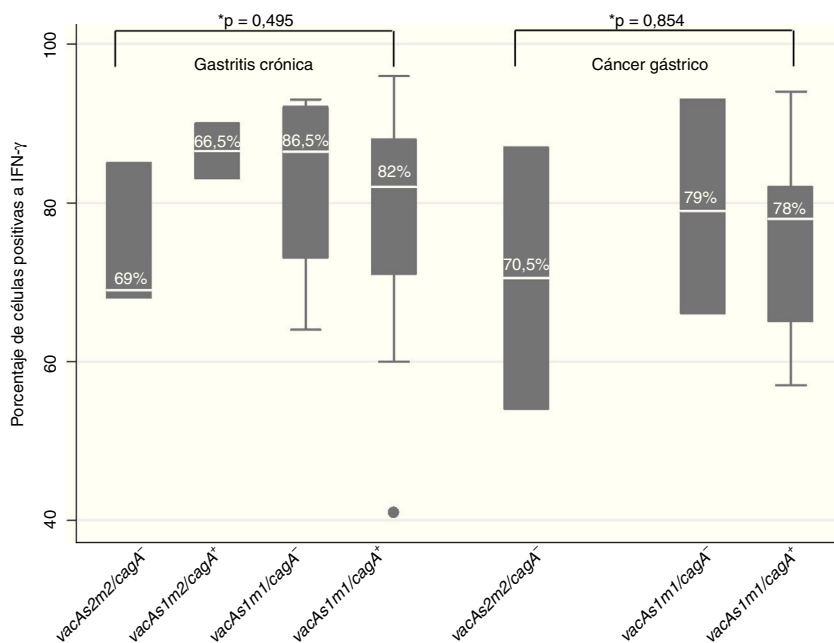


Figura 5 Expresión de IFN-g por genotipo de *H. pylori* en muestras de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. * Prueba de Kruskal-Wallis.

prevalencia de la infección y la distribución de los genotipos varía entre países, entre regiones y grupos étnicos. En México, se ha reportado una variación en la prevalencia de *H. pylori* que va de 86.1% en el sureste a 47.1% en niños del noreste del país y un 66% en una población de Tepehuanos (grupo étnico) del norte de México^{26,27,28}. Torres *et al.*, en 2005, notificaron que, en México, la prevalencia de *H. pylori* *cagA*⁺ varía de 47.6% a 63.4%²⁹.

Sin embargo, son pocos los reportes acerca de la prevalencia de infección por *H. pylori* y sus genotipos en población mexicana. En esta investigación, el 60% de los casos de cáncer gástrico fueron positivos a *H. pylori*, siendo el genotipo *vacAs1m1/cagA*⁺ el más frecuente, el 58.3% (7/12). La frecuencia de *H. pylori* encontrada en este estudio es igual a la reportada por Morales-Espinosa *et al.*, y supera la reportada por López-Vidal *et al.*, en 2008, en población mexicana, quienes detectaron la presencia de *H. pylori* en el 38% de las muestras de los pacientes con cáncer gástrico. La prevalencia de *H. pylori* *cagA*⁺ informada por López-Vidal *et al.* es superior (72%) a la que encontramos en pacientes guerrerenses con cáncer gástrico (58%). Estas diferencias pueden deberse a las distintas regiones de procedencia de los pacientes. Se ha documentado que los genotipos de *H. pylori* circulan diferencialmente entre poblaciones y zonas geográficas. En población del noreste de Brasil, de Figueiredo-Cavalcante *et al.*, en 2012, encontraron que en pacientes con cáncer gástrico el 83.3% de las cepas de *H. pylori* eran *vacAs1*, el 53.3% *vacAm1* y el 96.7% *cagA*⁺²⁵⁻²⁸.

Por otro lado, encontramos que en los casos de gastritis crónica el 56.8% fueron *H. pylori* positivos y los genotipos más frecuentes fueron el *vacAs1m1* con un 87% y un 77.8% fueron *cagA*⁺. La frecuencia del genotipo *vacAs1m1* fue mayor a la reportada por Román-Román *et al.*, en 2013, en población guerrerense con gastritis crónica (43.4%) y supera también la encontrada por Paniagua *et al.*, en 2009, en pacientes del Estado de México con gastritis crónica *H. pylori*-positivos (60.1%), en quienes el 40% de los infectados tuvieron el genotipo *vacAs1m1* y el 52% fueron *cagA*⁺. De Figueiredo-Cavalcante *et al.*, en 2012, encontraron que en pacientes con gastritis crónica los alelotipos *s1* y *m1* fueron los más frecuentes, el 72.4 y el 51.3%, respectivamente, y el 73.7% fueron *H. pylori* *cagA*⁺; Torres *et al.*, en 2009, en pacientes cubanos con dispepsia funcional, encontraron una frecuencia del 54.9% para el genotipo *vacAs1m1* y del 70.6% para el genotipo *cagA*⁺. En este trabajo, la detección de los genotipos *vacA* y *cagA* se hizo con los mismos iniciadores usados por Torres *et al.*, y en ambos estudios el ADN de *H. pylori* y de sus genotipos se hizo a partir de ADN total de biopsia gástrica, por lo que es probable que las discrepancias en las frecuencias puedan explicarse por diferencias en el origen de la población, en el número de pacientes y los criterios diagnósticos empleados, y quizá por diferencias en la metodología para obtener y procesar las biopsias²⁸⁻³¹. La probabilidad de detectar el ADN de *H. pylori* está influido por el número de bacterias en el tejido empleado como fuente de ADN genómico. Los oligonucleótidos empleados en la PCR usada en este estudio para revelar el gen *RNAr 16S* de *H. pylori* permiten detectar 2.5 ng de ADN de la bacteria en 50 o 150 ng de ADN humano y discriminar entre el gen *RNAr 16S* de *H. pylori* con el de *Campylobacter* spp. y el de otras bacterias aisladas de la mucosa gástrica²⁹. El uso de la PCR múltiple permitió obtener el genotipo bacteriano en

un menor tiempo, disminuir el gasto de reactivos y agilizar la entrega de resultados a los pacientes.

En este estudio comparamos la expresión de IFN- γ en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico infectados y no infectados por *H. pylori*, así como entre grupos de edad y grupos de infectados por diferentes genotipos bacterianos. Encontramos que el 86.1% de las muestras expresaron IFN- γ y que, a pesar de no haber encontrado diferencias entre la expresión de IFN- γ y la infección por *H. pylori* en ambos grupos de estudio, este análisis reveló que en el grupo de cáncer gástrico la expresión de IFN- γ fue menor que en el grupo de gastritis crónica independientemente de la infección. Por el contrario, Lopes *et al.*, en 2005, en muestras de niños y adolescentes de Portugal, y Lindholm *et al.*, en 1998, en pacientes de Suecia, reportaron que la expresión de IFN- γ fue mayor en las muestras de los pacientes *H. pylori*-positivos^{9,13}. Considerando que la gastritis crónica es el proceso inflamatorio de magnitud variable que puede dar origen al adenocarcinoma gástrico, en un periodo de 10 a 15 años de evolución, y que la intensidad de la respuesta inmunitaria presenta cambios con la edad de las personas, se analizó el número de células con tinción positiva a IFN- γ con respecto al grupo de edad de los pacientes. La falta de diferencias estadísticamente significativas con respecto a la edad pueden estar relacionada con la diversidad y la intensidad de los estímulos inflamatorios provenientes de *H. pylori*, con otros factores relacionados con el estilo de vida de los pacientes y con la presencia de otros agentes infecciosos, como el virus de Epstein-Barr.

Al analizar la expresión de IFN- γ de acuerdo con el genotipo *vacA/cagA* de *H. pylori*, encontramos que en ambos grupos el porcentaje de células con expresión de la citocina fue menor cuando los sujetos estaban infectados con el genotipo menos virulento (*vacAs2m2/cagA*⁺), 69% en gastritis y 70.5% en cáncer gástrico; en el grupo de gastritis hubo una mayor expresión de IFN- γ (86.5%) en aquellos pacientes *H. pylori* positivos *vacAs1m2/cagA*⁺ y *vacAs1m1/cagA*⁻. En cáncer gástrico la expresión disminuyó a un 79 y 78% en pacientes *H. pylori* positivos *vacAs1m1/cagA*⁻ y *vacAs1m1/cagA*⁺, respectivamente. Hallazgos similares fueron reportados por Wang *et al.*, en 2007, en población China, que encontraron que la expresión de IFN- γ en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico infectados por *H. pylori* *cagA*⁺ fue disminuyendo conforme la lesión gástrica se hizo más severa¹⁶. En pacientes con gastritis crónica, los niveles incrementados de IFN- γ podrían contribuir a la inflamación gástrica por activación de fagocitos mononucleares y por la sobrerregulación de la expresión de moléculas MHC-clase I y II¹³. Además de desempeñar un papel importante en la respuesta antitumoral, se ha reportado que el IFN- γ también puede tener efectos tumorigénicos³². En 2009, Sayi *et al.* reportaron que, en un modelo murino, el IFN- γ producido por las células T CD4⁺ desempeña un papel importante en el control de la infección por *H. pylori* y, por otro lado, induce cambios preneoplásicos de la mucosa gástrica¹¹. La alta expresión de IFN- γ en el grupo de pacientes con cáncer gástrico puede tener diversos significados: a) podría ser de buen pronóstico, debido a que se ha reportado que IFN- γ puede promover la eliminación de las células neoplásicas a través de su acción angiostática, la cual restringe el crecimiento tumoral por interferir con el suministro de sangre¹⁵; b) puede estar ejerciendo un efecto protumoral a través

de señales proliferativas y antiapoptóticas, y facilitando el escape de las células tumorales de la acción citolítica de las células NK y los linfocitos T citotóxicos³². Se necesitaría realizar un seguimiento de los pacientes para verificar el significado de nuestros hallazgos.

En conclusión, la expresión de INF- γ varía dependiendo del genotipo *vacA* y *cagA* de *H. pylori*, pero no de acuerdo a la presencia de gastritis crónica o cáncer gástrico. Es necesario que se realicen más estudios para determinar si la expresión de INF- γ podría ser un biomarcador útil en el pronóstico del cáncer gástrico.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes y que todos los pacientes incluidos en el estudio han recibido información suficiente y han dado su consentimiento informado por escrito para participar en dicho estudio.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Financiamiento

La investigación se realizó con financiamiento de la Universidad Autónoma de Guerrero, convocatoria 2013; de la SEP a través del PIFI-2011 y del Programa de Fortalecimiento Académico del Posgrado de Alta Calidad, clave I010/455/2013 C-677/2013.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos al Laboratorio de Biología Celular del Cáncer de la Universidad Autónoma de Guerrero por permitirnos tomar las fotografías de la inmunohistoquímica. Al Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán, por el apoyo brindado en la captura de las imágenes. Al personal del Servicio de Endoscopia del Hospital General «Raymundo Abarca Alarcón», de la Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopia y del Instituto Estatal de Cancerología «Arturo Beltrán Ortega».

Bibliografía

- Milco DM, Amedei A, Benagiano M, et al. Helicobacter pylori T cells and cytokines: The "dangerous liaisons". FEMS Immunol Med Microbiol. 2005;44:113-9.
- Ricci V, Romano M, Boquet P. Molecular cross-talk between Helicobacter pylori and human gastric mucosa. World J Gastroenterology. 2011;17:1383-99.
- Ding SZ, Zheng PY. Helicobacter pylori infection induced gastric cancer; advance in gastric stem cell research and the remaining challenges. Gut Pathog. 2012;8:18.
- Jones KR, Whitmire JM, Merrell DS. A tale of two toxins: Helicobacter pylori CagA and VacA modulate host pathways that impact disease. Front Microbiol. 2010;1:115.
- Khamri W, Walker MM, Clark P, et al. Helicobacter pylori stimulates dendritic cells to induce interleukin-17 expression from CD4+ T lymphocytes. Infect Immun. 2010;78:845-53.
- Sachs G, Scott DR. Helicobacter pylori: Eradication or preservation F1000. Med Rep. 2012;4:7.
- Polk DB, Peek RM. Helicobacter pylori: Gastric cancer and beyond. Nat Rev Cancer. 2010;10:403-14.
- Flach CF, Östberg AK, Nilsson AT, et al. Proinflammatory cytokine gene expression in the stomach correlates with vaccine-induced protection against Helicobacter pylori infection in mice: An important role for interleukin-17 during the effector phase. Infect Immun. 2011;79:879-86.
- Lopes AI, Quiding-Jarbrink M, Palha A, et al. Cytokine expression in pediatric Helicobacter pylori infection. Clin Diagn Lab Immunol. 2005;12:994-1002.
- Tu SP, Quante M, Bhagat G, et al. IFN- γ inhibits gastric carcinogenesis by inducing epithelial cell autophagy and T-cell apoptosis. Cancer Res. 2011;71:4247-59.
- Sayi A, Kohler E, Hitzler I, et al. The CD4+T cell-mediated IFN- γ response to Helicobacter infection is essential for clearance and determines gastric cancer risk. J Immunol. 2009;182:7085-101.
- Zhao Y, Zhou Y, Sun Y, et al. Virulence factor cytotoxin-associated gene A in Helicobacter pylori is downregulated by interferon- γ in vitro. FEMS Immunol Med Microbiol. 2011;61:76-83.
- Lindholm C, Quiding-Järbrink M, Lönröth H, et al. Local cytokine response in Helicobacter pylori-infected subjects. Infect Immun. 1998;66:5964-71.
- Pellicanò A, Sebkova L, Monteleone G, et al. Interleukin-12 drives the Th1 signaling pathway in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa. Infect Immun. 2007;75:1738-44.
- Lindgren Å, Yun CH, Sjöling Å, et al. Impaired IFN- γ production after stimulation with bacterial components by natural killer cells from gastric cancer patients. Exp Cell Res. 2011;317:849-58.
- Wang SK, Zhu HF, He BS, et al. CagA+ H. pylori infection is associated with polarization of T helper cell immune responses in gastric carcinogenesis. World J Gastroenterol. 2007;13:2923-31.
- Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, et al. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system-International workshop on the histopathology of gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol. 1996;20:1161-81.
- Lauren T. The two histologic main types of gastric carcinoma. Acta Pathol Microbiol Scand. 1965;64:34.
- Sambrook J, Russel D. Molecular cloning a laboratory manual EU. New York: Col Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Martínez-Carrillo DN, Garza-González E, Betancourt-Linares R, et al. Association of IL-1B -511C/-31T haplotype and Helicobacter pylori vacA genotypes with gastric ulcer and chronic gastritis. BMC Gastroenterology. 2010;10:126.

21. Atherton JC, Cao P, Peek RMR Jr. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*. 1995;270:17771–7.
22. Park CY, Kwak M, Gutierrez O, et al. Comparison of genotyping *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens and genotyping from bacterial cultures. *J Clin Microbiol*. 2003;41:3336–8.
23. Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *H. pylori*: Evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun*. 1993;61:1799–809.
24. Mizushima T, Sugiyama T, Komatsu Y, et al. Clinical relevance of the babA2 genotype of *H. pylori* in Japanese clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2463–5.
25. Morales-Espinosa R, Fernandez-Presas A, Gonzalez-Valencia G, et al. *Helicobacter pylori* in the oral cavity is associated with gastroesophageal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24:464–8.
26. López-Vidal Y, Ponce-de-León S, Castillo-Rojas G, et al. High diversity of vacA and cagA *Helicobacter pylori* genotypes in patients with and without gastric cancer. *PLoS One*. 2008;3:e3849.
27. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*. 2002;347:1175–86.
28. De Figueiredo-Cavalcante M, Simões-Silva CI, Braga-Neto MB, et al. *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:561–3.
29. Román-Román A, Giono-Cerezo S, Camorlinga-Ponce M, et al. vacA genotypes of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and stomach of patients with chronic gastritis and gastric ulcer. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31:130–5.
30. Paniagua GL, Monroy E, Rodríguez R, et al. Frequency of vacA, cagA and babA2 virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009;8:14.
31. Torres LE, Melián K, Moreno A, et al. Prevalence of vacA, cagA and babA2 genes in Cuban *Helicobacter pylori* isolates. *World J Gastroenterol*. 2009;15:204–10.
32. Raza-Zaidi M, Merlino G. The two faces of interferon- γ in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17:6118–24.